



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

PROGRAMA DE DOCTORADO

CIENCIAS DE LA SALUD

FACTORES INMUNOLÓGICOS EN EL FRACASO DE LOS HOMOINJERTOS DE ARTERIA CRIOPRESERVADA

MARIO GONZÁLEZ GAY



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

PROGRAMA DE DOCTORADO

CIENCIAS DE LA SALUD

FACTORES INMUNOLÓGICOS EN EL FRACASO DE LOS HOMOINJERTOS DE ARTERIA CRIOPRESERVADA

MARIO GONZÁLEZ GAY



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

JUSTIFICACIÓN

SE ESTIMA QUE EL PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PRESENTADO COMO TESIS DOCTORAL, CUMPLE TODOS LOS REQUISITOS PARA SU DEFENSA Y PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD DE OVIEDO

OVIEDO, 23 DE NOVIEMBRE DE 2020

Presidente de la Comisión Académica del Programa de Doctorado

Fdo.: JOSE ANTONIO VEGA ALVAREZ

Contra la presente Resolución, podrá interponer recurso de alzada ante el Rectorado, en el plazo de un mes, a partir del día siguiente al de la presente notificación, de conformidad con el art. 122 de la Ley 39/2015, de 1 de octubre, de Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español: FACTORES INMUNOLÓGICOS EN EL FRACASO DE LOS HOMOIJERTOS DE ARTERIA CRIOPRESERVADA	Inglés: IMMUNOLOGICAL FACTORS INVOLVED IN THE FAILURE OF CRYOPRESERVED ARTERIAL HOMOGRAFTS
2.- Autor	
Nombre: MARIO GONZÁLEZ GAY	DNI/Pasaporte/NIE.
Programa de Doctorado: CIENCIAS DE LA SALUD	
Órgano responsable: CENTRO INTERNACIONAL DE POSTGRADO	

RESUMEN (en español)

Los homoinjertos de arteria criopreservada han permanecido como una opción en pacientes que requieren revascularización distal o asociados a infección vascular, en ausencia de venas autólogas válidas. El objetivo de este estudio es describir los diferentes hallazgos clínicos, anatomopatológicos e inmunológicos relacionados con el rechazo de los trasplantes vasculares.

En un estudio prospectivo, se analizaron 35 pacientes a los que se les implantó un bypass de arteria criopreservada alogénica, incluyendo datos demográficos y permeabilidad. Se determinó la producción de anticuerpos anti HLA previo a la cirugía, a los 7 días, al mes, a los 3 meses y cada 3 meses desde entonces. Además, a partir del mes se incluyó evaluación clínica y ecográfica. El tipaje HLA del donante se recuperó siempre que estuviera disponible, permitiendo la caracterización y cuantificación de anticuerpos donante específicos. También, se realizó prueba cruzada por citotoxicidad dependiente del complemento.

Se constituyó un segundo grupo de pacientes con degeneración de su homoinjerto durante el periodo de seguimiento. En este grupo, constituido para el análisis descriptivo e histopatológico de los aneurismas, no solo se incluyeron aquellos trasplantes vasculares degenerados de la serie original, sino también los implantados previamente al inicio del estudio pero que degeneraron durante el periodo de seguimiento.

En total, 15 pacientes requirieron reintervención. Se registraron unas medias de permeabilidad primaria, primaria asistida y secundaria a los 3 años de 38%, 44% y 52%, respectivamente. A pesar de ello, la media de supervivencia de la extremidad y del paciente a esos mismos tres años fue del 87% y 74%, respectivamente.

Todos los pacientes estudiados registraron un incremento de anticuerpos anti HLA al mes de la intervención, si el bypass permanecía permeable. En total, 14 pacientes cumplían los requisitos para el estudio de anticuerpos donante específicos, mostrando igualmente la producción de IgG detectable al mes de la cirugía. Se confirmó también la presencia de anticuerpos fijadores de complemento. Los niveles de anticuerpos no estaban relacionados

con la degeneración del injerto. No se encontraron marcadores inmunológicos capaces de predecir el desarrollo de aneurismas y su posterior evolución.

Del grupo inicial, 3 pacientes sufrieron degeneración aneurismática durante el seguimiento, junto con 9 bypasses previamente implantados. El tiempo medio hasta la degeneración de un primer bypass fue de $33\pm 19,7$ meses, y de $30,6\pm 17,7$ y $54,5\pm 2,5$ meses para el segundo y tercer bypasses, cuando tuvieron lugar. Por tanto, subsecuentes trasplantes vasculares frecuentemente vieron incrementados los tiempos hasta una nueva degeneración, a pesar de la creciente sensibilización. Se pudieron obtener para su análisis las muestras de 8 homoinjertos degenerados que, sorprendentemente, presentaron infiltrado inflamatorio únicamente en 4 casos y depósitos de inmunocomplejos en 7.

En conclusión, la respuesta inmune contra el trasplante vascular fue confirmada en todos los pacientes, pero el rechazo crónico no provocó necesariamente la degradación del bypass o redujo el tiempo hasta la formación de nuevos aneurismas en sucesivos homoinjertos. Existe una disociación entre la permeabilidad de estos bypasses y los resultados en cuanto a salvamento de la extremidad, por lo que junto a un aceptable porcentaje de degeneraciones, todavía hacen de las arterias criopreservadas una opción válida en pacientes seleccionados e indicaciones concretas.

RESUMEN (en inglés)

Cryopreserved arterial homografts have remained an option in patients requiring distal revascularization or associated with vascular infection, in the absence of a valid autogenous veins. The objective of this study is to describe the different clinical, anatomopathological and immunological findings related to vascular transplant rejection.

In a prospective trial, 35 patients who underwent cryopreserved allogeneic arterial bypass were studied, including demographics and conduit patency. Anti-HLA antibody production was established prior to the surgery, 7 days, 1 month, 3 months and every 3 months since. Clinical and ultrasound evaluation was added after the first month. Donor HLA-typing was retrieved whenever available, allowing for the characterization and quantification of donor specific antibodies. Cytotoxic crossmatch test was also performed.

A second group of patients with homograft degenerations registered during the follow up period was studied. In this group, exclusively for aneurysm description and histopathological analysis, not only they were included those degenerated vascular transplants from the original series, but also those implanted prior to the beginning of the study and degraded during follow up.

In total, 15 patients required reintervention. We registered three-year primary, primary assisted and secondary patency rates of 38%, 44% and 52%, respectively. Nevertheless, overall limb salvage and patient survival rate at three years was 87% and 74%, respectively.

All patients studied displayed an increase in anti-HLA antibodies one month after the intervention if the bypass remained patent. In total, 14 patients fulfilled requirements for the study of donor specific antibodies, equally showing IgG production detectable one month after surgery. The presence of complement-fixing antibodies was also confirmed. Antibody levels were not related to graft degeneration. No specific immune markers able to predict aneurysmal development and evolution were found.

From the original group, 3 patients suffered aneurysmal degeneration during follow up, together with 9 bypasses previously implanted. Average time until the first degeneration was 33 ± 19.7 months, with 30.6 ± 17.7 and 54.5 ± 2.5 months for a second and third degeneration, when occurring. Therefore, subsequent vascular transplants frequently augmented the time for new degenerations, despite increasing sensibilization. Samples from 8 degenerated

homografts were available for analysis, unexpectedly showing inflammatory infiltrate in only 4 cases and immune complex deposition in 7.

In conclusion, immune response against vascular transplants was confirmed in all patients, but chronic rejection did not necessarily provoke bypass degradation or reduced the time for new aneurysms to develop in subsequent homografts. There is a dissociation between graft patency and limb salvage that, together with acceptable degeneration rates, still makes cryopreserved arteries a valuable option for selected patients in specific indications.

**SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO
EN CIENCIAS DE LA SALUD**

DEDICATORIA

A mis padres, que con su amor y sacrificio me dieron la oportunidad de llegar hasta aquí.

A mis abuelos, que me inculcaron la importancia de la ética y los valores por encima del éxito personal.

A mis maestros y compañeros, que me guiaron con su ejemplo y enseñanzas a ser el médico que hoy soy.

A mi mujer y a mi hijo, por el apoyo incondicional y el tiempo que dejé de disfrutar con ellos para poder completar esta tesis doctoral. Prometo compensar cada minuto ausente, atesorando los momentos por vivir junto a nuestro nuevo hijo en camino.

AGRADECIMIENTOS

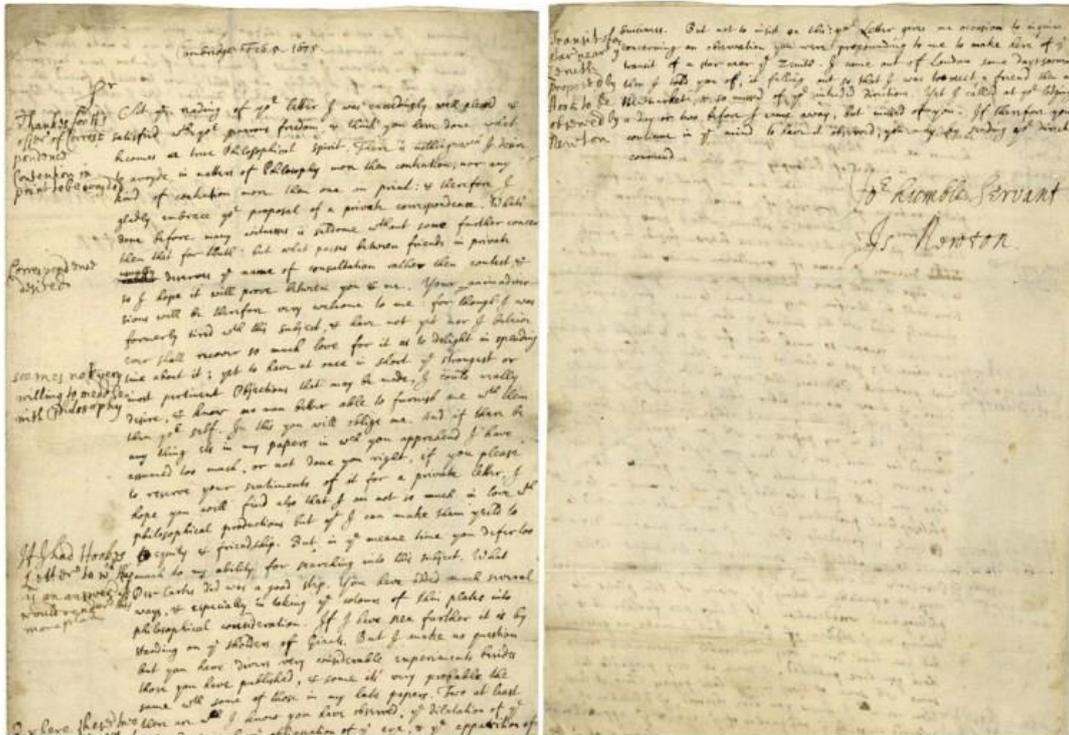
A los doctores Rebeca Alonso Arias y Manuel Alonso Pérez, directores de la presente Tesis doctoral, por su esfuerzo y dedicación estos años para llevar el estudio a buen puerto. Sin su guía y ayuda este trabajo de investigación no habría sido posible.

A la doctora Aurora Astudillo, por sus conocimientos y su buen hacer desde el servicio de Anatomía Patológica, siempre dispuesta a colaborar en descifrar las degeneraciones de arteria criopreservada.

Al servicio de Cirugía Vascul ar del Hospital Universitario Central de Asturias, que hizo realidad los bypasses aquí descritos sin dar ninguna extremidad por perdida, en la búsqueda de las mejores posibilidades de revascularización. Su experiencia todos estos años con los homoinjertos criopreservados es el origen de este trabajo de investigación.

A mis compañeros de la Fundación Hospital de Jove, por su respaldo incondicional para que finalmente pudiese completar este doctorado.

La presente investigación fue financiada por medio de la beca PI17/00714 del Programa Estatal de I+D+i 2013-2016, y cofinanciada por el Instituto de Salud Carlos III y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDR), a través del servicio de Inmunología del Hospital Universitario Central de Asturias.



«If I have seen further, it is by standing upon the shoulders of giants».

(Si he podido ver más allá es porque me encaramé a hombros de gigantes)

Carta escrita por el físico y matemático inglés Isaac Newton a su colega Robert Hooke el 15 de febrero de 1675. Su famosa frase, adaptación de la cita de Bernardo de Chartres del siglo XII, aparece en el tercio inferior de la primera página, aceptando la invitación de Hooke para mantener correspondencia privada y una cierta colaboración.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1.- PREAMBULO	23
2.- DEFINICIONES	27
3.- ESTADO DE LA CUESTIÓN	31
3.1 Breve reseña histórica	33
3.2 Indicaciones actuales para el uso de aloinjertos vasculares	40
3.3 Criopreservación de tejidos vasculares	47
3.4 Respuesta inmunológica	51
3.5 Compatibilidad ABO y Rhesus	53
3.6 Tratamiento inmunosupresor	54
3.7 Inmunología de las arterias criopreservadas	56
3.8 Cambios histológicos en el rechazo arterial	59
3.8.1 Intima	60
3.8.2 Adventicia	60
3.8.3 Media	60
3.9 Papel del endotelio vascular	63
3.10 Ateromatosis mediada inmunológicamente	65
3.11 Papel del as células musculares lisas	67
3.12 Células inflamatoria participantes	69
3.13 Aloantigenicidad de las arterias criopreservadas	71
3.14 Otros modelos de degeneración aneurismática	75

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	77
4.1 Hipótesis	79
4.2 Objetivos	79
5. MATERIAL Y MÉTODOS	81
5.1 Diseño del estudio	83
5.2 Protocolo de estudio de anticuerpos	87
5.3 Seguimiento clínico y de imagen	91
5.4 Estudio anatomopatológico	93
5.5 Homoinjertos arteriales	94
5.6 Protocolo de criopreservación	94
5.7 Protocolo de descongelación	95
5.8 Técnica de implante	95
6. RESULTADOS	97
6.1 Descripción de la población	99
6.1.1. Caracterización general de la población	101
6.1.2 Tipos de bypass de arteria criopreservada	105
6.1.3 Resultados del seguimiento	106
6.2 Análisis del estudio poblacional	111
6.2.1 Hallazgos principales	118
6.3 Resultados de la muestra de pacientes con degeneración aneurismática de su arteria criopreservada	119
6.3.1 Introducción	121

6.3.2 Pacientes con degeneración aneurismática del aoinjerto criopreservado seguidos desde el implante	122
6.3.2.1 Degeneración prospectiva A	122
6.3.2.2 Degeneración prospectiva B	126
6.3.2.3 Degeneración prospectiva C	128
6.3.2.4 Resumen de las degeneraciones aneurismáticas en aoinjertos criopreservados seguidos desde el implante	130
6.3.2.5 Hallazgos principales	131
6.3.3 Pacientes con dos o más degeneraciones de aoinjertos arteriales criopreservados	132
6.3.3.1 Degeneración múltiple. Paciente 1	132
6.3.3.2 Degeneración múltiple. Paciente 2	134
6.3.3.3 Degeneración múltiple. Paciente 3	137
6.3.3.4 Degeneración múltiple. Paciente 4	140
6.3.3.5 Degeneración múltiple. Paciente 5	142
6.3.3.6 Degeneración múltiple. Paciente 6	143
6.3.3.7 Resumen de pacientes con dos o más degeneraciones de aoinjertos arteriales criopreservados	144
6.3.3.8 Hallazgos principales	146
6.3.4 Pacientes con una primera degeneración de arteria criopreservada implantada antes del inicio del estudio	147
6.3.4.1 Degeneración simple. Paciente α	147
6.3.4.2 Degeneración simple. Paciente β	149
6.3.4.3 Degeneración simple. Paciente γ	150
6.3.4.4 Degeneración simple. Paciente δ	151

6.3.5 Resumen de los resultados de todas las degeneraciones aneurismáticas recogidas durante el seguimiento	153
6.4 Análisis de la muestra de pacientes con degeneraciones aneurismáticas	155
6.4.1 Hallazgos principales	164
6.5 Resultados de la anatomía patológica en las degeneraciones aneurismáticas de arteria criopreservada	165
6.5.1 Pacientes control	167
6.5.1.1 Aneurisma humeral de arteria nativa	167
6.5.1.2 Aneurisma de arteria nativa poplítea	168
6.5.1.3 Hallazgos principales	169
6.5.2 Degeneración aneurismática de aloinjertos de arteria criopreservada	170
6.5.2.1 Degeneración arteria criopreservada 1	170
6.5.2.2 Degeneración arteria criopreservada 2	171
6.5.2.3 Degeneración arteria criopreservada 3	173
6.5.2.4 Degeneración arteria criopreservada 4	175
6.5.2.5 Degeneración arteria criopreservada 5	177
6.5.2.6 Degeneración arteria criopreservada 6	178
6.5.2.7 Degeneración arteria criopreservada 7	180
6.5.2.8 degeneración arteria criopreservada 8	182
6.5.2.9 Resumen de los hallazgos histopatológicos de las arterias criopreservadas degeneradas	185
6.5.2.10 Hallazgos principales	186
6.6 Análisis de los resultados del estudio anatomopatológico	187
6.7 Resultados del estudio inmunológico	193

6.8 Análisis de los resultados del estudio inmunológico	216
6.8.1 Hallazgos principales	224
7. Resumen y conclusiones	225
7.1 Conclusiones	231
8. Abreviaturas	233
9. Bibliografía	237

PREÁMBULO

Cuando hace ya unos cuantos años tuve mi primer contacto con los bypasses de arterias criopreservadas, sus peculiares características como medio de revascularización generaron un interés en aquel incipiente cirujano vascular que ha perdurado hasta el día de hoy, y del que ha sido fruto el presente trabajo de tesis doctoral. Varias son las razones para que su uso destaca sobre otros conductos empleados como bypass en nuestra especialidad. En primer lugar, estos injertos constituyen no solo auténticos trasplantes en sí mismos, sino que, a diferencia de las anastomosis vasculares en órganos sólidos trasplantados, participan activamente como un arma más en las cirugías de revascularización que constituyen la rutina diaria en el trabajo de un cirujano vascular. En segundo lugar, los beneficios de su uso se ven parcialmente contrarrestados por las características complicaciones que los han venido acompañando desde su primera indicación hace ya décadas, en forma de degeneración aneurismática segmentaria de la pared del vaso.

Durante mis primeras averiguaciones como residente, la razón inicialmente aportada para justificar estas dilataciones se fundamentó en el estrés físico provocado por el proceso de criopreservación y descongelación al que se veía sometida la arteria del donante una vez explantada. Aunque dicho razonamiento tiene una base real que lo sustenta, y fue causa de muchos fracasos hiperagudos en décadas previas, los nuevos protocolos de criogenización implementados y cuyo uso se ha generalizado en todos los bancos de tejidos en el presente siglo han reducido enormemente su incidencia.

Una investigación más en profundidad sugiere la presencia de una causa inmunológica subyacente en las degeneraciones todavía observadas. Aunque no se trata de un trasplante de órgano sólido, su condición de injerto alogénico lo convierte en diana preferente del sistema inmune, si bien la criopreservación, pérdida de celularidad y posterior repoblación por células del receptor le otorgan un comportamiento clínico que difiere del rechazo descrito en otro tipo de trasplantes. La bibliografía sobre el tema es abundante y se extiende a lo largo de varias décadas, aportando puntos de vista clínicos, anatomopatológicos e inmunológicos, aunque siendo incapaz de resolver de forma concluyente cuestiones controvertidas a pesar de los múltiples modelos experimentales desarrollados. Si existe una respuesta mediada inmunológicamente frente al tejido trasplantado, ¿por qué el fracaso de estos bypasses solo se observa en un número reducido de los mismos? ¿Es responsable el proceso de criopreservación de una pérdida de la aloantigenicidad del injerto? ¿Qué mediadores humorales y/o celulares son responsables últimos de dicho fracaso?

El presente trabajo de investigación trata de aportar algo de luz en un tema todavía lleno de interrogantes, y que probablemente adolece de estudios con una visión más global que aúnen y relacionen resultados de distintas disciplinas y sean capaces de aportar una imagen general de los procesos que tiene lugar en las arterias criopreservadas trasplantadas. Conscientes de la extensión de la tarea, y admitiendo que la misma constituye su mayor debilidad, pero

también su mayor virtud, nos enorgullece presentar los resultados de este estudio, que constituye el trabajo final de doctorado en Ciencias de la Salud en la Universidad de Oviedo, y en el que han participado los servicios de Angiología y Cirugía Vasculor, Inmunología y Anatomía Patológica del Hospital Universitario Central de Asturias, así como el Banco Comunitario de Sangre y Tejidos de Asturias.

Oviedo, noviembre de 2020.

DEFINICIONES

AUTOINJERTO:

Injerto de tejido obtenido de otro sitio del mismo organismo que lo recibe. También se denomina injerto autólogo. En nuestro ámbito hace referencia a la revascularización mediante vena del propio paciente, habitualmente la vena safena interna.

ALOINJERTO/ HOMOINJERTO:

Trasplante de órgano, tejido o células de un individuo a otro individuo que es de la misma especie, pero que no es un gemelo genéticamente idéntico (diferente genotipo). También se lo conoce como injerto alogénico u homoinjerto, y puede provenir de donante cadavérico o vivo. En cirugía vascular hace referencia a trasplantes arteriales o venosos empleados en cirugía de revascularización (criopreservados o no), obtenidos durante el proceso de extracción en el trasplante de órganos o bien a través de la cirugía de varices mediante la técnica de *stripping* en donantes vivos.

Ambos términos se pueden emplear indistintamente, si bien la tradición en nuestro país se ha orientado más hacia el uso de homoinjerto, mientras que la literatura médica en lengua inglesa ha favorecido el término aloinjerto, que es el más extendido actualmente.

INJERTO SINGÉNICO

Tipo especial de trasplante que solo se puede hacer cuando el paciente tiene un hermano gemelo idéntico (homocigotos univitelinos, que comparten el mismo genotipo). Se denomina también isotrasplante. Dada la total identidad antigénica no existen problemas inmunológicos, rechazo ni enfermedad del injerto contra huésped. Es un tipo de trasplante excepcional, ya que los gemelos univitelinos son muy poco frecuentes.

XENOINJERTO/ HETEROINJERTO

Trasplante de órgano, tejido o células procedente de un donante de una especie diferente a la del receptor. También conocido como injerto heterólogo o heteroinjerto. En nuestro medio, los xenoinjertos se reducen en la actualidad a arterias o pericardio de origen bovino tratados con enzimas proteolíticas para eliminar el tejido parenquimatoso y reducir la reacción inmunológica.

PERMEABILIDAD PRIMARIA

Período comprendido entre la realización del bypass y el momento en que requiere la primera intervención para mantener o restaurar el flujo sanguíneo (endovascular o quirúrgica, bien sea fibrinólisis, trombectomía, angioplastia, stenting o reparación quirúrgica del sangrado) o bien hasta el primer episodio de trombosis, o hasta alcanzar un evento de censura (muerte, pérdida de seguimiento, trombosis definitiva del bypass, retirada de éste por cualquier motivo o finalización del periodo de estudio).

PERMEABILIDAD PRIMARIA ASISTIDA

Período transcurrido desde la realización del bypass hasta el primer episodio de trombosis o bien hasta alcanzar un evento de censura (muerte, pérdida de seguimiento, trombosis definitiva del bypass, retirada de éste por cualquier motivo o finalización del periodo de estudio).

PERMEABILIDAD SECUNDARIA

Período comprendido desde la realización del bypass hasta alcanzar un evento de censura (muerte, pérdida de seguimiento, trombosis definitiva del bypass, retirada de éste por cualquier motivo o finalización del periodo de estudio), incluyendo el tiempo tras cualquier intervención para mantener la función del injerto después de la trombosis del mismo.

SALVAMENTO DE EXTREMIDAD

Ausencia de amputación mayor, entendiendo ésta como amputación supra o infracondílea, y descartando las amputaciones digitales o transmetatarsianas.

ESTADO DE LA CUESTIÓN

BREVE RESEÑA HISTÓRICA

Durante siglos, los cirujanos se vieron enfrentados a la necesidad de optar por la amputación cuando los daños vasculares y la hemorragia sufridos por el paciente llegaban a comprometer su vida. La incapacidad para reparar dichas lesiones abocaba a la práctica de ligadura y posterior amputación de la extremidad ante la falta de viabilidad de la misma, siguiendo el principio de “primero la vida que el miembro”¹. El advenimiento de la antisepsia y la anestesia abriría el camino para que los cirujanos intentaran reparar el daño en arterias y venas, y con ello al desarrollo de nuevas técnicas y materiales quirúrgicos.

A caballo de estos avances, Zoege von Mateufel consigue realizar la resección de un segmento arterial y reanastomosis primaria de ambos extremos en 1895². Sin embargo, la reparación vascular directa no siempre resultaba factible. La primera propuesta para realizar un autotransplante de vena con el objetivo de corregir defectos arteriales fue descrita por el cirujano alemán Edmund Höpfner en 1903³, si bien sería el francés Alexis Carrel quien la pondría en práctica dos años más tarde. De forma experimental, llevó a cabo el trasplante de segmentos venosos en ratones, además de describir el proceso de arterialización en dichas venas y desarrollar técnicas pioneras en las anastomosis vasculares⁴. Sus avances en la sutura vascular y el trasplante de órganos y tejidos le valieron el Premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1912.

En 1906, José Goyanes Capdevilla realizó en España el primer autoinjerto venoso con éxito en humanos⁵, reemplazando un segmento de arteria poplítea aneurismática por vena poplítea autóloga (figura 1A). Nueve años más tarde, en Estados Unidos, Bertram M. Bernheim planteó una solución diferente para tratar un aneurisma poplíteo sífilítico de rápido crecimiento¹, llevando a cabo la resección del segmento arterial dañado de 15 cm de arteria poplítea y sustituyéndolo por 12 cm de vena safena interna (figura 1B).

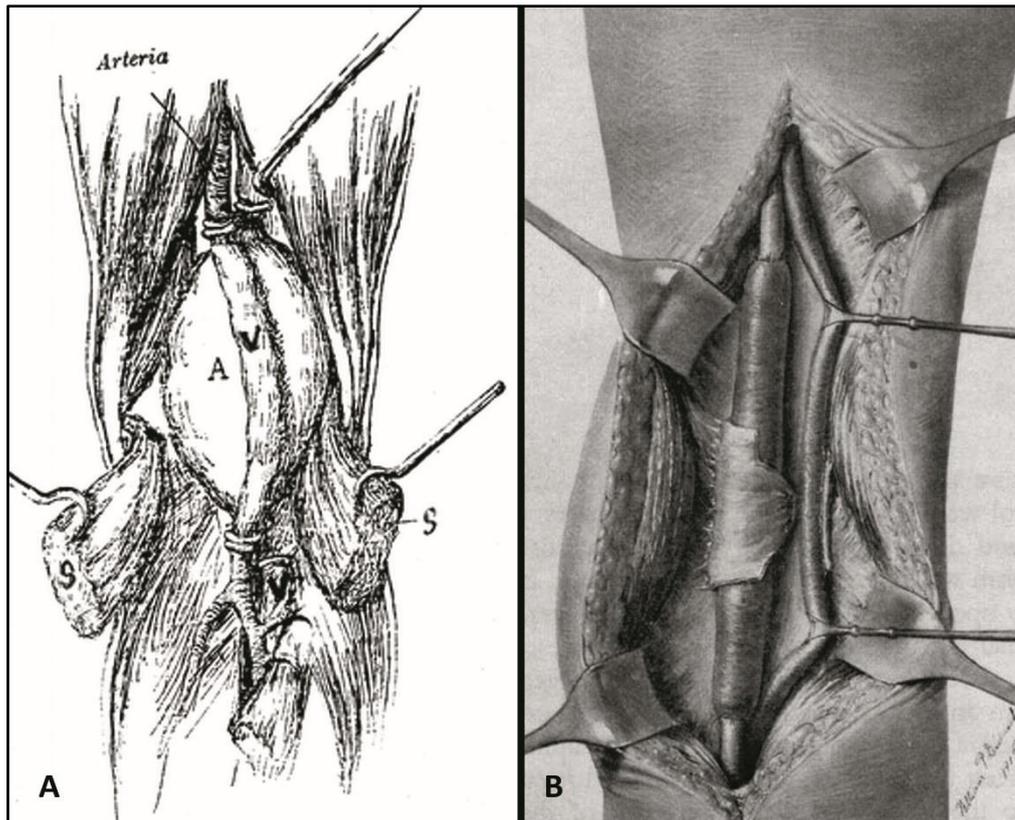


Figura 1. A: José Goyanes Capdevilla (1906). Reparación de aneurisma poplíteo mediante ligadura y bypass de vena poplíteo autóloga ⁵. **B:** Bertram M. Bernheim (1915). Reparación de aneurisma poplíteo mediante resección del mismo e interposición de segmento de vena safena interna ⁶.

En la misma línea, el alemán Erich Lexer realizó en 1907 la reparación de un aneurisma de arteria subclavia causado por una dislocación mediante el uso de un segmento de vena safena interna del propio paciente ³. Por su parte, Paul Moure publicó en 1914 una serie de 17 casos de reparaciones vasculares mediante injertos venosos, con buenos resultados ⁷.

Como en otros aspectos de la cirugía vascular, desafortunadamente muchos avances estuvieron ligados a la cirugía de guerra y a las graves lesiones que, a menudo en condiciones difíciles, los cirujanos militares se veían obligados a reparar. No es de extrañar, por tanto, que los primeros registros sobre el uso de aloinjertos venosos y arteriales provengan de cirujanos alemanes durante la Primera Guerra Mundial. En un intento por reparar lesiones en los vasos, emplearon tejido vascular obtenido de los abundantes miembros amputados a otros soldados, lamentablemente con escaso éxito, ya que los injertos se trombosaron sistemáticamente ⁸.

Estos resultados desalentadores fueron, en parte, responsables de que no se produjeran nuevos avances significativos en el trasplante vascular durante los años subsiguientes. Como resultado, durante la Segunda Guerra Mundial la intervención más habitual en caso de trauma vascular consistió en la ligadura directa del vaso, a pesar del importante incremento de este tipo lesiones en comparación con conflictos previos. Michael De Bakey y Fiorindo Simeone

publicaron en 1944 su registro de 2471 heridas arteriales de guerra, de las que sólo llegaron a efectuar con éxito 81 reparaciones directas de los vasos comprometidos ⁹.

Sería Robert Gross el primero emplear un segmento de donante cadavérico para reparar una coartación de aorta en 1945, con tal éxito que en los años posteriores publicó junto a su equipo los resultados en una serie de homoinjertos arteriales humanos (1949): en 9 casos como shunt entre la aorta y la arteria pulmonar, y en otros 6 casos como bypass de interposición al resear coartaciones de aorta ¹⁰. También en 1949, Henry Swan insertó un homoinjerto de 8 cm en la aorta descendente de un joven con coartación y dilatación extensa postestenótica ¹¹.

Dos años más tarde, Charles Dubost resecó un segmento aneurismático de aorta abdominal, sustituyéndolo por un tramo de 15 cm de aorta torácica obtenido de una paciente de 20 años muerta tres semanas antes ¹². La anastomosis distal se realizó sobre la arteria iliaca común derecha, con implante sobre el injerto de la iliaca izquierda previa endarterectomía de ésta (figura 2). El paciente sobrevivió 8 años, falleciendo por infarto de miocardio. Para entonces, el eco de estos prometedores avances ya había abierto el camino al trasplante vascular en los años subsiguientes ante la necesidad creciente de sustitutos arteriales válidos.

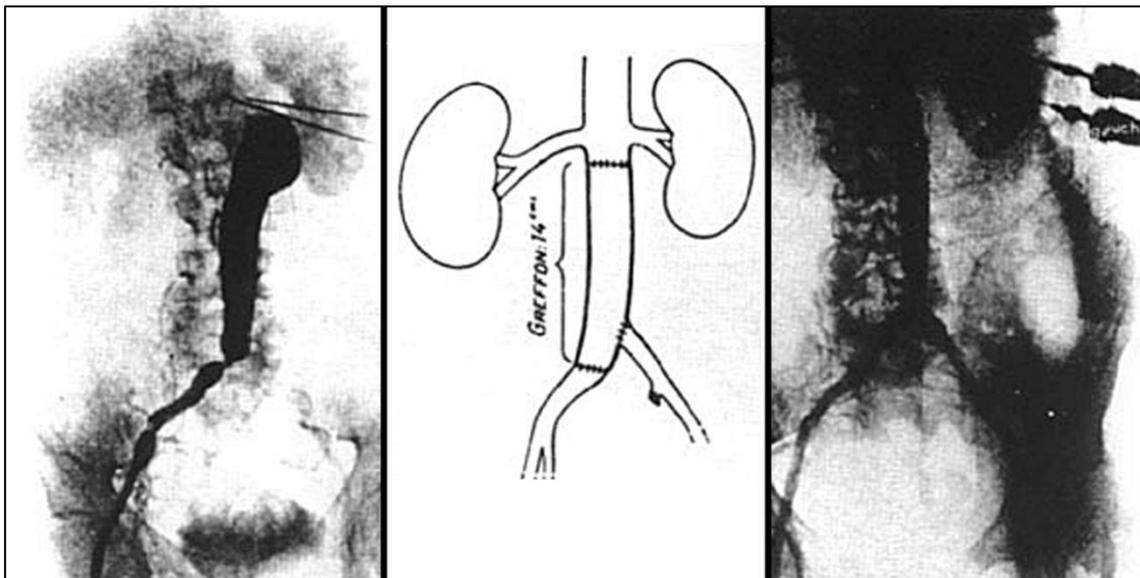


Figura 2. Charles Dubost (1952). Resección del segmento aórtico aneurismático y sustitución por aloinjerto de donante cadáver, con reimplante de iliaca izquierda endarterectomizada. Aortografías pre y post intervención, con esquema del procedimiento quirúrgico entre ambas ¹³.

A pesar de estos éxitos iniciales, los aloinjertos en fresco pronto comenzaron a dar problemas en forma de degeneración de la pared de los vasos y posterior desarrollo de aneurismas, con resultados a largo plazo poco satisfactorios. De Bakey y Szilagyi describieron ya en 1954 y 1957, respectivamente, los cambios estructurales que sufrían los homoinjertos arteriales tras el trasplante ^{14,15}. Para mitigar estas complicaciones se desarrollaron métodos tempranos de preparación y preservación con el objetivo de reducir la respuesta inmune

(formol, alcohol, glicerina, óxido de etileno, betapropiolactona, irradiación catódica de alto voltaje y liofilización). Posteriormente se popularizó el uso de aloinjertos venosos en detrimento de los arteriales. Este cambio se basó en varias asunciones que posteriormente se comprobaron erróneas en su mayor parte y que no han podido ser demostradas científicamente ¹⁶:

1. Las venas son menos antigénicas que las arterias porque presentan menor cantidad de músculo liso.
2. Debido a su pared más fina, el aloinjerto venoso podría extraer más nutrientes del flujo intraluminal que el arterial, más dependiente de los *vasa vasorum*. Esto haría menos probable la degeneración isquémica y la formación de aneurismas.

El declive en el uso de los trasplantes vasculares hizo que la atención se dirigiera hacia el desarrollo de injertos protésicos de la mano de los nuevos materiales que la investigación en química estaba desarrollando. De esta forma, se experimentó con injertos de tereftalato de polietileno o poliéster y politetrafluoroetileno expandido o ePTFE (Dacron[®] y Gore-tex[®], respectivamente, por sus nombres comerciales), extendiéndose rápidamente su uso en los casos en que los que la vena safena interna del paciente no es válida o no está disponible (figura 3).

El tereftalato de polietileno fue descubierto en 1939, pero sería DuPont quien lo perfeccionase y patentase como fibra de Dacron[®] en 1952. Injertos vasculares fabricados con dicho material serían implantados inicialmente por Ormand Julian y De Bakey en 1957 y 1958, respectivamente ¹⁷.

El PTFE fue patentado igualmente por DuPont en 1937, con el nombre de Teflon[®]. En 1969, Wilbert Lee Gore patentó a su vez el politetrafluoroetileno expandido o ePTFE (Gore-tex[®]) ¹⁸, que es el material empleado en los injertos vasculares. Fue empleado por primera vez como prótesis venosa por Ben Eiseman, al que se le había presentado el producto de forma casual durante un viaje de ski en 1971¹⁹.

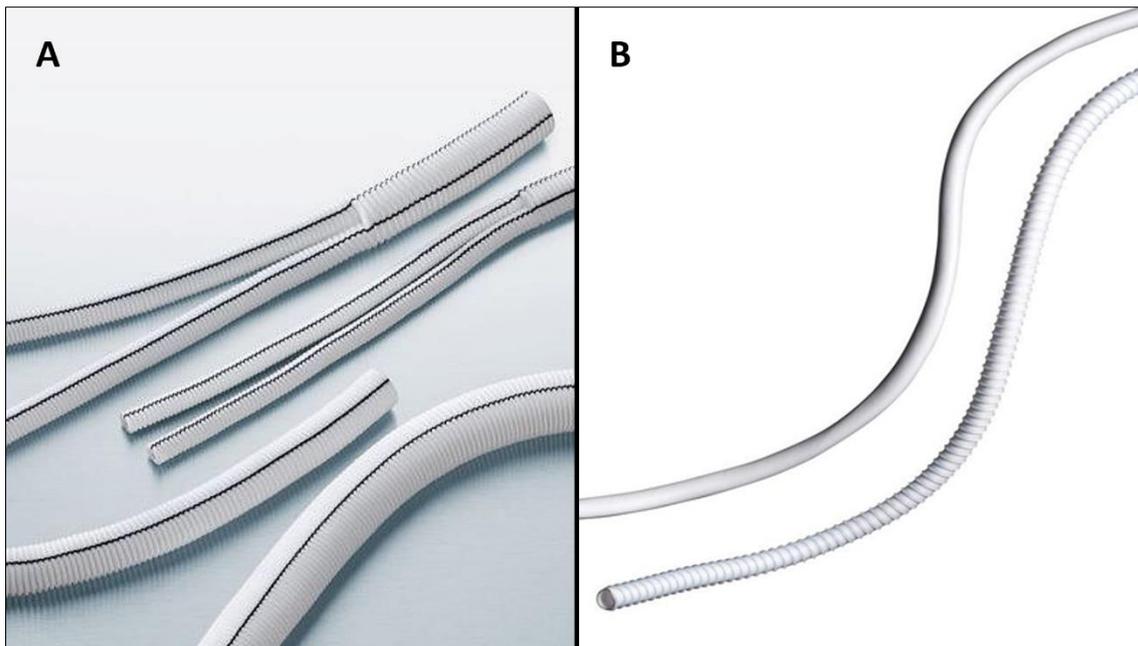


Figura 3. A: Injertos vasculares rectos y bifurcados de Dacron® de la marca Jotek®. **B:** Injertos vasculares de PTFE, anillado y sin anillar, de la empresa G.Barco S.A.

Si bien la adopción generalizada de estos nuevos materiales permitió ampliar las posibilidades de revascularización y la disponibilidad de conductos listos para su uso en la práctica quirúrgica diaria, su rendimiento dista de ser el ideal en cuanto a resistencia a las infecciones y tasa de permeabilidad, especialmente en la revascularización del sector distal, en comparación con la vena autóloga. Kashyap y colaboradores publicaron en 2002 sus resultados tras 20 años de experiencia en bypasses femoro-distales (con anastomosis distal sobre tibial anterior, peronea, tibial posterior o tronco tibioperoneo) para la revascularización de pacientes con isquemia crítica. A los 36 meses, la permeabilidad primaria fue del 20%, la permeabilidad secundaria del 42% y el salvamento de extremidad del 55%²⁰. En un metanálisis de Albers y su equipo, los injertos protésicos en reconstrucciones distales ofrecían una permeabilidad primaria del 30,5% a los 5 años y una permeabilidad secundaria del 39,7%. Tras ese periodo de seguimiento, solamente el 55,7% de los pacientes conservaban el pie²¹.

Recientemente se han desarrollado prótesis vasculares bioactivas de ePTFE con recubrimiento intraluminal de heparina, que se fija a su superficie mediante un enlace covalente. Los resultados obtenidos con este tipo de bypasses mejoran significativamente los de sus equivalentes sin heparina, de acuerdo con los estudios publicados, acercándose al rendimiento de la vena safena interna en términos de permeabilidad secundaria y salvamento de la extremidad, e incluso igualando los de las arterias criopreservadas²²⁻²⁴. No obstante, como reconocen los propios autores, existe un sesgo de selección, ya que los pacientes con grados más avanzados de isquemia crítica, que son sometidos a bypasses a troncos distales y con peor salida a través de los

mismos, no suelen constituir la primera elección para injertos protésicos, siendo además significativamente mayor el número de reintervenciones en estos últimos. Resulta difícil, por tanto, aceptar la validez de los estudios comparativos mencionados, además de que el bypass de ePTFE con recubrimiento de heparina no resuelve la necesidad de un conducto vascular de origen biológico en los casos en los que existe infección de un bypass protésico previo o arteria nativa.

La importancia de estos resultados es aún mayor si tenemos en cuenta que, en la práctica clínica diaria, entre el 20 y el 45% de los pacientes presentan una vena safena interna inadecuada o ausente^{25,26}. Estos porcentajes podrían ser incluso mayores en pacientes con necesidad de un bypass distal, ya que en muchas ocasiones han sido sometidos a cirugías de revascularización previa. En la búsqueda de un sustituto que paliase estas deficiencias, cuando el autoinjerto venoso no fuese una opción válida, resurgió nuevamente el uso de aloinjertos vasculares para un número limitado de indicaciones. El perfeccionamiento de las técnicas de criopreservación permitió aumentar la disponibilidad de este tipo de conductos, que ya no requerían su implante a las pocas horas o días, sino que podían almacenarse durante años y ser descongeladas en poco tiempo para su uso en cirugía emergente. Además, la criogenización otorga al trasplante vascular una mayor protección frente a la transmisión de infecciones, al permitir mayor tiempo de cribado y estudio del tejido donado. Tal es así, que algunos grupos de trabajo ya no consideran ético el trasplante vascular de tejido en fresco, más aún ante la dificultad para identificar posibles priones en el tejido donado²⁷. Estas reservas se plasmaron de forma práctica en la Directiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea, de 31 de marzo de 2004, relativa al establecimiento de normas de calidad y de seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos, que limitó de forma efectiva el uso de aloinjertos conservados en fresco para esta indicación en muchos países europeos. Si además tenemos en cuenta que este método de preservación no permite el almacenamiento de los injertos vasculares en banco de tejidos para su posterior uso según la demanda quirúrgica, creemos que el debate debería cerrarse definitivamente en favor de los injertos criopreservados

Por otro lado, el proceso de criopreservación redujo la aparición de degeneraciones aneurismáticas en comparación con los trasplantes en fresco²⁸. Se pensó, en un principio, que este descenso estaba relacionado con la presencia de fibroblastos viables en el tejido descongelado, ya que la criogenización reducía el número de células, pero no las hacía desaparecer por completo. Estos fibroblastos serían los responsables de producir colágeno y favorecer una continua autoreparación de la pared²⁹. Otra razón para explicar este descenso en el número de aneurismas sería la disminución de la carga antigénica del trasplante vascular con motivo del proceso de criopreservación. Como veremos más adelante, el fracaso de estos injertos en forma de degeneración de su pared está sujeta a una importante controversia, con estudios que presentan resultados contradictorios entre sí, y lagunas que nos

dificultan entender de forma integral los cambios y mecanismos a los que se ve sometido el aloinjerto vascular.

Aunque posteriormente se desarrollaron injertos vasculares que fueran capaces de conjugar estas mismas características de permeabilidad y resistencia a las infecciones, su uso no ha demostrado una ventaja clara y en su mayoría las publicaciones disponibles hacen referencia a series cortas. Los conductos vasculares de colágeno bovino (arteria carótida modificada de origen bovino, pericardio bovino...), son matrices fibrosas biológicas obtenidas mediante una serie de procesos físicos y químicos que las convierten en xenoinjertos acelulares. Su primer uso en humanos data de 1962, en posición femoro-poplítea ³⁰, y recibieron la acreditación de la Food and Drug Administration (FDA) en 1970. Sin embargo, los resultados de este tipo de bypass se vieron lastrados por una tasa acumulada de degeneraciones aneurismáticas inaceptablemente alta, que podía alcanzar el 42,6% a los 4 años ³¹. En la actualidad, arterias carótidas modificadas de origen bovino se venden bajo el nombre comercial de Artegraft® (Artegraft® Inc, North Brunswick, New Jersey).

Los injertos de vena umbilical humana tratados con glutaraldehído también intentaron ocupar el trono de los bypasses biológicos en ausencia de VSI válida. A pesar de existir series publicadas con buenos resultados de permeabilidad primaria y secundaria, que pueden alcanzar el 53% y el 67% a los 4 años, respectivamente ³², también se ha descrito un alto riesgo de degeneraciones acumulado en el tiempo (53% a los 6 años) ³³, como paso último de un proceso de biodegradación del injerto. Sin embargo, sería la alerta sanitaria en relación con la encefalopatía esponjiforme a finales de los años 90 la que supondría el práctico abandono de su uso.

Para evitar el problema de la reacción inmunológica frente al donante, a la vez que manteniendo las propiedades de resistencia a las infecciones y permeabilidad en el contexto de un injerto biológico de fácil almacenaje y pronta disponibilidad, se experimentó con procedimientos de descélularización que permitieran la repoblación de la matriz orgánica restante con células del receptor una vez implantados. Estos procedimientos están aún en fase de desarrollo, ya que se desconoce el mejor método de descélularización (se han descrito respuestas inmunológicas transitorias en probable relación con células residuales ³⁴) y carecemos de estudios prospectivos con una muestra significativa que validen los resultados.

Parece evidente que las líneas de investigación actuales (tanto en órganos sólidos como en conductos vasculares) apuntan hacia la bioingeniería de tejidos, creando andamiajes sobre los que se pueda repoblar mediante células que pueden provenir del propio huésped para conformar injertos viables con las características más parecidas posible al original. Weinberg y Bell, ya en 1986 ³⁵, intentaron fabricar un conducto biológico vascular con células xenogénicas (fibroblastos, células musculares lisas y células endoteliales), conformando una estructura similar a un vaso, aunque con pobres características mecánicas.

Desde entonces se han realizado muchos intentos de desarrollar estructuras con un endotelio completamente autólogo, que les confiera una baja trombogenicidad y que presenten propiedades mecánicas lo más parecidas posible a las de una arteria o vena ³⁶. Además del desarrollo de bioreactores que faciliten esta tarea, la última innovación en ingeniería tisular viene dada por el uso novedoso de bioimpresión 3D como método para obtener conductos vasculares, empleando tintas de base celular ³⁷. Si bien se ha recorrido un largo camino en la dirección correcta, su disponibilidad en la clínica diaria aún requiere de años de investigación y desarrollo.

A la espera de que las prometedoras perspectivas de estos nuevos avances en bioingeniería dejen obsoletos los injertos vasculares actuales, siguen existiendo situaciones en las que la necesidad de un injerto biológico, en ausencia de vena safena interna autóloga, requiere del uso de trasplantes vasculares.

INDICACIONES ACTUALES PARA EL USO DE ALOINJERTOS VASCULARES

El hecho de ser un conducto netamente orgánico otorga a los aloinjertos criopreservados una serie de ventajas frente a otras opciones de revascularización. La primera, y quizá la más importante, es su resistencia a las infecciones, por lo que su empleo resulta especialmente interesante en campos quirúrgicos en los que existe un riesgo directo de infección (heridas contaminadas, exposición del injerto por pérdida extensa de tejido...) o cuando el bypass se implanta directamente en una zona infectada, tanto en infecciones de arteria nativa como, más frecuentemente, en sustitución de un injerto protésico sobreinfectado. Esta propiedad es aún más importante, si cabe, en localización suprainguinal, donde los aneurismas micóticos y las infecciones protésicas del sector aorto-iliaco comprometen seriamente la vida del paciente. La mortalidad puede alcanzar el 76% en pacientes con complicaciones y tratamiento conservador ³⁸. La resolución definitiva del cuadro requiere la erradicación de la infección local, lo que resulta extremadamente difícil si existe sobre la zona material protésico que permita a los microorganismos acantonarse (figura 4). Entre las alternativas terapéuticas, si excluimos el tratamiento conservador y los trasplantes vasculares criopreservados, se han incluido el bypass extranatómico, los injertos protésicos embebidos en plata o antibiótico (como la Rifampicina), la reconstrucción aórtica empleando la vena femoral (Sistema Neo-aortoiliaco), xenoinjertos de pericardio bovino y los injertos biosintéticos tipo Onmiflow II®. Estos procedimientos están muchas veces asociados a importantes complicaciones, como la recurrencia infecciosa, fallo del muñón aórtico o edema severo de la extremidad donante, y en el caso del pericardio bovino o el Ominflow II®, existen escasas publicaciones y ausencia de evidencia sobre su uso en el sector aorto-iliaco ³⁹.

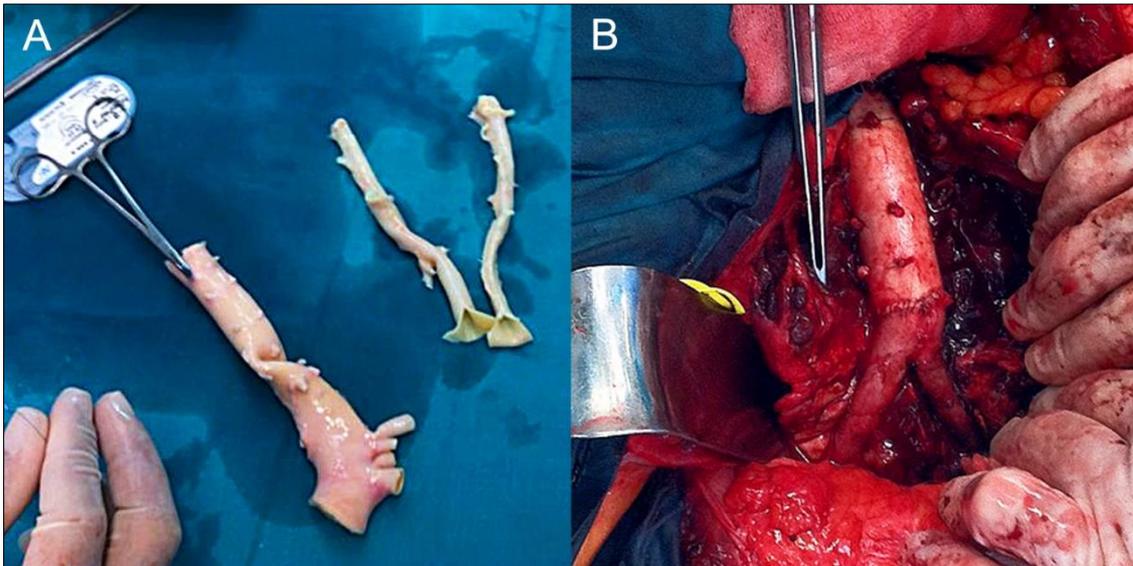


Figura 4. Sustitución de una endoprótesis sobreinfectada mediante tres arterias criopreservadas: una aorta torácica y dos iliacas (A), suturadas para conformar un aloinjerto bifurcado e implantado en posición infrarenal (B). Imágenes intraoperatorias de nuestro servicio de cirugía vascular en el Hospital Universitario Central de Asturias.

More y colaboradores ya publicaron en 1975 un estudio sobre la superioridad de los injertos biológicos (tanto autoinjertos como aloinjertos) frente al bypass de Dacron® en campos infectados, manteniendo su función como conductos vasculares y permitiendo el tratamiento erradicador de la infección en conjunción con la antibioterapia ⁴⁰. Se ha visto que, en este contexto infeccioso, las arterias criopreservadas son preferibles a las venas, ya que son capaces de tolerar mejor la presión sistémica de la aorta, además ser más resistentes a un fallo de la anastomosis ²⁹. Un estudio multicéntrico en los Estados Unidos, con 14 de los Hospitales de mayor volumen en dicho país y un total de 220 aloinjertos arteriales criopreservados en infecciones de injertos aórticos abdominales, arrojó una permeabilidad de estos bypasses del 97% a los 5 años, con una supervivencia del 75% al año y del 51% a los 5 años ⁴¹. En consecuencia, los autores concluyen que los aloinjertos de arteria criopreservada deberían ser considerados la primera línea de tratamiento en la infección aórtica.

Estos aceptables resultados, en una complicación que supone todo un reto para el cirujano vascular, se ven respaldados en una comparativa de los distintos estudios publicados desde el año 2000, que muestra alentadores porcentajes de reinfección y mortalidad (tabla 1) ⁴². Se ha modificado la Tabla para incluir nuestros resultados en el Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA). En dicho centro, entre los años 2006 y 2019, fueron tratadas 17 infecciones del sector aorto-iliaco mediante reconstrucción con arterias criopreservadas, presentando una latencia de 6 a 128 meses desde la cirugía inicial en las infecciones protésicas. Tres pacientes presentaron aneurismas micóticos, y en tres casos se asoció una fístula aorto-entérica. Se registró una reinfección y dos aloinjertos sufrieron degeneraciones aneurismáticas. Además,

un paciente fue exitus por una fístula entero-arteria criopreservada (el 5,8%). Estos resultados fueron presentados en el XVI congreso de la Sociedad Española de Bancos de Tejidos (Oviedo, 2019).

Outcomes of cryopreserved allograft implantation in aortic infections

Study	No. of patients	Mean follow-up (months)	Early mortality	Amputation	Reinfection	Graft-related complications	Graft-related mortality
HUCA (2019)	17	31	11.7%	0%	5.8%	35.2%	5.8%
Masabni et al. (2019)	15	18.5	6.7%	0%	6.7%	26.7%	0%
Ben Ahmed et al. (2018)	71	45	16.9%	1.4%	4.2%	18.3%	7%
Heo et al. (2017)	25	19.1	8%	—	0%	12%	0%
Harlander-Locke et al. (2014)	220	30	9%	—	4%	24%	—
Touma et al. (2014)	54	12.1	28%	1.9%	4%	19%	7%
Bisdas et al. (2011)	22	27	9%	—	0%	9%	0%
Bisdas et al. (2010)	57	36	8.8%	—	0%	5.3%	0%
Brown et al. (2009)	18	25	11.1%	0%	0%	11.1%	0%
Zhou et al. (2006)	42	12.5	16.7%	14.3%	0%	2.4%	0%
Noel et al. (2002)	56	5.3	18%	5%	2%	25%	4%
Vogt et al. (2002)	49	27	6%	0%	2%	16.3%	8.2%
Leseche et al. (2001)	28	35.4	17.8%	0%	0%	17%	17.8%
Verhelst et al. (2000)	90	36	17%	1%	1%	21.1%	11.1%

Tabla 1. Resultados de los estudios con aloinjertos criopreservados por infección aórtica de los últimos 20 años. Se incluyen nuestros resultados en el Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA). Modificado de Masabni et al (2019) ⁴².

La segunda ventaja de los aloinjertos criopreservados en virtud de su carácter biológico viene dada por sus mejores resultados de permeabilidad en comparación con los bypasses protésicos. Como hemos mencionado previamente, los injertos protésicos presentan un pobre rendimiento en posición infragenicular, especialmente en bypasses a troncos distales. Es precisamente en pacientes con cuadros de isquemia crítica, que asocian dolor en reposo y/o pérdida de tejido, y por tanto riesgo de amputación mayor, en los que el uso de aloinjertos vasculares estaría directamente indicado ante la necesidad de revascularización distal y ausencia de vena safena autóloga. A pesar de su supuesta superioridad con respecto al ePTFE en este sentido, los aloinjertos vasculares muestran a menudo tasas de permeabilidad decepcionantes a medio y largo plazo. En un estudio multicéntrico ²⁷ que recopiló 165 bypasses infrageniculares con arterias criopreservadas en hospitales de Marsella, Saint-Etienne y Grenoble, la permeabilidad primaria a 1,3 y 5 años fue de 48,7%, 34,9% y 16,1%, respectivamente, y la permeabilidad secundaria de 59,8%, 42,1% y 25,9%. Sin embargo, estos resultados contrastan con las tasas de salvamento de extremidad, del 83,8%, 76,4% y 74,2% a 1,3 y 5 años respectivamente. Hay que tener en cuenta que se trata de pacientes con isquemia crítica, que presentan un elevado riesgo de pérdida de la extremidad si siguen un tratamiento conservador.

Estas observaciones se repiten en las series descritas previamente, confirmando la discrepancia entre una pobre permeabilidad tardía y una

aceptable tasa de salvamento de extremidad. Albertini sugiere dos posibles explicaciones a este fenómeno ²⁷:

- a) El bypass permite ganar tiempo para el desarrollo de circulación colateral que pueda suplir de suficiente perfusión al miembro y, por lo tanto, revertir los síntomas cuando el injerto se trombose. Esta teoría podría ser especialmente válida en los pacientes con isquemia crítica y afectación tisular (estadios 5 y 6 de Rutherford), ya que mientras el trasplante vascular permanece permeable permitiría la cicatrización de la lesión o de la herida quirúrgica de una amputación menor, según corresponda, devolviendo al paciente a un estadio 3 una vez se trombose el bypass.
- b) Algunos pacientes se habrían curado, o el dolor en reposo habría remitido, incluso si la revascularización quirúrgica no se hubiera llevado a cabo. Esta explicación se fundamentaría en un error al valorar la indicación de intervención en los pacientes con isquemia crítica (estadios 4, 5 y 6 de Rutherford, tabla 2). Se entiende como isquemia crónica crítica de miembros inferiores a la situación de isquemia que pone en peligro la viabilidad de la extremidad, un concepto propuesto inicialmente en 1982 en un grupo de trabajo del Simposium Vascular Internacional ⁴³. Lo cierto es que en los últimos tiempos ha surgido importante controversia con respecto la definición actual de isquemia crítica, poniendo en entredicho la clasificación actual. Algunas voces han hecho una llamada a establecer una nueva definición que aúne conceptos clínicos y hemodinámicos. El objetivo es establecer una clasificación actualizada, basada en la evidencia a través de su validación empírica por medio de una cohorte prospectiva, que permita una mejor categorización de los pacientes en riesgo de pérdida de extremidad y que mejor podrían beneficiarse de una posible revascularización ⁴⁴.

CLASIFICACION FONTAINE		CLASIFICACION RUTHERFORD	
Estadio	Clínica	Estadio	Clínica
I	Asintomático	0	Asintomático
IIa	Claudicación leve (mayor a 200 metros)	1	Claudicación ligera
IIb	Claudicación moderada – severa (menor a 200 metros)	2	Claudicación moderada
		3	Claudicación severa
III	Dolor isquémico en reposo	4	Dolor isquémico en reposo
IV	Ulceración o gangrena	5	Perdida tisular menor
		6	Perdida tisular mayor

Tabla 2. Clasificaciones clínicas de la isquemia crónica de miembros inferiores (Fontaine y Rutherford). Enmarcados en rojo los estadios correspondientes a la isquemia crítica.

Existen diferencias en cuanto al uso de los aloinjertos criopreservados si tomamos como referencia los estudios publicados en Norteamérica y Europa. En los Estados Unidos, el origen de los conductos es mayoritariamente comercial, dependiente de empresas del sector sanitario que suministran los injertos criopreservados a demanda (CryoLife® Inc, Kennesaw, Georgia; y LifeNet Health®, Virginia Beach, Virginia, principalmente). Por un lado, el suministro comercial aumenta el tiempo en el que podemos tener disponible el bypass, en comparación con un banco de tejidos localizado en el mismo centro, ya que requiere de un tiempo mínimo para servir las peticiones y, por lo tanto, limita su empleo en caso de cirugía emergente. Por otro lado, la comercialización a través de compañías médicas hace que el precio por injerto sea mayor, a cambio de reducir la necesidad de complejos programas de trasplante, procesado y almacenamiento en cada centro, que requieren de un elevado consumo de medios técnicos y humanos. El coste de un aloinjerto obtenido a través de una casa comercial puede ir de los 1850 euros de una vena safena preservada en isquemia fría y obtenida de cirugía de varices mediante *stripping* (Bioprotec®, Lion, France)⁴⁵, a los 7000-7500 dólares de una vena safena criopreservada de donante cadáver (Criograft, CryoLife® Inc, Kennesaw, Georgia, USA)⁴⁶. Si el injerto se obtiene a través de un programa nacional, como el Etablissement Français du Sang (agencia gubernamental francesa responsable de la recogida de sangre y tejidos), una arteria criopreservada de origen cadavérico costaría 1600 euros²⁴.

A diferencia de Estados Unidos, en Europa y otros continentes la gran mayoría de los bypasses tiene su origen en bancos de tejidos situados en el propio centro, regionales (como el Banco de Sangre y Tejidos de Cataluña, en Barcelona), nacionales (como el National Cardiovascular Homograft Bank o NCHB, en Singapur, o el mencionado Etablissement Français du Sang en Francia) y supranacionales (como el European Homograft Bank o EHB, en Bruselas). Aunque existe alguna publicación sobre aloinjertos en isquemia fría de origen comercial (Bioprotec®, Lion, Francia)⁴⁵, ésta resulta anecdótica si la comparamos con las series norteamericanas de los últimos 13 años, en las que el origen del aloinjerto (tanto arterial como venoso) estuvo siempre en las empresas CryoLife® y LifeNet Health® (tabla 3).

Estudio	Aloinj.	Preserv.	Indicac.	Localiz.	País	Origen
Furlough et al, 2019 ⁴⁷	Arterial	Criopr.	Infección	Periférica	USA	CryoLife®

Guevara-Noriega et al, 2019 ⁴⁸	Arterial	Criop.	Isquemia	Periférica	España	BTC
Masmejan et al, 2019 ⁴⁹	Arterial	Criop.	Isquemia	Periférica	Suiza	EHB
Masabni et al, 2018 ⁴²	Arterial	Criop.	Infección	Aorto-iliaca	USA	CryoLife®
O'Banion et al, 2017 ⁵⁰	Venoso	Criop.	Isquemia	Periférica	USA	CryoLife®
Lejay et al, 2017 ⁵¹	Arterial	Criop.	Infección	Aórtica/Periférica	Francia	EHB/ BTB
Heo et al, 2017 ⁵²	Arterial	Criop.	Infección	Aorto-iliaca	Corea	SMB
Bossi et al, 2017 ⁵³	Arterial/Venoso	Criop.	Infección	Aórtica/Periférica	Italia	CCM
Lowampa et al, 2016 ⁵⁴	Arterial	Criop.	Infección	Aórtica/Periférica	Bélgica	EHB
Diamant et al, 2016 ⁵⁵	Arterial	Criop.	Isquem./Infección	Periférica	Uruguay	BTHP
Ziza et al, 2015 ⁴⁵	Venoso	Isquemia fría	Isquemia	Periférica	Francia	Bioprotec®
Chang et al, 2014 ⁴⁶	Venoso	Criop.	Isqemia	Periférica	USA	CryoLife®
Touma et al, 2014 ⁵⁶	Arterial	Criop.	Infección	Aorto-iliaca	Francia	BTSA
Harlander et al, 2014 ⁴¹	Arterial	Criop.	Infección	Aorto-iliaca	USA	CryoLife®
Zehr et al, 2011 ⁵⁷	Venoso	Criop.	Isquemia	Periférica	USA	CryoLife®
Randon et al, 2010 ⁵⁸	Venoso	Criop.	Isquemia	Periférica	Bélgica	BHUG
Matia et al, 2010 ⁵⁹	Arterial/Venoso	Isquemia fría	Isquemia	Periférica	Rep. Checa	BICEM
Bisdas et al, 2010 ⁶⁰	Arterial	Criop.	Infección	Aorto-iliaca	Alema.	DGFG

Bannazad. et al, 2008 ⁶¹	Venoso	Criop.	Isquemia	Periférica	USA	CryoLife®/ LifeNet Health®
--	--------	--------	----------	------------	-----	----------------------------------

Tabla 3. Recopilación de los estudios con las series de pacientes revascularizados mediante aloinjertos, criopreservados o en isquemia fría, y tanto arteriales como venosos, para el tratamiento de patología isquémica y/o infecciosa en los últimos 13 años. **Aloinj.:** Tipo de aloinjerto. **Preserv.:** Método de preservación. **Criop.:** criopreservación. **Localiz.:** Localización del injerto implantado. **USA:** United States of America. **Origen:** origen del aloinjerto (banco de tejidos, comercial...). **BTC:** Banco de Tejidos de Cataluña. **EHB:** European Homograft Bank. **BTB:** Besançon Medical Bank. **SMB:** Samsung Medical Bank. **CCM:** Centro Cardiológico Moncino. **BHP:** Banco de Tejidos del Hospital Pasteur. **BTSA:** Banco de Tejidos de Saint Antoine. **BHUG:** Banco del Hospital Universitario de Gante. **BICEM:** Banco del Institute for Clinical and Experimental Medicine. **DGFG:** Deutsche Gesellschaft für Gewebetransplantation (German Society for Tissue Transplantation)

Por otra parte, de las distintas publicaciones se puede inferir otra característica, además del distinto origen de los injertos. Si tomamos como referencia los estudios previos, en Europa el uso mayoritario fue de aloinjertos arteriales, mientras que en los Estados Unidos se encuentra más repartido entre arterias y venas, con mayoría de estas últimas. En los últimos 13 años solo encontramos dos publicaciones con aloinjertos venosos criopreservados fuera de Norteamérica^{53,58}, y una de ellas incluye tanto arterias como venas en su serie. Además de la obvia tradición en el uso de aloinjertos venosos en instituciones americanas, una de las razones podría estar en la dificultad para acceder de forma constante a donantes cadáver. Además del origen cadavérico, existe la opción de obtener tejido vascular a través de donante vivo, a partir de segmentos del sistema venoso superficial (venas safenas) obtenidos durante la cirugía de varices mediante la técnica de “stripping”^{45,62,63}. Por otro lado, muchas publicaciones ni siquiera especifican el origen del injerto venoso, con lo que no es posible saber la naturaleza del mismo. Aunque la vena se examina y se descartan aquellos tramos dilatados e incompetentes, parecería lógico que, si la insuficiencia venosa representa una de las posibles causas para descartar la safena autóloga como bypass, su uso como aloinjerto genere dudas razonables. Además, hay que tener en cuenta que la maniobra de fleboextracción mediante “stripping” es, de por sí, inevitablemente traumática para el vaso, lo que no ayuda a despejar las dudas sobre su uso en cuanto a la aparición posterior de degeneraciones aneurismáticas.

Lo cierto es que, aunque los aloinjertos criopreservados de origen venoso siguen siendo de uso común en muchos centros, un metanálisis de Albers y colaboradores⁶⁴ comparando los estudios entre 1982 y 2003 sobre distintos tipos de aloinjertos en bypasses infrapoplíteos demostró que los mejores resultados en cuanto a salvamento de la extremidad se obtenían con arterias criopreservadas, seguidas de las venas criopreservadas y las venas de cordón umbilical. Por su parte, los aloinjertos vasculares en fresco presentaban la mejor permeabilidad a los 4 años, seguidos por las arterias criopreservadas, las venas de cordón umbilical y las venas criopreservadas, en ese orden. No obstante, los trasplantes vasculares en fresco eran responsables de los peores resultados con respecto a salvamento de la extremidad.

También cabe señalar que los aloinjertos vasculares no se emplean únicamente en la revascularización arterial periférica y en las infecciones de arteria nativa e injerto protésico, aunque sean esas las principales indicaciones en nuestro estudio. Se han usado con éxito en las fístulas arteriovenosas para acceso de hemodiálisis en ausencia de venas nativas válidas, en implante de válvulas cardíacas con y sin conducto vascular asociado (injerto valvulado) y en la reconstrucción arterial y venosa tras resección de tumores intratorácicos ⁶⁵.

Como ya hemos mencionado, una de las principales limitaciones de los aloinjertos vasculares criopreservados es su tendencia a presentar degeneraciones aneurismáticas. Su aparición condiciona el posible fracaso del bypass, al aumentar el riesgo de trombosis y de rotura directa del injerto trasplantado. El porcentaje de degeneraciones referido en las series publicadas en los últimos 10 años de bypasses criopreservados llevados a cabo exclusivamente en la revascularización de miembros inferiores, tanto por isquemia crítica como por infección, abarca del 2,38% de Masmejan y su equipo en Suiza ⁴⁹ al 25% de los bypasses periféricos en la serie de Lejay en Francia ⁵¹. Los resultados de este último estudio llaman la atención, sobre todo si tenemos en cuenta que ninguna otra serie en ese tiempo ha superado el 5,4% de degeneraciones aneurismáticas en bypasses infrageniculares y que, además de esas siete degeneraciones, otros dos pacientes de los 28 sufrieron rotura espontánea del injerto.

Tradicionalmente se han considerado dos posibles causas para explicar esta elevada tasa de aneurismas en aloinjertos criopreservados. La primera está relacionada con el proceso de extracción, criogenización, descongelación y posterior manipulación durante su preparación para el implante. Se trataría, por tanto, de un daño mecánico y también físico, dadas las alteraciones que puede sufrir el tejido al ser sometido a muy bajas temperaturas, para posteriormente realizar el proceso inverso de calentamiento hasta volver a alcanzar la temperatura ambiente. La segunda causa estaría en relación con la reacción inmunológica del huésped frente al injerto vascular en su condición de trasplante a pesar de la importante pérdida celular, con la particularidad de no tratarse de un órgano sólido y siendo, por lo tanto, más resistente a una respuesta inmune.

CRIOPRESERVACIÓN DE TEJIDOS VASCULARES

La criopreservación se realiza mediante la reducción progresiva de la temperatura del injerto en un medio crioprotector hasta alcanzar temperaturas muy inferiores al punto de congelación. En algún momento de este proceso se produce la formación de masas de hielo que contienen agua pura cristalina. Lo que permanece entre las masas de hielo en crecimiento es lo que se denomina fracción no congelada, en la que están confinadas todas las células y todos los solutos. La concentración de sales, azúcares y medio crioprotector aumenta a la par que disminuye el volumen de la fracción no congelada. Este incremento

de las fuerzas osmóticas causa un flujo de H₂O desde las células (figura 5). Una velocidad de congelación lenta es necesaria para permitir un flujo suficiente que minimice la posibilidad de formar hielo intracelular. A medida que la temperatura sigue bajando, la viscosidad de la fracción no congelada se hace demasiado alta como para que siga teniendo lugar la cristalización, convirtiéndose el resto de la misma en un sólido amorfo que no contiene cristales de hielo ⁶⁶.

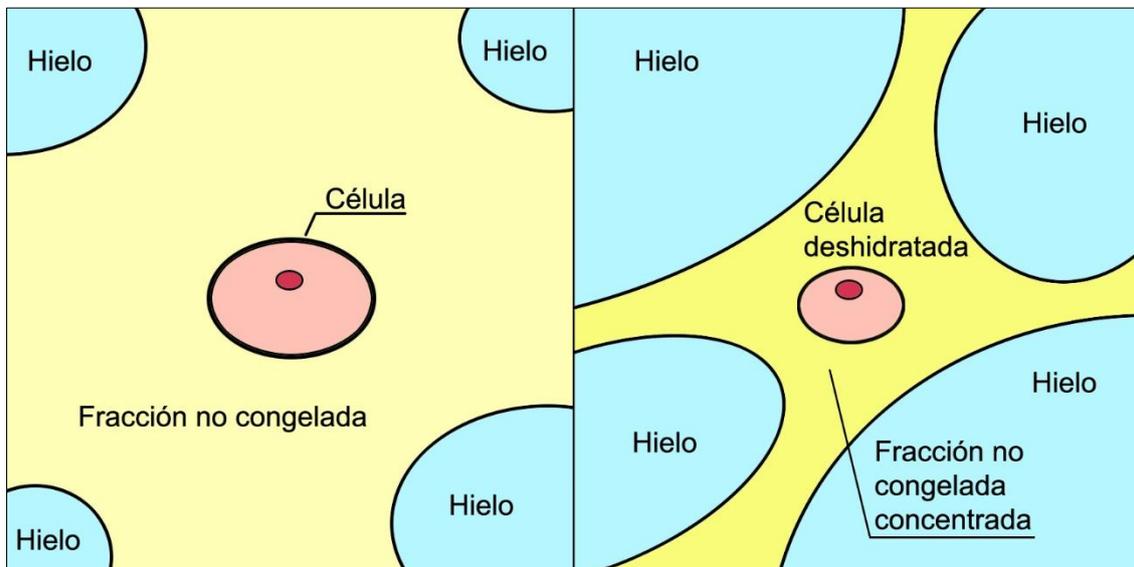


Figura 5. Descripción gráfica del mecanismo de criogenización. A medida que desciende la temperatura y aumenta la masa de hielo, la fracción libre se concentra y la célula se deshidrata por la diferente osmolaridad. Modificada de Han et al ⁶⁷.

Los pequeños cristales de hielo presentan un punto de congelación inferior al de las masas más grande. La formación espontánea de hielo ocurrirá después de que la solución sea enfriada a una temperatura de entre -5 y -15 °C. Para evitar el daño celular causado por el enfriamiento o recalentamiento se intenta variar la temperatura lo más paulatinamente posible. Si el medio de criopreservación únicamente contiene sales, la concentración de electrolitos en la fracción no congelada alcanzará niveles muy altos a medida que la temperatura desciende. De ahí que se empleen crioprotectores como medio de criogenización, consistentes principalmente en soluciones que contienen una gran proporción de solutos no electrolíticos ⁶⁶.

Por otro lado, el hielo extracelular, que resulta inocuo en una suspensión celular, puede dañar directamente la estructura de un tejido al congelar éste. Tanto es así, que los tejidos con una disposición densamente compacta de células, como por ejemplo una arteria, tienen mayor probabilidad de resultar dañados por el estrés mecánico de la criopreservación que los tejidos con una disposición celular menos compacta, como las venas ⁶⁸.

La mejora en los protocolos de criogenización, en forma de regulación de las pautas enfriamiento/ descongelación y el uso de nuevos medios

crioprotectores, supuso un gran avance en el procesamiento de los aloinjertos vasculares criopreservados. De esta forma se redujo el daño tisular y con ello el porcentaje de fracasos en estos bypasses. Se realizaron experimentos con diferentes tipos de medios crioprotectores: polietilenglicol, glicerol, dimetil sulfóxido (DMSO)... Los mejores resultados en cuanto a conservación de la función contráctil post descongelación se obtuvieron con DMSO ⁶⁹, que actualmente es el medio más usado en la criopreservación de tejidos vasculares. Además, se comprobó que el tiempo de almacenamiento en ese estado no alteraba las propiedades antitrombóticas ni estructurales, manteniendo la viabilidad celular de la pared vascular ⁷⁰⁻⁷². A pesar de ello, este proceso conlleva la pérdida parcial tanto de la contractilidad del músculo liso como de la funcionalidad del endotelio, que es un regulador clave de la homeostasis de los vasos ⁷³. Esta pérdida de contractilidad está provocada por el daño irreversible de un número significativo de células musculares lisas como resultado del proceso de criopreservación, siendo éstas las más afectadas de la pared arterial ⁷⁴. Como veremos más adelante, este hecho se objetiva posteriormente al observarse una pérdida muy importante de este tipo de células en los aloinjertos criopreservados al poco de ser implantados.

El protocolo de descongelación resulta igualmente clave, ya que es fundamental controlar la velocidad a la que se aumenta la temperatura del injerto para conseguir su vuelta a la temperatura ambiente desde su estado previo de congelación. Un rápido aumento de la temperatura conlleva daños estructurales en forma de pérdida de endotelio y corrugaciones longitudinales en la dirección del flujo sanguíneo causadas por la contracción de células musculares lisas en la túnica media (figura 6), con fractura de la capa subendotelial ⁷⁵⁻⁷⁷.

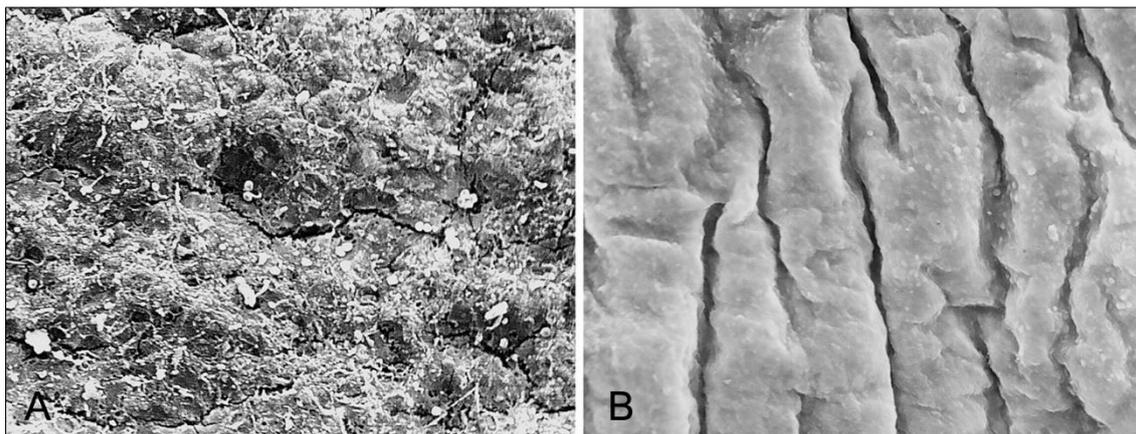


Figura 6. Microscopía electrónica de la pared de la raíz aórtica tras descongelación. **A:** Descongelación a temperatura ambiente de 23 °C. Pérdida de endotelio, exponiendo la lámina basal, con daño de las capas subendoteliales en forma de defectos circulares y microfracturas (Aumento: x560). **B:** Descongelación al baño María de 37°C. Corrugaciones longitudinales en la dirección del flujo sanguíneo provocadas por la contracción de las células musculares lisas de la túnica media (Aumento: x520). Imágenes obtenidas de Novotny et al (2017) ⁷⁶.

Además de preservar los tejidos por medio de la criopreservación, existe otra variante conocida como vitrificación. El término hacer referencia a la transformación de líquido en un sólido en ausencia de cristalización, por lo que también se la denomina *criopreservación libre de hielo* o *ice-free cryopreservation*. Los métodos de vitrificación requieren el uso de un medio con una gran concentración de solutos. De esta forma, el hielo no llega a formarse en ninguna parte de la muestra, por lo que no se requiere un enfriamiento gradual, sino que incluso puede ser beneficioso un rápido descenso de la temperatura. Los tejidos sometidos a este proceso también pueden verse dañados por el shock térmico, pero la temperatura baja tan rápido que alcanzan el estado de vitrificación antes de ser afectados. Sin embargo, las altas concentraciones necesarias de agente crioprotector pueden dañar por sí mismas el injerto por los abruptos cambios osmóticos o la toxicidad química ⁶⁶. Se han realizado estudios sobre la viabilidad de este método de preservación en tejidos vasculares, con resultados que confirman el mantenimiento de las características viscoelásticas del vaso y su buena respuesta in vivo en modelos animales ⁷⁸⁻⁸⁰, a pesar de una menor viabilidad celular en comparación con la criopreservación por congelación ⁸¹. Actualmente, la vitrificación como técnica preservación de injertos vasculares no se ha popularizado.

El protocolo de criopreservación más comúnmente utilizado hoy en día emplea DMSO como medio crioprotector, con un congelador biológico programable que permita una reducción controlada de la temperatura del injerto. La introducción y mejora de estos protocolos por el Banco de tejidos humanos del Centro Comunitario de Sangre y Tejidos de Asturias adscrito a nuestro centro (figura 7) nos permitió erradicar los fracasos hiperagudos que se observaban en los aloinjertos implantados hace décadas, cuando era habitual objetivar roturas del bypass a las pocas horas o días del implante. Por otro lado, la estandarización de los procedimientos de procesado y conservación de los tejidos vasculares permite hacer más fácil las comparaciones entre distintos estudios, aunque como ya hemos visto previamente, alguna serie pueda ofrecer resultados que se salen de la horquilla y hagan pensar en algún problema en el tratamiento de los injertos ⁵⁹.



Figura 7. Instalaciones del banco de tejidos humanos en el Centro Comunitario de Sangre y Tejidos de Asturias (Oviedo, España)

RESPUESTA INMUNOLÓGICA

Si una posible causa para la degeneración de estos aloinjertos podía estar en relación con el proceso de criopreservación/descongelación, la otra hacía referencia a los factores inmunológicos que entran en juego desde el momento en que se realiza un trasplante de tejido vascular entre dos individuos genotípicamente diferentes.

Aunque en el trasplante de órganos sólidos los anticuerpos generados frente a antígenos HLA del donante son responsables del rechazo agudo e hiperagudo que puede verse en algunos de estos pacientes ⁸²⁻⁸⁴, en los trasplantes vasculares siempre ha existido controversia sobre la antigenicidad de los aloinjertos criopreservados y en la significación clínica de los anticuerpos formados frente a estos tejidos. En general perdura el concepto de que los injertos arteriales y venosos son escasamente antigénicos, y por tanto no se requiere compatibilidad entre grupos sanguíneos ABO ni fenotipos de HLA. A diferencia de los cambios histológicos postrasplante, existen escasas publicaciones que hayan estudiado en humanos la reacción inmunológica generada por estos tejidos desde el punto de vista de los anticuerpos formados específicamente frente al donante.

Hasta donde sabemos, solamente tres grupos de trabajo han presentado estudios demostrando la sensibilización específica de aloinjertos vasculares en receptores humanos, más allá de la medición cuantitativa de la reacción inmunológica post implante, aunque sí existe algún artículo que muestra evidencia de anticuerpos donante específicos en el trasplante de válvulas cardíacas ⁸⁵.

El equipo de Mirelli ha publicado hasta la fecha tres trabajos (1998, 1999 y 2005 ⁸⁶⁻⁸⁸) sobre trasplantes arteriales en el sector aorto-iliaco por infección protésica. Los injertos empleados fueron en fresco, incluyendo un grupo de 7 arterias criopreservadas en la última serie (el 20%). En el primer estudio, con 5 pacientes, el seguimiento fue de 12 meses, mientras que en los estudios sucesivos, con 10 y 30 pacientes, el seguimiento fue de 24 y 48 meses respectivamente. En todos los casos se mantuvo compatibilidad ABO entre el donante y el receptor. Se objetivó la formación de anticuerpos IgG dirigidos contra antígenos HLA específicos del donante, que se detectaban un mes después del trasplante, si bien reconocen que la repercusión clínica de estos anticuerpos anti-HLA es desconocida. No se observaron diferencias en cuanto a la formación de anticuerpos entre los aloinjertos frescos y criopreservados.

Balzer y colaboradores ⁸⁹, por su parte, publicaron en 2004 un estudio con 10 pacientes con patología isquémica periférica a los que se les realizó trasplante venoso en fresco de origen cadavérico (no criopreservado). No se comprobó la compatibilidad ABO y en todos los casos menos uno se administró una dosis baja de ciclosporina. A 10 de estos pacientes se les realizó un estudio de anticuerpos anti-HLA tipo I y II mediante una única muestra de suero extraída una media de 849 días tras el implante (rango 28-1780 días). Los resultados mostraron tanto la presencia de anticuerpos anti-HLA IgG tipo I como tipo II que

eran específicos para antígenos HLA del donante en 9 de los 10 pacientes (siete de nueve pacientes presentaban anti-HLA tipo I y ocho de nueve anti-HLA tipo II). El único paciente que no presentó aloanticuerpos había sufrido trombosis de los injertos a los 3 y 4 días respectivamente, con posterior amputación del miembro. Tampoco el tratamiento con ciclosporina impidió la formación de anticuerpos. La limitación más importante de este estudio, además del tamaño de la muestra, se encuentra en que el análisis se realizó en un único corte transversal, con un tiempo de extracción de la muestra es también muy heterogéneo, por lo que no pueden sacarse conclusiones sobre la evolución en el tiempo de la formación de anticuerpos. Además, no se incluyeron aloinjertos criopreservados en la muestra.

Finalmente, el estudio más completo sobre la especificidad de los anticuerpos generados tras trasplante arterial lo publicó Konrad y su equipo en 2017⁹⁰, cuando nuestra propia investigación ya se había iniciado. En él se siguieron 40 aloinjertos frescos y 4 criopreservados implantados por infección de prótesis vascular previa, y en los que no se había mantenido compatibilidad ABO. Se llevó a cabo un único control serológico entre los 10 y los 13 meses post implante, observándose la formación de anticuerpos específicos frente a HLA del donante en 42 pacientes. En dos casos no se objetivó inmunización anti-HLA ni anticuerpos específicos, probablemente en relación con una importante compatibilidad entre donante y receptor. En un único caso no se observó dicha especificidad ni se encontró causa para la ausencia de la misma, por lo que los autores sugieren la posibilidad de un fallo en la sonda de detección de anticuerpos

Además, se llevó a cabo el explante de 15 aloinjertos, descartando los seis casos que fueron amputados por mala evolución de su infección al considerar que los procesos inflamatorios podrían alterar las consecuencias del proceso inmunológico concomitante. Se analizaron, por tanto, los 9 bypasses restantes que habían sido escindidos tras presentar trombosis. Ninguna arteria había presentado degeneración aneurismática. Los tres bypasses explantados más prontamente (a los 14, 15 y 45 días de la intervención) no presentaban hallazgos patológicos significativos, aunque sí un infiltrado linfocitario indicativo de un proceso inflamatorio subyacente, también presente en los injertos extraídos posteriormente en un rango de tiempo que va de los 8 a los 96 meses de la cirugía. Los resultados anatomopatológicos en este último grupo consistían en un aumento del colágeno, el tejido conectivo y las fibras elásticas de la adventicia, una pérdida de células musculares lisas en la túnica media y la hiperplasia de la íntima.

Esta última investigación resulta muy interesante no sólo porque aumenta el tamaño muestral y el tiempo de seguimiento en comparación con estudios previos, sino también porque intenta encontrar una conexión entre los hallazgos histológicos en el tejido y la respuesta inmunológica en el suero del paciente. Nuevamente, el hecho de realizar un único análisis para comprobar la formación de anticuerpos impide comprobar las posibles variaciones del perfil de anticuerpos en el tiempo. También el escaso número de arterias

criopreservadas incluidas en el estudio (4 bypasses) dificulta poder obtener conclusiones definitivas sobre la respuesta inmunológica y sus consecuencias en este tipo de aloinjertos. Por último, ni Konrad, ni Mirelli ni Balzer incluyeron a pacientes con degeneración aneurismática en sus series, lo que habría sido muy interesante para poder comprobar las características inmunohistológicas de este grupo de aloinjertos.

Es importante diferenciar entre aloinjertos frescos (conservados en medio de preservación al 4% en isquemia fría, por encima del punto de congelación) y criopreservados ya que, aunque algunos autores no encuentran diferencias significativas en la respuesta inmune generado por ambos tipos de trasplante vascular ^{91,92}, otros grupos han presentado resultados que justifican que el proceso de criopreservación disminuye la inmunogenicidad de estos bypasses ^{93,94}. Rodríguez y colaboradores ⁹⁵, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Alcalá, comprobaron que el proceso de remodelado arterial en aloinjertos frescos y criopreservados en un modelo animal fue similar, si bien los segundos inducían una respuesta inmune significativamente menor en todos los tiempos de seguimiento. Este concepto se tratará en profundidad en el apartado sobre aloantigenicidad de las arterias criopreservadas.

COMPATIBILIDAD ABO Y RHESUS

Al igual que en los trasplantes de órganos sólidos, también en los aloinjertos vasculares ha surgido la cuestión de si el grupo ABO y la compatibilidad Rhesus podrían jugar un papel en las complicaciones de estos bypasses. Se ha demostrado que los aloinjertos arteriales criopreservados expresan antígenos de los grupos sanguíneos A y B en la superficie endotelial de los *vasa vasorum* de la adventicia y la media ⁹⁶. Por otro lado, es sabido que el trasplante cardíaco de donante ABO y Rhesus compatible ofrece mejores resultados, siendo uno de los parámetros considerados necesarios, junto con la concordancia de tamaño entre donante y receptor ⁹⁷. La necesidad de respetar el grupo sanguíneo y el Rh en aloinjertos vasculares y válvulas cardíacas, sin embargo, no ha demostrado claramente los mismos beneficios. Los resultados del estudio de Albertini y colaboradores no describieron diferencias en términos de permeabilidad y degradación aneurismática en aloinjertos arteriales ²⁷. Otros equipos tampoco han observado diferencias en trasplantes con aloinjertos venosos ⁵⁷. En el estudio más completo sobre compatibilidad ABO y Rhesus en aloinjertos arteriales criopreservados, Schiava y su grupo ⁹⁸ no encontraron relación entre la incompatibilidad ABO y la degeneración de las arterias criopreservadas, sugiriendo que la compatibilidad HLA sería mucho más interesante de cara a evitar el rechazo inmunológico. Sin embargo, reconoce que alcanzar ese nivel de correlación resulta muy difícil, teniendo en cuenta el limitado stock de los bancos de tejidos, y técnicamente imposible en la cirugía urgente.

No obstante, no todos los resultados son igual de unánimes en estas conclusiones. Bisdas presentó idénticos hallazgos de permeabilidad y degeneración, si bien su serie mostraba un incremento mayor de proteína C reactiva (PCR) estadísticamente significativa en el grupo sin compatibilidad, lo que podría sugerir una reacción antigénica temprana que luego no se traducía en efectos clínicos ⁹⁹. Como ya hemos mencionado, se ha visto que los aloinjertos criopreservados de arterias pulmonares expresan antígenos del grupo sanguíneo A y B en el endotelio de los *vasa vasorum* de las capas adventicia y media ⁹⁶, con un significado clínico incierto. Zehr y colaboradores ⁵⁷ sí van un paso más allá y sugieren en su estudio que los casos con compatibilidad ABO entre donante y receptor presentan unas tasas de salvamento de extremidad significativamente mejores en pacientes con aloinjertos cadavéricos criopreservados de vena safena interna. Sin embargo, no hemos encontrado otros artículos que corroboren estos resultados.

A pesar de la controversia, hoy en día se acepta que la compatibilidad ABO/Rhesus en aloinjertos vasculares no aporta beneficios significativos, y por tanto no se encuentra dentro de los requisitos estándar de este tipo de trasplantes en la mayoría de grupos de trabajo.

TRATAMIENTO INMUNOSUPRESOR

Con el objetivo de limitar la reacción inmunológica frente al aloinjerto en los trasplantes vasculares se estudió el efecto del tratamiento inmunosupresor en estos pacientes. Si tanto los vasos en fresco como criopreservados generan anticuerpos específicos frente a antígenos de histocompatibilidad HLA tipo I y HLA tipo II, sería de suponer que la administración de inmunosupresores afectaría la respuesta de rechazo por parte del receptor. Se ha objetivado en modelos animales que la administración de dosis bajas de Tacrolimus, incluso iniciada 7 días después del implante de injertos aórticos o venas ilio-femorales en fresco, suprime la producción de anticuerpos anti-HLA tipo I y II en los controles a los 14 y 30 días ^{100,101}. Este modelo fue aplicado posteriormente en aloinjertos de aorta criopreservados, con idénticos resultados ¹⁰². A nivel histológico, Tacrolimus también ha sido capaz de inhibir la hiperplasia neointimal en el trasplante venoso en fresco en ratas ¹⁰³.

El primer estudio de inmunosupresión en humanos fue realizado en Lisboa por Dinis de Gama y su equipo en 1994 ¹⁰⁴. En su serie de 13 injertos arteriales criopreservados todos los pacientes se encontraban a tratamiento con Ciclosporina, Azatioprina y Prednisona como resultado de un trasplante de riñón previo. Sus conclusiones fueron que la inmunosupresión modifica el comportamiento clínico de los aloinjertos arteriales, con buena tolerancia, sin rechazos agudos ni repercusión en los riñones trasplantados. La mayor limitación de este estudio es que sólo registra la evolución clínica, con una media de seguimiento de 20 meses, por lo que es difícil de sacar conclusiones definitivas.

Mirelli y su equipo también usaron inmunosupresores en 10 de sus 30 pacientes con infecciones protésicas y a los que se les implantaron aloinjertos arteriales en fresco y criopreservados⁸⁸. El fármaco empleado fue la Ciclosporina intravenosa a dosis de 1 a 3 mg/Kg/día. Al alta se instauró tratamiento oral para mantener niveles en sangre entre 100 y 200 µg/mL. Al igual que lo observado entre ambos tipos de injerto, no se identificaron diferencias en la evolución clínica entre el grupo con tratamiento inmunosupresor y el que no, si bien en los pacientes con Ciclosporina la formación de anticuerpos fue menos pronunciada y con mayor retraso (figura 8).

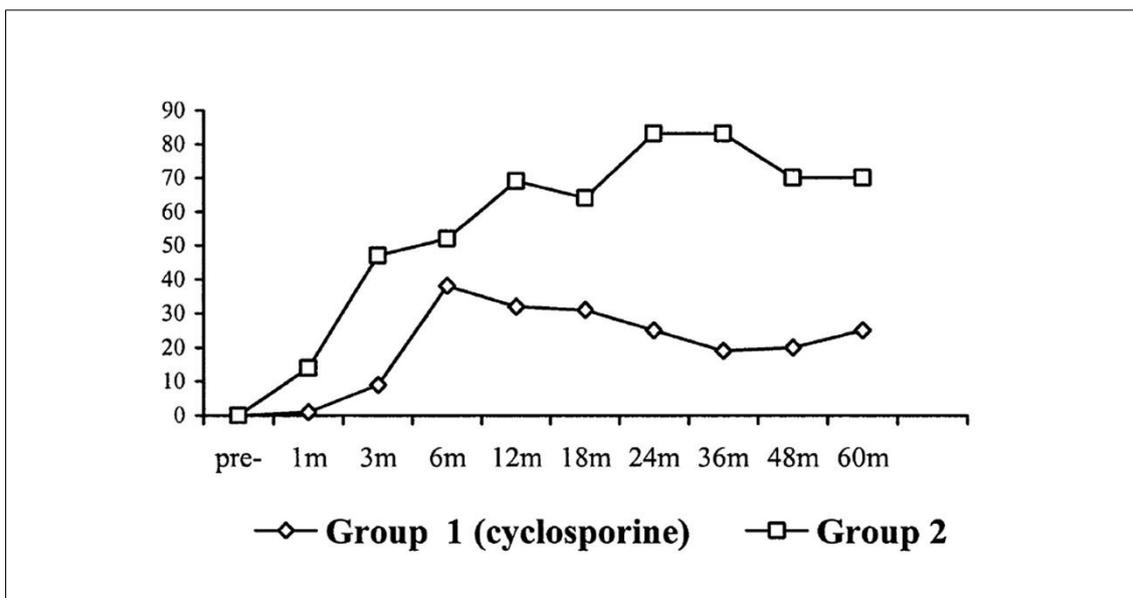


Figura 8. Valores promedio de la producción de anticuerpos anti-HLA pre y post implante del aloinjerto arterial. En el grupo 1, los pacientes tratados con ciclosporina y en el grupo 2, los que no recibieron tratamiento inmunosupresor. Obtenido de Mirelli et al (2005)⁸⁸.

En el estudio de Konrad y colaboradores, también mencionado previamente en el apartado de Respuesta Inmunológica, el tratamiento con dosis bajas de Sirolimus (la diana en mamíferos del receptor de la Rapamicina) no ofreció ninguna diferencia en el rechazo de los aloinjertos arteriales criopreservados en humanos⁹⁰. Sí es cierto que la publicación no especificaba la dosis, el tiempo de aplicación y o la concentración en sangre de este protocolo de inmunosupresión.

En resumen, la inmunosupresión en humanos, a diferencia de lo observado en experimentos animales, no inhibe completamente la formación de anticuerpos frente al injerto arterial, pero es capaz de atenuar su intensidad y duración, por lo que daría la oportunidad a la pared arterial de regenerar y repararse frente a la agresión inmunológica, y por tanto mejorar su comportamiento biológico¹⁰⁴. Sin embargo, estas supuestas ventajas en cuanto a comportamiento de los

bypasses no han quedado claramente demostradas, por lo que requerirían de estudios más completos, con mayores muestras y a más largo plazo, para poder valorar correctamente sus ventajas.

Independientemente de los posibles beneficios de la inmunosupresión, hay que tener en cuenta que la población diana de muchos trasplantes vasculares incluye a pacientes con infección subyacente de prótesis vascular o arteria nativa. Se desconoce el efecto de este tipo de fármacos en esa situación, por lo que existen sospechas de que puedan perjudicar la evolución del cuadro infeccioso e incrementar la morbilidad vascular. Por tanto, en el momento actual no resulta viable tratar de forma sistemática el posible rechazo inmunológico, ya que la compatibilidad ABO no ha mostrado beneficios claros, la compatibilidad HLA sería una opción recomendable pero el limitado stock de este tipo de injertos hace inviable en la práctica la medida, y el tratamiento inmunosupresor no puede recomendarse de forma sistemática ⁹⁸.

INMUNOLOGÍA DE LAS ARTERIAS CRIOPRESERVADAS

El uso de aloinjertos arteriales criopreservados presenta una serie de características que lo hacen especialmente interesante desde el punto de vista inmunológico. Por un lado, se trata de un trasplante alogénico, que tiene lugar entre individuos no HLA-idénticos. Como hemos visto, a diferencia de lo que ocurre en órganos sólidos el uso de inmunosupresores no se ha generalizado en estos injertos, por lo que en términos generales se trata de una respuesta inmune virgen, no modulada, y por tanto de gran interés para estudiar la formación de anticuerpos frente a tejido HLA-no compatible. Por otro lado, se ha comprobado que el rechazo que generan los trasplantes vasculares no es agudo, sino crónico. Incluso en el caso del implante de nuevos aloinjertos criopreservados, la respuesta inmunológica no lleva a un rechazo hiperagudo. A pesar de ello, son frecuentes las degeneraciones aneurismáticas sobre un tejido que además está sometido a la tensión arterial y la pulsatilidad del propio sistema circulatorio.

El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) fue descubierto por Jean Dausset en 1958 durante el estudio de trasplantes en ratones. Su trabajo en este campo a lo largo de los siguientes años, así como el de Baruj Benacerraf y George Davis Snell, les valió el premio Nobel de Medicina en 1980. El MHC está presente en todas las especies de vertebrados estudiadas, y es uno de los sistemas genéticos más polimórficos conocidos en la naturaleza. El MHC humano es conocido como el locus HLA (antígeno leucocitario humano) y está localizado en el brazo corto del cromosoma 6 (figura 9). Es una colección de más de 200 genes relevantes para las funciones inmunológicas, y se engloban en tres categorías o clases ¹⁰⁵:

Los genes HLA de clase I son los que se encuentran más próximos al telómero. Codifican, entre otros, a los antígenos de clase Ia o clásicos (HLA-A, HLA-B y HLA-C), que son los más expresados en la naturaleza y están presentes en casi todas las células nucleadas, si bien el nivel de expresión varía según el tejido. Constituyen los actores principales en el teatro inmunológico. Las

moléculas HLA de clase I presentan antígenos procedentes del catabolismo endógeno a las células T CD8+ o citotóxicas.

En la zona más próxima al centrómero se localizan los genes HLA de clase II. Son los responsables de codificar los antígenos de clase II (HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP), además de otras proteínas implicadas en el procesamiento y la presentación de antígenos. Las moléculas HLA de clase II presentan péptidos captados por vía endosomal a las células T CD4+ o colaboradoras que, fundamentalmente, se expresan en las células presentadoras de antígenos profesionales ¹⁰⁶, si bien en otros linajes celulares, como el endotelio vascular, su expresión puede verse inducida en un contexto inflamatorio ¹⁰⁷.

Entre ambas regiones se localizan los genes de clase III, responsables de formar proteínas no antígeno (proteínas del sistema de complemento, enzimas, citocinas...).

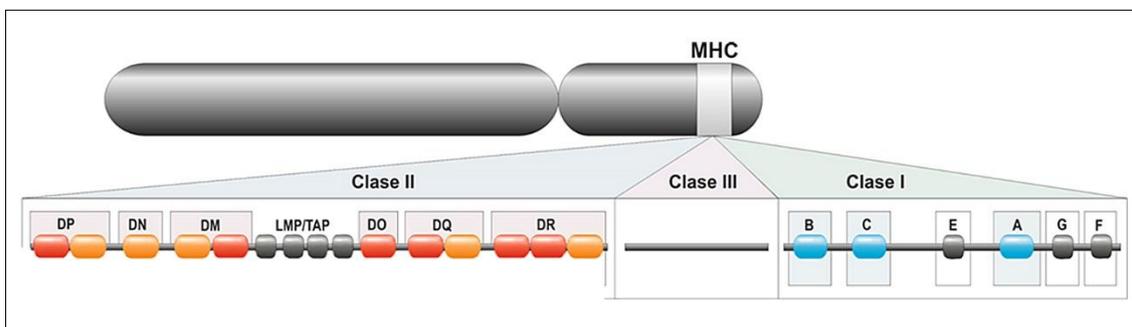


Figura 9. Mapa genético del complejo principal de histocompatibilidad humano (sistema HLA), en el brazo corto del cromosoma 6. Reproducido de Regueiro J.R. et al (2011) ¹⁰⁸.

El polimorfismo del MHC condiciona una extraordinaria variabilidad de HLA, lo que permite una adecuada respuesta inmunológica frente a las agresiones externas, pero que también constituye la base molecular del rechazo al injerto trasplantado. Al percibir el sistema inmune del receptor las diferencias HLA del donante, se desencadena una serie de reacciones inmunológicas cuyo objetivo último es la destrucción del aloinjerto. Los anticuerpos anti-HLA se dirigen específicamente frente a los antígenos leucocitarios humanos como respuesta a una exposición a antígenos HLA alogénicos. Dichos anticuerpos pueden encontrarse ya preformados en el momento del trasplante, por causa de un embarazo, transfusión sanguínea o trasplante previos, o bien desarrollarse *de novo* tras el mismo. No obstante, se ha descrito que estos anticuerpos también pueden aparecer de forma espontánea por fenómenos de sensibilización cruzada durante el curso de una infección o tras procesos inflamatorios (los anticuerpos anti-HLA pueden ser únicos para un alelo específico o grupo de alelos, o reconocer un epítipo que es compartido por más de una molécula HLA, con el resultado de reactividad cruzada) ¹⁰⁹.

La presencia de anticuerpos anti-HLA del donante preformados está directamente relacionada con fenómenos de rechazo y el fallo prematuro del

injerto, siendo capaces de activar la cascada del complemento y/o la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos, provocando daño endotelial. El complemento representa la principal vía de daño y su activación tiene un papel destacado en la fisiopatología subyacente de la fisiopatológica del rechazo mediado por anticuerpos, por lo que la determinación de éstos es una práctica habitual en los trasplantes de órgano ¹¹⁰.

Por otro lado, la formación de anticuerpos *de novo* frente a los antígenos HLA del trasplante juega a su vez un papel clave en la evolución del injerto, ya que condicionan fenómenos de rechazo y es responsable de una importante reducción de la supervivencia del trasplante ¹¹¹. Estos anticuerpos están dirigidos preferentemente frente a antígenos HLA de clase II (DR y DQ), y su formación puede tener lugar tanto en los primeros 6 meses como años después del implante, siendo la no adherencia al tratamiento uno de los principales factores de su formación ¹¹¹. Además, el ambiente inflamatorio secundario a fenómenos de rechazo celular temprano, infecciones o a procesos quirúrgicos y traumatismos parece favorecer el desarrollo ulterior de estos anticuerpos ¹¹².

No obstante, una parte importante de los fenómenos de rechazo humoral descritos, especialmente los asociados a daño inmunológico crónico, pueden cursar sin evidencia de actividad del complemento. La principal hipótesis plantea que las células natural killer (NK) son capaces de unirse a los anticuerpos anclados sobre los HLA endoteliales del aloinjerto ¹¹³. Esta unión NK-antígenos HLA del donante induciría la liberación de citocinas proinflamatorias (INF- γ y TNF) y activaría su capacidad citotóxica. Finalmente, los anticuerpos HLA del donante, también pueden activar el endotelio vascular per se, y con ello la proliferación celular, clave en la patogénesis del rechazo crónico. Al contrario de lo que ocurre en la activación de la cascada del complemento, que causa predominantemente la lisis de las células endoteliales, la activación directa del endotelio por anticuerpos está dominada por daño subléptico endotelial y modificación estructural de la microcirculación. Histológicamente, estos cambios se manifiestan como una proliferación de las células endoteliales y/o el engrosamiento, duplicación y multilaminación de la membrana basal del glomérulo y los capilares peritubulares en el trasplante renal ¹¹⁴.

En la actualidad, el rechazo crónico mediado por anticuerpos se considera un proceso patológico continuo con diferentes grados de severidad, que comienza en algún momento tras el trasplante y se mantiene en el tiempo con distintos niveles de intensidad, provocando un daño sostenido en el aloinjerto que puede llevar a su pérdida de función. Las lesiones vasculares crónicas son la característica principal de este tipo de rechazo en todos los trasplantes de órgano sólido, aunque las manifestaciones y terminología varían según el tipo de órgano, desde la vasculopatía arterioesclerótica de los aloinjertos cardiacos a la fibrosis intimal de arterias y venas en el trasplante pulmonar ¹¹⁵.

En aloinjertos arteriales criopreservados, se ha visto que la expresión de antígenos HLA de clase I es comparable a la observada en tejidos en fresco (no criogenizados) ¹¹⁶. A pesar de ello, a consecuencia del daño en la superficie del endotelio como consecuencia del proceso de criopreservación, se produce una disminución de la expresión de antígenos HLA de clase I en la íntima, que

sin embargo no se encuentra en la adventicia cuando se compara con tejido arterial en fresco. Ya que la íntima constituye la primera línea de contacto con el torrente sanguíneo, y con ello con el sistema inmune del receptor, esto podría explicar el diferente comportamiento en cuanto a la aparición de degeneraciones aneurismáticas entre los aloinjertos vasculares en fresco y los criopreservados que describíamos en las primeras series y que llevó al abandono parcial de estos trasplantes.

CAMBIOS HISTOLÓGICOS EN EL RECHAZO ARTERIAL

El rechazo vascular crónico es una de las principales causas del fracaso en el trasplante de órganos, siendo en el corazón donde esta complicación presenta sus consecuencias más graves. La Vasculopatía del Trasplante Cardíaco, o CAV (Cardiac Allograft Vasculopathy por sus siglas en inglés), constituye una forma acelerada de arteriopatía coronaria y principal causa de mortalidad y morbilidad en estos pacientes posteriormente al implante ¹¹⁷. Sin embargo, esta manifestación inmunológica puede tener lugar tanto en el árbol vascular de los órganos sólidos como en los aloinjertos arteriales o venosos empleados como bypass. Si nos centramos específicamente en las arterias trasplantadas, tres son los cambios histológicos que definen el rechazo crónico de estos aloinjertos ¹¹⁸.

- Infiltrado inflamatorio de la adventicia
- Necrosis de la media
- Proliferación de la íntima

Para entender estas alteraciones y la cascada de procesos interrelacionados que llevan al remodelado de la pared del vaso trasplantado, ha sido fundamental el desarrollo de modelos animales capaces de reproducir las lesiones descritas en órganos humanos. Las especies más utilizadas en esta patología han sido roedores, conejos, cerdos y primates, siendo los primeros los que acumulan el mayor número de estudios por su mayor versatilidad y fácil manejo. Igual de variadas son las arterias empleadas en estos modelos: aorta, carótida, femoral, coronaria... Es importante tener en cuenta, no obstante, que hay importantes diferencias anatómicas y fisiológicas entre estas especies y los humanos, como la ausencia de expresión de antígenos de histocompatibilidad de clase II de forma constitutiva en las células endoteliales de ratones ¹¹⁹. Como apuntan Soleimani y Shi en la misma revisión, la gran cantidad de modelos experimentales estudiados pone de manifiesto que no existe un único modelo ideal, capaz de representar todos los aspectos del rechazo en el trasplante vascular. No obstante, debemos añadir, estos modelos han aportado una valiosísima información para entender el rechazo arterial crónico, permitiendo cubrir lagunas donde, por razones éticas, no es posible llegar con la experimentación en humanos.

El grupo de trabajo de Plissonnier y colaboradores ^{120,121} ha estudiado en profundidad un modelo de aloinjerto de aorta abdominal en ratas que sigue siendo referencia para entender las alteraciones que tienen lugar en el tejido arterial tras el trasplante. Registrando los cambios histológicos en aloinjertos e

isoinjertos de aorta de rata han podido describir las alteraciones propias del rechazo arterial, así como las dianas y los efectores en cada una de las tres capas del vaso. A continuación se resumen los cambios tras el trasplante que tienen lugar en la íntima, la adventicia y la media en este modelo de aloinjerto aórtico de referencia.

Íntima

Progresiva necrosis de las células endoteliales desde los primeros días del trasplante, con pequeños grupos de macrófagos. Estas células endoteliales dañadas expresan antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (OX6) y terminan por vacuolizarse. Se objetivó la presencia de anticuerpos específicos anti-endotelio hasta los días 10-15, cuando se produce la desaparición progresiva de estas células endoteliales vacuolizadas. En este periodo se produce el comienzo del engrosamiento íntimo, que termina afectando a todos los aloinjertos entre los días 10 y 60. La proliferación íntima está asociada a una pérdida concomitante de células musculares lisas en la media. Después de la desaparición de los aloantígenos expresados por dichas células, el nivel de inflamación desciende progresivamente tanto en la íntima como en la adventicia.

Efectores celulares: Los monocitos macrófagos predominan sobre los linfocitos T

Efectores humorales: No se objetivó depósito de inmunoglobulinas o complemento.

Adventicia

La adventicia es invadida por células inmunocompetentes, lo que sugiere un mecanismo de inmunidad celular. A partir del día 5 postrasplante tiene lugar una intensa infiltración de células mononucleares en un gran anillo en torno al vaso, siendo máxima en torno día 18. Todas las células inflamatorias adventiciales expresan tanto antígenos de histocompatibilidad de clase II (OX6) como el antígeno de función linfocitaria LFA-1. Como ya hemos comentado previamente, una vez desaparecidos los aloantígenos de las células musculares lisas en la capa media el infiltrado desciende gradualmente, aunque todavía persiste al final del segundo mes.

Efectores celulares: Presencia de Linfocitos T CD4+, CD8+, además de unas pocas células Natural Killer (NK) que constituyen sólo el 1% de los linfocitos.

Efectores humorales: Los estudios de inmunofluorescencia no detectaron depósitos de Inmunoglobulinas ni complemento

Media

La necrosis de células musculares lisas de la media comienza en torno al día 8 tras el trasplante. El estadio final de estas alteraciones consiste en la completa desaparición de las células miocíticas. Se observa numerosas zonas de rotura en la lámina elástica y áreas desorganizadas en el espesor de la capa media.

El fenómeno principal que acompaña a la destrucción crónica de las células musculares lisas es la ausencia de infiltrado inflamatorio claro en la media, en contraste con la marcada infiltración descrita en la adventicia y la íntima. Las pocas células inflamatorias observadas eran del tipo Linfocito T. Después del día 15 postrasplante pequeñas cantidades de macrófagos aparecían en esta capa, sugiriendo un rol fagocitario sobre los miocitos necrosados.

El marcaje por inmunofluorescencia reveló depósitos de Inmunoglobulina G (IgG) entre los días 5 y 15 después del trasplante. La IgG aparece como pequeños depósitos granulares rodeando células musculares lisas en áreas donde se está produciendo necrosis de las mismas. La cronología de estos depósitos coincide con la de los pocos linfocitos observados en la media, sin observarse nuevos depósitos posteriormente.

Efectores celulares: ausencia de cantidades significativas de células inmunocompetentes.

Efectores humorales: depósitos de IgG en la media. No se detectaron depósitos de Inmunoglobulina M (IgM) ni complemento.

Estos hallazgos coinciden con los descritos por Bieber y su equipo en el trasplante cardíaco ¹²². En su artículo detallaron depósitos de IgG rodeando las células musculares lisas en la media de arterias coronarias de corazones trasplantados en situación de rechazo crónico, mientras que la adventicia y la íntima se mostraban libres. En la misma línea, otros estudios también refirieron la presencia de IgG en un modelo de aloinjertos aórticos de rata ¹²³.

El modelo de Plissonnier, aunque correspondiente a aloinjertos de aorta de rata no criopreservados, resulta particularmente interesante no solo porque muestra la sucesión de cambios clave para entender las modificaciones de la pared arterial que tiene lugar como consecuencia del rechazo mediado inmunológicamente, sino también para comprender que éste conlleva múltiples procesos simultáneos y encadenados, en una imagen cambiante y dinámica del rechazo crónico en los trasplantes vasculares (figura 10).

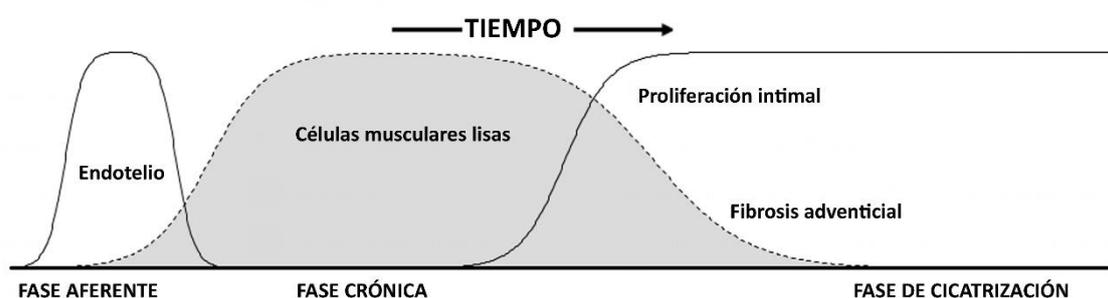


Figura 10. Representación esquemática de las diferentes fases en el proceso de rechazo de aloinjertos de aorta de rata. Modificado de Plissonnier et al, 1995 ¹²⁰.

Motomura y colaboradores emplearon el mismo modelo de alotrasplante de aorta de rata que Plissonnier, pero en este caso compararon aloinjertos frescos

con aortas criopreservadas en solución de DMSO, lo que lo hace su análisis mucho más próximo a los objetivos de nuestro propio estudio ^{124,125}. Además, se extendió el periodo de seguimiento a un año, lo que muestra una imagen más completa del proceso de remodelado en el aloinjerto. Los hallazgos consistieron nuevamente en un engrosamiento intimal, necrosis de la túnica media e infiltrado celular de la adventicia. Sin embargo, cabe destacar también una serie de puntos importantes:

1. El engrosamiento intimal fue más pronunciado en las aortas criopreservadas durante el periodo temprano postrasplante. Sin embargo, al año del mismo, ambos grupos no presentaban diferencias significativas.
2. La pérdida de celularidad de la media no mostró diferencias estadísticamente significativas en el tiempo entre los aloinjertos frescos y los criopreservados.
3. Tanto en el grupo de aortas en fresco como en el de criopreservadas se objetivó un importante infiltrado adventicial en el periodo inicial, que fue descendiendo progresivamente a lo largo de los meses. No obstante, el número de células fue estadísticamente mayor en el grupo de aloinjertos frescos, igualándose al año del implante.

La conclusión del estudio es que el proceso de criopreservación reduce el infiltrado inflamatorio adventicial, y por tanto la reacción inmunológica contra el injerto podría verse disminuido por dicha criopreservación, lo que tendría implicación directa en una posible disminución de la aloantigenicidad de estos injertos.

Eric Allaire y su equipo ¹²⁶ demostraron que la capacidad de la pared arterial para generar una respuesta inmunológica en el huésped se debe fundamentalmente a sus componentes celulares, al ser capaces de expresar en su superficie antígenos de histocompatibilidad tipo I y II. Por tanto, las células endoteliales y musculares lisas son probablemente la principal diana antigénica en el proceso de remodelado de la pared. En su investigación emplearon Dodecil Sulfato Sódico (DSS), un detergente que permite remover los componentes celulares y obtener una matriz extracelular de colágeno y elastina capaz de funcionar como injerto arterial. Los aloinjertos de aorta de rata así descelularizados destacaron por la preservación cualitativa y cuantitativa de la red de elastina en la capa media en comparación con los aloinjertos no tratados, que mostraban fragmentación de la lámina elástica interna y externa, con pérdida de la disposición paralela de las láminas elásticas y disminución de las células musculares lisas de la media. Además, la descelularización también previno el infiltrado inflamatorio adventicial, aunque no el engrosamiento intimal. Por otro lado, dicho engrosamiento no se acompañaba de células inflamatorias infiltrando la íntima, como sí ocurría en los aloinjertos sin descelularizar. El tratamiento con DSS en xenoinjertos no previno ni las dilataciones aneurismáticas ni la degradación cualitativa y cuantitativa de la elastina, pero sí redujo la extensión de los mismos. En la práctica clínica, este método de preparación de aloinjertos se desestimó por

presentar los bypasses así tratados un porcentaje inaceptablemente alto de trombosis del vaso ¹²⁷.

Estos resultados son indicativos de una escasa o nula antigenicidad de la matriz extracelular intraespecies, pero sí interespecies. El daño a la matriz de tejido conectivo observado en los aloinjertos no tratados con detergente podría depender de la presencia de células endoteliales, células musculares lisas o células adventicias que, al ser antigénicas, serían responsables de atraer células inflamatorias capaces de digerir la matriz extracelular ¹²⁸. Por otro lado, la lisis de células musculares lisas durante el rechazo podría iniciar el proceso de digestión, ya que se ha demostrado que contienen enzimas proteolíticos ^{129,130}.

PAPEL DEL ENDOTELIO VASCULAR

Volviendo al modelo de aloinjerto aórtico, hemos visto que la capa media se adelgaza, la lámina elástica se desestructura y las células musculares lisas son progresivamente destruidas. En la adventicia tiene lugar un infiltrado de células inflamatorias que remite una vez las células musculares lisas de la media desaparecen, lo que sugiere una relación entre la antigenicidad de estas últimas y el proceso de rechazo. En este contexto, la hiperplasia intimal parece ser una respuesta al daño inmune crónico sobre la pared arterial del aloinjerto ^{131,132}. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en el trasplante de órganos se considera que las células endoteliales presentan un alto grado de antigenicidad y están directamente relacionadas con el proceso de rechazo agudo ¹³³.

Estas células juegan una gran variedad de papeles críticos en el control de la función vascular. No solo participan en todos los aspectos de la homeostasis, sino también en procesos fisiológicos y patológicos como la trombosis, la inflamación o el remodelado vascular ¹³⁴:

- Actúan de barrera semiselectiva entre la luz del vaso y el tejido circundante, y por tanto controlando la homeostasis.
- Angiogénesis, dependiente de mediadores como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) o las angiopoietinas.
- Confieren resistencia a la trombosis, al conformar una superficie anticoagulante y antitrombótica capaz de secretar una variedad de moléculas que regulan la coagulación sanguínea y la función plaquetaria: óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI₂), activador tisular del plasminógeno (t-PA), proteína S...
- Modulan el tono vascular al controlar la actividad del tejido muscular liso a través de la producción mediadores como el NO, la endotelina, el factor de relajación derivado del endotelio (EDRF)...
- Participan en la respuesta inmunológica e inflamatoria, siendo capaces de producir citoquinas y factores de crecimiento, además de facilitar la extravasación de leucocitos desde el sistema vascular al tejido circulante

mediante la fijación de los mismos al endotelio por medio de moléculas de adhesión (selectinas, integrinas e inmunoglobulinas).

Que los vasos sanguíneos sean un objetivo principal del daño inmunológico que tiene lugar en el rechazo de los trasplantes alogénicos se debe en parte a la exposición constante de la lámina endotelial a los efectores inmunes de la sangre, tanto celulares como moleculares, ya que es la primera en entrar en contacto con el sistema inmune del huésped. Una segunda razón reside en la inmunogenicidad intrínseca del endotelio vascular. Éste expresa de forma constitutiva antígenos del MHC tipo I y es inducido a expresar antígenos del MHC tipo II cuando es expuesto a un medio alogénico¹³³. Por tanto, el endotelio vascular es considerado uno de los componentes más inmunoestimuladores de todos los trasplantes de órganos.

Esta inmunogenicidad de las células endoteliales se ha visto confirmada en la fuerte respuesta alogénica observada en los cultivos endoteliales *in vitro*¹³⁵. *In vivo*, aloanticuerpos específicos para moléculas de superficie de estas células han sido detectados en el análisis inmunológico de órganos rechazados^{136,137}.

Por otro lado, es importante remarcar que el endotelio es una superficie frágil, y el proceso de criopreservación del injerto conlleva una pérdida significativa del número de estas células y su funcionalidad¹³⁸. En un estudio de Lupinetti y colaboradores¹³⁹ se analizaron porciones criopreservadas de válvulas cardíacas humanas y de pared arterial que no se emplearon posteriormente en trasplante. Los hallazgos mostraban una pérdida importante de células endoteliales en todos los injertos, pero también la presencia de algunas de estas células en el 16% de las muestras. Otro estudio de Yankah y su equipo aumenta el porcentaje de células endoteliales viables en aloinjertos valvulares criopreservados al 70-80%¹⁴⁰. Un hallazgo similar se observa tras el trasplante de aortas criopreservadas de rata, en el que a los 10 días del implante sólo un tercio de los aloinjertos tenían células endoteliales presentes^{124,125}. De acuerdo con estas observaciones, la re-endotelización de la íntima, a base de células del receptor, podía durar hasta un año post implante.

Se desconoce la importancia de la pérdida de células endoteliales en la supervivencia de los aloinjertos a largo plazo. Si bien su destrucción reduciría la respuesta inmune del huésped y con ello la posible degeneración aneurismática, por otro lado, la desaparición del endotelio podría incrementar la formación de trombos y afectar de forma adversa a los fibroblastos subyacentes, llegando a acelerar el deterioro del injerto. Por tanto, es difícil determinar si la pérdida del endotelio tiene un efecto positivo, negativo o neutro en la estructura y función a largo plazo del trasplante vascular¹³⁹.

Hemos visto que las células endoteliales están íntimamente relacionadas con el rechazo agudo. Para otros autores los antígenos de superficie de este endotelio del donante también participarían en el desarrollo de lesiones vasculares crónicas al provocar la estimulación continuada de linfocitos T colaboradores CD4+, contribuyendo a una respuesta inmune regional sostenida¹⁴¹. Consecuentemente, la liberación local de citoquinas y factores de crecimiento regularía el reclutamiento de células inflamatorias, la proliferación

de células musculares lisas en la íntima y la acumulación de matriz extracelular.

ATEROMATOSIS MEDIADA INMUNOLÓGICAMENTE

El rechazo crónico que tiene lugar en los órganos trasplantados puede presentarse de varias formas desde el punto de vista histológico, dependiendo del injerto. La manifestación común a todas ellas es el desarrollo de una vasculopatía con características similares a la aterosclerosis, asociada a una reacción inmune con respuesta inflamatoria en el órgano trasplantado ¹⁴².

En la arteriosclerosis clásica descrita en humanos, los cambios son fundamentalmente focales y asimétricos en su distribución, afectando sobre todo a vasos proximales y dando lugar a calcificaciones de la pared y placas de ateroma, con una completa desestructuración de la lámina elástica interna ¹⁴³. Sin embargo, estas alteraciones no coinciden con la arteriosclerosis descrita en modelos animales experimentales de trasplante de aorta en los que no se realizó inmunosupresión ¹³¹, siendo ésta generalizada y acompañada de un engrosamiento de la íntima que presenta una disposición concéntrica. La respuesta intimal, que incluye hipertrofia de células endoteliales y proliferación de células musculares lisas con pequeñas roturas de la lámina elástica interna, es sin embargo idéntica a la observada en el trasplante de corazón y riñón en humanos. La hiperplasia de la íntima se acompaña de infiltrado inflamatorio adventicial y necrosis de los miocitos de la capa media, en un proceso lento que, si bien se inicia a los pocos días del trasplante, sigue generando cambios muchos meses después.

No coincide, por tanto, con la disposición clásica de una placa de ateroma, que presenta lesiones proliferativas focales, excéntricas y con núcleo lipídico necrótico, pero sí con lo observado en la vasculopatía de las arterias coronarias de corazones trasplantados o CAV ¹⁴⁴, ya mencionada previamente. Estos cambios llegan incluso a reducir la luz del vaso, con estenosis significativas capaces de comprometer la viabilidad del aloinjerto. Pueden observarse en mayor o menor medida en todos los trasplantes, tanto de órganos sólidos como de injertos vasculares, pero es más prevalente en el trasplante cardíaco, en el que afectan a más de un 50% de los pacientes ¹⁴⁵.

A continuación se describen las diferencias más significativas entre CAV y la aterosclerosis clásica:

	CAV	ATEROESCLEROSIS
Vasos afectados	Afecta a todos los vasos del aloinjerto. Las venas se ven afectadas.	Afecta a vasos epicárdicos. Las venas nunca se ven afectadas.

Patrón de la placa	Difusa y concéntrica.	Focal y excéntrica
Inflamación	Sí	Raramente
Lámina elástica interna	Intacta	Desestructurada
Progresión	Evolución rápida desde las fases iniciales de la enfermedad, con presencia de macrófagos espumosos.	Evolución lenta (a menudo a lo largo de décadas).

Tabla 4. Diferencias histopatológicas entre la Vasculopatía del Trasplante Cardíaco (Cardiac Allograft Vasculopathy o CAV) y la aterosclerosis. Modificado de Rahmani et al 2006 y Ramzy et al 2005 ^{144,146}.

La reducción de la luz del injerto incrementa, en consecuencia, la resistencia del segmento vascular afectado. Tres son los factores que determinan la resistencia al flujo: la longitud del vaso, su diámetro y la viscosidad de la sangre, siendo el diámetro el parámetro más importante desde el punto de vista cuantitativo y fisiológico. La razón es que pequeños cambios de éste conllevan importantes aumentos de la resistencia vascular. De acuerdo con la ecuación de Poiseuille, la resistencia del vaso (R) es directamente proporcional a su longitud (L) y a la viscosidad (η) de la sangre, e inversamente proporcional al radio a la cuarta potencia (r^4):

$$R \propto \frac{\eta L}{r^4}$$

Por tanto, si el radio de la luz (o el diámetro) se reducen a la mitad (50%), la resistencia al flujo sanguíneo en el segmento estenosado se incrementa 16 veces (1500%). No obstante, en el árbol arterial las estenosis ejercen una influencia mucho menor en la resistencia al flujo debido a que las arterias vienen dispuestas en serie y en paralelo con otras arterias, lo que reduce significativamente la resistencia de todo el circuito vascular ¹⁴⁷. Sin embargo, en los bypasses con aloinjertos criopreservados no persisten ramas funcionantes, solamente una anastomosis de entrada y otra de salida, por lo que no existe mecanismo compensatorio. El radio de una arteria de gran calibre, distributiva, que ejerce una resistencia mucho menor que los grupos de pequeñas arterias y arteriolas, deberá reducirse más de un 50% para que tenga un efecto hemodinámicamente significativo en flujo del órgano.

Por su parte, la viscosidad de la sangre suele mantenerse dentro de un rango, salvo que tenga lugar un importante aumento del hematocrito. La longitud, sin embargo, es un factor a tener en cuenta en estos injertos. Un vaso dos veces más largo que otro, a igual radio de su luz, ejercerá dos veces más resistencia al paso del flujo. Muchos de los injertos empleados para revascularizar

miembros isquémicos presentan longitudes particularmente extensas, que puede superar los 80 cm en un bypass femoro-distal. En estas condiciones la resistencia al flujo sanguíneo se incrementa notablemente, lo que en conjunto con la reducción en el diámetro de la luz del vaso puede llevar a la trombosis del injerto.

Si bien a nivel de las pequeñas arterias de órganos sólidos la vasculopatía del aloinjerto es capaz de comprometer seriamente el flujo sanguíneo, y con ello la viabilidad del trasplante, creemos que en aloinjertos vasculares el diámetro de los vasos empleados para bypass (aortas torácicas y abdominales, iliacas y sector femoro-poplíteo) los hace más resistente a una estenosis significativa por la hiperplasia intimal, dadas las razones hemodinámicas descritas. No obstante, la reducción del flujo sanguíneo, por pequeña que sea, puede tener consecuencias dramáticas en la permeabilidad de estos injertos, a menudo de una gran longitud e implantados en muchas ocasiones en pacientes con flujos de salida escasos por deterioro aterosclerótico severo del árbol arterial distal.

PAPEL DE LAS CÉLULA MUSCULARES LISAS

Las células musculares lisas participan activamente en el engrosamiento de la íntima, ayudando en la producción de matriz extracelular y por tanto en el desarrollo de las características lesiones difusas de hiperplasia intimal ya descritas. Existen tres posibles fuentes para explicar el origen de las células musculares lisas observadas en el proceso de hiperplasia intimal:

- a) migración desde la túnica media.
- b) formación a partir de células presentes en la adventicia (células madre mesenquimales o fibroblastos que se diferencian a miofibroblastos).
- c) origen en células precursoras circulantes del receptor, incluyendo células madre mesenquimales y monocitos (figura 11).

Sin embargo, la contribución de cada una de estas fuentes depende enormemente del contexto de la enfermedad, los modelos experimentales y de las especies analizadas (p.e.: humanos vs ratones) ¹⁴⁸.

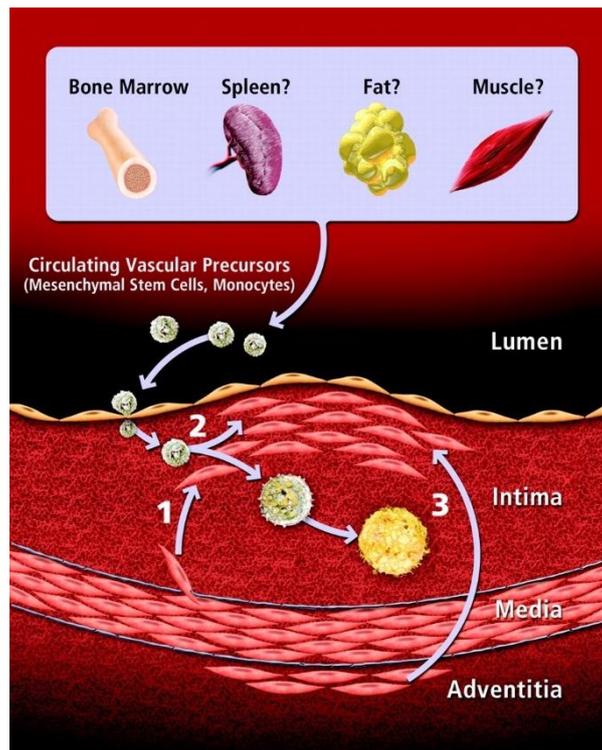


Figura 11. Posibles orígenes de las células musculares lisas en la hiperplasia intimal: 1) migración desde la túnica media; 2) diferenciación de células precursoras circulantes, con origen en la médula ósea, fundamentalmente; 3) migración de células precursoras desde la adventicia. Tomada de Fukuda et al, 2010 ¹⁴⁸.

Durante años se aceptó la teoría clásica que proponía una activación de células musculares lisas de la túnica media en respuesta a un daño o estímulos inflamatorio, provocando la migración de las mismas hacia el espacio subendotelial, su proliferación y la producción de matriz extracelular. Con el tiempo, estas células musculares lisas migradas volverían a adoptar una situación quiescente ^{149,150}.

Más recientemente se ha visto que células progenitoras circulantes podrían ser causa del engrosamiento intimal descrito en arterias coronarias con enfermedad vascular del injerto. Estas células se fijarían a áreas con daño vascular como parte de un proceso adaptativo de cicatrización, para diferenciarse posteriormente en células musculares lisas maduras ^{151,152}.

Originalmente se postuló, de acuerdo con modelos animales que así lo confirmaban ^{153,154}, que estas células progenitoras provenían de la médula ósea del receptor a través de la circulación, fijándose en la cara interna del vaso. Sin embargo, es posible que la imagen real sea un poco más compleja. Algunos autores, como los equipos de Hruban y Atkinson ^{155,156}, no fueron capaces de identificar células musculares lisas con origen en el receptor en arterias epicárdicas de trasplantes humanos. Otros equipos de investigación sí establecieron el origen de dichas células en receptores de un modelo de trasplante de aorta en ratones, pero en este caso poniendo de manifiesto que el origen de las mismas no estaba en la médula ósea ¹⁵⁷. Parece, por tanto, que los hallazgos dependen directamente del modelo experimental, y que en este

sentido los modelos animales no son exportables directamente a sus equivalentes humanos.

La conclusión, como habíamos mencionado, es que las células musculares lisas que dan lugar a la hiperplasia intimal en alotrasplantes pueden tener múltiples orígenes dependiendo del modelo de investigación y las características del daño vascular, no disponiendo en el momento actual de ningún estudio sobre su ascendencia en aloinjertos vasculares criopreservados.

Si por un lado la hiperplasia intimal puede generar estenosis en la luz del injerto, y con ello comprometer la viabilidad del bypass, este proceso de remodelado de la pared del vaso como reacción al daño mediado inmunológicamente tiene otra variante menos común pero igualmente interesante para nuestro estudio: la angiopatía dilatada. Se trata de un subtipo de la enfermedad vascular del injerto descrito inicialmente por von Scheidt y colaboradores en corazones humanos trasplantados ¹⁵⁸ consistente en un aumento segmentario del diámetro de arterias coronarias superior al 50% del diámetro del segmento adyacente. Estos hallazgos representan, por tanto, degeneraciones aneurismáticas de origen inmunológico, con una prevalencia en dicho estudio de 5 de 68 pacientes (7,3%) sometidos a angiografía al menos un año después del trasplante cardiaco. Si bien los autores no se atreven a sugerir el mecanismo fisiopatológico detrás de dichas dilataciones, cabe suponer que está en íntima relación con los procesos de degeneración aneurismática observados en aloinjertos vasculares humanos de mayor calibre, como es el caso de nuestro estudio.

Posteriormente otros autores han descrito la misma patología con distinta prevalencia, si bien en una serie más corta (1 de 9 pacientes, un 11,1%) ¹⁵⁹. No hemos encontrado nuevas referencias bibliográficas, si bien es cierto que en la vasculopatía postrasplante cardiaco el mayor interés desde el punto de vista clínico reside en la estenosis coronaria mediada inmunológicamente, que condiciona el fallo isquémico tardío del injerto y es responsable del 32% de las muertes de estos pacientes a los 5 años ¹⁶⁰. No obstante, el equipo de Coma-Canella ¹⁶¹ refiere un mayor porcentaje de pacientes con dilatación de la luz que de estenosis en arterias coronarias en corazones humanos trasplantados tras cinco años de seguimiento (32% frente a 8,5%), aunque en su serie nunca alcanzaron el diámetro mínimo para ser etiquetadas de angiopatía dilatada. Los autores sugieren que, al igual que en nuestras observaciones con la degeneración aneurismática de aloinjertos vasculares criopreservados, la incidencia de estos hallazgos aumenta con el tiempo de seguimiento.

CÉLULAS INFLAMATORIAS PARTICIPANTES

De acuerdo con observaciones de distintos estudios ^{123,162}, en el modelo de rechazo de aloinjertos aórticos de rata las células inflamatorias que infiltran la adventicia están conformadas fundamentalmente por macrófagos y linfocitos, especialmente linfocitos citotóxicos.

El engrosamiento intimal parece tener lugar en dos fases diferenciadas:

1) Un infiltrado inflamatorio temprano con proliferación de células mononucleares y predominio de monocitos/macrófagos. Este engrosamiento inicial de la íntima se produce a través de un aumento del número de células mediante una combinación de migración y proliferación in situ.

2) Una fase más tardía con abundancia de células musculares lisas y producción de matriz extracelular. En esta segunda etapa de daño intimal se observa un descenso de monocitos/macrófagos mientras que el número total de células permanece estable, indicando un recambio activo de los tipos celulares en la íntima.

Según el estudio mencionado de Isik y colaboradores ¹⁶², la capa media muestra infiltrado gradual de la población tipo monocito/ macrófago hasta conformar la mayoría de las células de la media, que termina con la pérdida prácticamente completa de las células musculares lisas a ese nivel.

Las células T supresoras tiene una presencia temprana en la íntima, con un aumento gradual de las mismas en la media y una fase tardía de proliferación en la adventicia (figura 12).

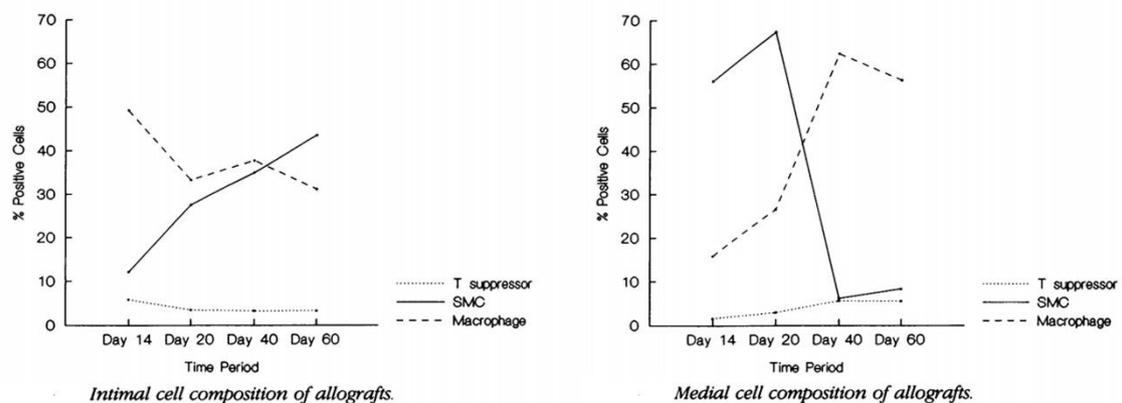


Figura 12. Cambios en el tiempo de la composición celular en las capas íntima y media de los aloinjertos aórticos de rata. SMC: células musculares lisas. T suppressor: linfocitos T supresores. Tomada de Isik et al, 1992 ¹⁶².

Este infiltrado de macrófagos en la media, que llega a ser superior al 60% en el estudio descrito, no se ve en el modelo de Plissonnier ¹²⁰ que habíamos descrito hasta ahora, ya que éste incide específicamente en la ausencia de un infiltrado inflamatorio significativo a esa capa arterial. Sus hallazgos en la túnica media consistían, como habíamos señalado, en la presencia inicial de algunos linfocitos T y posteriormente un ligero aumento de los macrófagos, con depósitos significativos y transitorios de IgG mientras duraba la presencia de linfocitos. Ambos equipos registraron los cambios transcurridos en aloinjertos de aorta hasta el día 60, si bien los primeros realizaron el alotrasplante desde cepas de rata PVG a cepas DA, y los segundos desde ratas Brown-Norway a ratas Lewis, de menor tamaño. Llama la atención que las sondas de anticuerpos empleadas para reconocer la presencia de macrófagos y linfocitos

por el equipo de Isik (ED-1 anti-macrófago y OX-8 anti-CD8) no sólo fueron empleadas por Plissonnier, sino que se dispuso de un abanico aún más extenso de anticuerpos monoclonales para reconocer las células inflamatorias (anti-NK, anti-CD43, anti-R73, anti-CD4, anti-NK y anti-CD45). Además, este último describió los mismos resultados en la túnica media en otro estudio ¹⁶³ empleando estirpes de rata distintas (Wistar-Kyoto y SHR o Spontaneously Hypertensive Rats).

Estos datos confirman la gran variabilidad obtenida en los resultados según el modelo experimental, el tipo de tejido o las sondas de anticuerpos empleadas. A este respecto, el uso de modelos animales criados en laboratorio, si bien permite un control extensivo de las características de los mismos para ajustarlos a las necesidades concretas de los estudios, dada su limitada diversidad genética podría llegar a enmascarar posibles vías de rechazo o tolerancia presentes en humanos ¹⁶⁴. De hecho, Reichenbach y su equipo constataron tiempos de rechazo muy variables en trasplantes de ratón no endogámicos, en contraste con la respuesta uniforme registrada en cepas endogámicas ¹⁶⁵.

En humanos, el estudio de arterias coronarias de corazones trasplantados obtenidos tras el fallecimiento del receptor permitió observar la presencia de linfocitos T y macrófagos en la íntima engrosada ¹⁴¹. Particularmente, éstos se localizaban inmediatamente subyacentes a la luz del vaso, a menudo en íntima asociación entre ellos y con las células endoteliales, que expresaban antígenos del CMH tipo II. Nuevamente, este patrón difiere de forma sustancial de la distribución celular en la placa de ateroma clásica, en la que los linfocitos T están confinados principalmente a la capa fibrosa y los macrófagos pueden ser vistos en toda la placa, particularmente en torno al núcleo central lipídico ¹⁶⁶. Como ya hemos comentado, nuestros propios resultados coinciden en presentar lesiones en las arterias criopreservadas trasplantadas que difieren de forma característica de la ateromatosis al uso.

No solo los linfocitos T supresores juegan un papel clave en la vasculopatía del injerto. Los linfocitos T colaboradores (Th) también influyen directamente en el remodelado de la pared vascular a través de la secreción de citocinas ¹⁶⁷. Las citocinas de los linfocitos T colaboradores tipo 1 (Th1), en particular el Interferón Gama (IFN- γ), dan lugar a lesiones predominantemente oclusivas, promoviendo la hiperplasia intimal y la fibrosis de la adventicia. Por su parte, las citocinas de los linfocitos T colaboradores tipo 2 (Th2), y en concreto la Interleucina 4 (IL-4), puede promover la expresión de enzimas catabólicos por las células inflamatorias que infiltran la pared, resultando en la degradación de la matriz extracelular y dando lugar a la formación de aneurismas.

ALOANTIGENICIDAD DE LAS ARTERIAS CRIOPRESERVADAS

La hipótesis de que la criopreservación altera la antigenicidad del tejido alogénico es una cuestión que ha generado importante controversia, especialmente si tenemos en cuenta la falta de acuerdo en el resultado de los distintos estudios realizados hasta la fecha.

Ya hemos visto que el proceso de criopreservación conlleva una pérdida significativa de células endoteliales. Al tratarse de uno de los grupos celulares más antigénicos, cabría suponer que al desaparecer las mismas tendría lugar un descenso en la capacidad inmunoestimuladora del aloinjerto. Las células musculares lisas también se ven dañadas tras criopreservar y descongelar el tejido vascular. Que el número de células capaces de expresar antígenos HLA tipo I se vea reducido debería disminuir igualmente la reacción inmunológica frente al donante. Sin embargo, los resultados de los estudios demuestran, sin lugar a dudas, que dentro de los 30-60 primeros días de la cirugía se genera respuesta humoral y celular en el receptor ¹¹⁶.

Son muchos los experimentos que han tratado de confirmar la reducción de la aloantigenicidad de los injertos criopreservados. Un estudio con aortas abdominales de rata mostró que la criopreservación prevenía la dilatación arterial mediada inmunológicamente tras su implante durante 8 semanas en receptores genéticamente incompatibles ⁹⁴.

Previamente hemos descrito los resultados publicados en distintos artículos por Motomura y colaboradores, en los que se objetiva que el proceso de criopreservación reduce el infiltrado inflamatorio adventicial en un modelo con aortas criopreservadas de rata. Su conclusión es que la reacción inmunológica frente al injerto podría verse disminuida por dicha criopreservación ^{124,125}.

En la misma línea se ha visto que el método de criopreservación afecta a la inmunogenicidad del tejido. La Criopreservación Libre de Hielo (CLH), mediante un proceso de vitrificación, demostró que era capaz de mantener la estructura de la matriz extracelular de tejidos cardiovasculares humanos y generar respuestas inmunes atenuadas de los mismos *in vitro*. La CLH exhibió actividad metabólica significativamente menor y reducción de la liberación de citoquinas en comparación con la criopreservación convencional, por lo que se detectó un menor reclutamiento de monocitos y linfocitos T ¹⁶⁸.

En un estudio de O'Brien y colaboradores ¹⁶⁹, la durabilidad de las válvulas criopreservadas implantadas en humanos fue superior a las conservadas a 4°C, con un porcentaje significativamente menor de incompetencia valvular moderada a severa a los 14 años del implante (20% en comparación con 65%).

Por su parte, Flesch y su equipo ¹⁷⁰ observaron que la criopreservación descendía la antigenicidad en aloinjertos de islotes pancreáticos en ratas. En concreto, describen una reducción clara de los antígenos del CMH tipo II en todas las muestras, reducción además que resultaba ser permanente. Sin embargo, no se descubrieron cambios con respecto a los antígenos del CMH tipo I.

No obstante, a pesar de la evidencia descrita, muchos estudios postulan la validez de la hipótesis contraria: que la criopreservación no altera la aloantigenicidad del injerto.

Un grupo de trabajo de la Universidad de Kumamoto, en Japón ¹⁷¹, comparó los cambios ocurridos en tras el implante de aorta torácica de ratas Brown-Norway a ratas Lewis en fresco, criopreservada o tratada con glutaraldehído. Llama la

atención que no se detectaron diferencias significativas en el infiltrado inflamatorio entre los aloinjertos criopreservados y en fresco, aunque éste sí fue menor en las aortas tratadas con glutaraldehído. Su conclusión es que el proceso de criopreservación no altera de forma significativa la antigenicidad.

El mismo equipo ⁹² tampoco encontró diferencias significativas en el infiltrado linfocitario de aortas de perro, en fresco o previamente criopreservadas, a las 8 semanas de ser implantadas. Un segundo grupo de experimentos se diseñó para estimular el proceso de rechazo, empleando aortas de rata en fresco y criopreservadas que fueron implantadas en receptores a los que se les había realizado previamente un injerto cutáneo singénico o alogénico. Nuevamente, no se hallaron diferencias significativas a las 8 semanas en el número de células inflamatorias infiltradas entre las aortas implantadas en fresco o criopreservadas, y cuyos receptores fueron sometidos previamente a un alotrasplante cutáneo.

Otro grupo japonés, el de Saito y colaboradores, de la Universidad de Tokio ⁹¹, comparó aortas torácicas de rata criopreservadas y en fresco, implantadas en posición infrarrenal y recuperadas a la semana y a las cuatro semanas del trasplante. Se midió la respuesta inmune sistémica, local, la viabilidad de las células endoteliales y la hiperplasia intimal, no hallándose diferencias entre ambas y, por tanto, concluyendo que la criopreservación no modifica la aloantigenicidad de los injertos vasculares.

El trasplante de venas criopreservadas también ha sido estudiado, realizando una comparativa funcional del endotelio, musculo liso y tejido conectivo entre venas de perro en fresco y criopreservadas. El estudio tampoco mostró diferencias con respecto a la secuencia de eventos histológicos asociados con el uso de venas en fresco en el trasplante de venas criopreservadas ¹⁷².

En otro experimento se emplearon válvulas aórticas de rata con un pequeño segmento de aorta torácica, que fueron trasplantadas en fresco o tras criopreservación. A las tres semanas del implante se realizó un injerto cutáneo de una estirpe de rata singénica con la del donante, midiendo el tiempo hasta el rechazo del mismo. Se concluyó que los aloinjertos de válvula aórtica eran antigénicos y producían sensibilización del receptor, y que el proceso de criopreservación no disminuía dicha sensibilización ¹⁷³.

En un modelo porcino de alotrasplante de arterias femorales no solo no se detectaron diferencias entre los injertos criopreservados y en fresco implantados con respecto a la aparición de lesiones aneurismáticas, sino que además, a los 30 días se observaba una mayor reactividad inflamatoria con una tendencia hacia una presencia mayor de células multinucleadas que en los injertos en fresco ¹⁷⁴. Llama la atención que el mismo grupo de trabajo había publicado un estudio con idénticas características seis meses antes ¹⁷⁵, solo que con la mitad de animales (35 vs 71) y un seguimiento tres veces mayor (90 vs 30 días), en el que las conclusiones son exactamente opuestas. La criopreservación no solo prevenía las degeneraciones aneurismáticas vistas en los aloinjertos en fresco, sino que además reducía el infiltrado inflamatorio de linfocitos T en la íntima.

Una reflexión interesante que extraer de estos resultados es la enorme variabilidad que se obtiene con mínimos cambios en el método de experimentación, el modelo animal o los métodos de medición. Además, confirma nuestras observaciones sobre la importancia del momento en el que se toma la muestra, en un proceso patológico que actúa de manera continuada sobre el tejido y ejerce cambios sucesivos y encadenados en el aloinjerto. Por lo tanto, resulta difícil extraer conclusiones definitivas de los resultados contradictorios en los distintos estudios. Independientemente del modelo utilizado, la dificultad para extrapolar los mismos a la fisiopatología del trasplante en humanos es patente, dada la imposibilidad de realizar estudios seriados con aloinjertos en vivo por obvias cuestiones éticas. Sí podemos sacar conclusiones de los resultados clínicos de esos mismos bypasses criopreservados implantados en multitud de centros y pacientes. Cuando en un inicio se comenzaron a usar trasplantes vasculares en fresco, los repetidos casos de dilataciones aneurismáticas relacionados con respuestas inmunológicas hicieron que el interés por los mismos decayera y se buscasen alternativas protésicas ¹⁶.

En una revisión sistemática del resultado de los aloinjertos vasculares a arterias infrainguinales con los estudios publicados desde 1966 a 2004 ¹⁷⁶, las arterias y venas criopreservadas presentaron degeneración aneurismática o rotura del injerto en un rango que va del 2 al 6% en las distintas series (Media: 3,75%. 635 pacientes en total). Por su parte, las publicaciones de revascularizaciones con aloinjertos venosos no criopreservados, almacenados en isquemia fría, registraron degeneraciones o roturas entre el 4 y el 15% de los casos (Media: 11,3%. 363 pacientes en total). Los resultados se resumen en la tabla 5.

Estudio	Año	Periodo de inclusión	Nº de injertos	Degeneración
Criopreservación de aloinjertos venosos				
Brockbank et al ¹⁷⁷	1992	1985-1990	75	No reportada
Martin et al ¹⁷⁸	1994	1987-1993	115	2%
Carpenter et al ¹⁷⁹	1997	2 años	40	3%
Farber et al ¹⁸⁰	2003	1992-2002	240	4%
Criopreservación de aloinjertos arteriales				
Branchereau et al ¹⁸¹	2000	1991-1997	165*	6%
Isquemia fría de aloinjertos venosos				

Dortland et al ¹⁸²	1991	1984-1989	156	15%
Rebane et al ¹⁸³	1997	1978-1993	107	4%
De Leersnijder et al ¹⁸⁴	1992	1982-1989	100	15%

Tabla 5. Comparativa de los estudios publicados sobre aloinjertos criopreservados infrainguinales entre los años 1996 y 2004, centrada en el porcentaje de degeneraciones. * El estudio de Branchereau et al incluyó 45 aloinjertos arteriales conservados mediante isquemia fría. Modificada de Fahner et al, 2006 ¹⁷⁶.

OTROS MODELOS DE DEGENERACIÓN ANEURISMÁTICA

Según lo descrito hasta ahora, tras el implante de arteria criopreservada las células supervivientes al proceso de congelación/descongelación van a provocar una respuesta inmune en el receptor que terminará con la progresiva desaparición de las mismas. El aloinjerto queda conformado por fibras elásticas y colágenas, así como células migradas del huésped, fundamentalmente fibroblastos. Las características biomecánicas del bypass resultante van a depender por tanto de la cantidad de elastina restante en la arteria donante, por lo que los aloinjertos de arteria criopreservada femoral/distal van a presentar dilataciones más rápidamente que los de aorta ¹⁸⁵. Arnaud y su equipo también confirmaron que la aorta torácica presentaba una mejor respuesta a la criopreservación que la aorta abdominal, en principio debido a la extensa red de componentes elásticos que mantienen fijas las células musculares lisas y, por tanto, otorgándole mayor fuerza mecánica que a la aorta abdominal, sujeta a una regulación más vasoactiva ¹⁸⁶.

Otros modelos de formación de aneurismas también ponen de manifiesto una relación causal entre el infiltrado de células inflamatorias, la pérdida de elastina y la degeneración aneurismática de la pared ^{187,188}. Esto se debe a que la formación de aneurismas, a diferencia del desarrollo de estenosis, afecta fundamentalmente a la capa media de la pared arterial. Así, el equipo de Anidjar demostró que la presencia de elastasa en la capa media de la aorta lleva a la formación de aneurismas. Macrófagos activados a ese nivel podrían ser responsables de la secreción de elastasa y la destrucción de las fibras elásticas. Además, la plasmina podría actuar como potenciador de la actividad de la elastasa y, en consecuencia, agravar la degeneración de la pared arterial, ya que se ha visto in vivo en ratas que bajas concentraciones de elastasa, incapaces de inducir la formación de aneurismas por sí mismas, sí lo hacían en presencia de plasmina. La investigación clínica sugiere que esta actividad elastolítica está igualmente relacionada con la formación de aneurismas en humanos, así como en la patogénesis de del enfisema pulmonar ¹⁸⁹.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Los aloinjertos arteriales criopreservados son capaces de generar una respuesta inmune en el huésped en virtud de su condición de trasplantes alogénicos. Esta reacción inmunológica es específica frente a antígenos del donante, siendo responsable del fracaso de estos bypasses, bien favoreciendo la estenosis de los mismos mediante un mecanismo similar a la vasculopatía del trasplante en órganos sólidos, bien siendo responsable la degradación de la pared del vaso, dando lugar a las degeneraciones aneurismáticas observadas en este tipo de injertos.

OBJETIVOS

El presente trabajo de tesis doctoral tiene como **objetivo general** contribuir al conocimiento de los mecanismos inmunológicos responsables del fracaso de los trasplantes de arteria criopreservada.

Como **objetivos específicos** se han fijado los siguientes:

- I. Caracterizar la población receptora de arterias criopreservadas y establecer características individuales que puedan diferenciar el subgrupo de pacientes con fracaso de sus bypasses.
- II. Describir el comportamiento clínico de los trasplantes vasculares y, en concreto, su evolución hacia la degeneración de la pared del injerto cuando ésta se produce.
- III. Establecer las características anatomopatológicas e inmunohistoquímicas de los aneurismas de arteria criopreservada, así como sus diferencias con respecto a los aneurismas de arteria nativa.
- IV. Confirmar la especificidad de la respuesta inmune a partir del estudio de anticuerpos generados frente al tejido donante, describiendo las características de dicha respuesta y la capacidad de la misma para activar el complemento y ser capaz de provocar rechazo frente al trasplante.
- V. Analizar el fenómeno de múltiples degeneraciones aneurismáticas en sucesivos aloinjertos criopreservados dentro del mismo paciente, tanto desde el punto de vista clínico como anatomopatológico e inmunológico.
- VI. Explorar si existen otros factores, además de los inmunológicos, que puedan condicionar la evolución de estos bypasses, tanto de forma individual como actuando en conjunto con el sistema inmune.

MATERIAL Y METODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

La presente investigación está en consonancia con los protocolos de la Declaración de Helsinki ¹⁹⁰ para la experimentación con humanos y ha sido aprobada por la Comisión de Bioética del Hospital Universitario central de Asturias. Se ha puesto énfasis especial en la protección de datos de los sujetos a estudio, así como de sus donantes, con el consentimiento informado de los pacientes (Documento 1) y de acuerdo con la ley orgánica de Protección de Datos Personales y Garantía de los Derechos Digitales (BOE-A-2018-16673)

¹⁹¹.

Se estudiaron de forma observacional prospectiva pacientes que requirieron revascularización aorto-iliaca o de miembros inferiores mediante injerto arterial criopreservado entre noviembre de 2015 y mayo de 2018. La indicación quirúrgica se planteó tanto por isquemia crítica (clasificación de Rutherford estadios 4 a 6: dolor isquémico en reposo/ pérdida de tejido) como por infección protésica o de arteria nativa. La decisión de emplear una arteria criopreservada se tomó en todos los pacientes dada la ausencia de vena safena interna autóloga válida para bypass, bien por haber sido empleada en cirugías previas, bien por tratarse de un vaso dilatado por enfermedad venosa crónica o de calibre y/o longitud insuficiente para su uso como injerto. Los criterios de exclusión fueron el antecedente de trasplante previo de órgano sólido y la toma de tratamiento inmunosupresor. En todos los casos la revascularización se llevó a cabo por el servicio de Angiología y Cirugía Vasculardel Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), en Oviedo, España (figura 12).

El HUCA surgió de la fusión en los años 90 de la antigua Residencia Sanitaria Nuestra Señora de Covadonga, (perteneciente al Instituto Nacional de la Salud), y del Hospital General de Asturias, dependiente de la Diputación provincial de Oviedo. El centro se trasladó a su ubicación actual en 2014, un año antes del inicio del estudio, ofreciendo actualmente 1039 camas y con una superficie hospitalaria de 183603 m². El servicio de Cirugía Vasculardel HUCA es el segundo en antigüedad de España, y dispone de 36 unidades de hospitalización, con una ocupación media del 112.8%. En el año 2018 realizó 8673 consultas anuales, así como 1571 intervenciones quirúrgicas, 441 de ellas de forma ambulatoria ¹⁹².

Como es habitual en nuestro centro, y en línea con la evidencia científica hasta la fecha ya revisada en el capítulo previo, no se estudió la compatibilidad ABO previamente al implante de los injertos ^{27,57,98}, siendo imposible obtener compatibilidad cruzada HLA tanto por obvios problemas de stock como de tiempo para realizar estudios en intervenciones urgentes.

Un segundo grupo de pacientes con degeneración aneurismática de arteria criopreservada fue analizado, tanto desde el punto de vista de la evolución de sus aloinjertos como del estudio anatomopatológico, incluyendo inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, siempre que fuera posible obtener

una muestra del aloinjerto por nueva cirugía de revascularización y sin estar éste trombosado previamente. En este grupo se incluyeron todos los pacientes de la serie original que registraron degeneración aneurismática durante el periodo de seguimiento, así como aquellos pacientes que, habiendo recibido un trasplante vascular en nuestro centro previo al inicio del estudio, sufrieron degeneración de su arteria criopreservada durante la investigación.



Figura 12. Vista aérea del complejo del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), en su actual localización en la Avenida Roma de Oviedo, España.

Además, se obtuvieron los datos demográficos, comorbilidades, indicación quirúrgica, complicaciones operatorias y datos clínicos de seguimiento. Se registraron de esta forma permeabilidades primaria, primaria asistida y secundaria, así como complicaciones, reintervenciones, amputaciones y mortalidad. En cuanto a la comorbilidades se estudió la presencia de hipertensión (>140/90 y que requieran tratamiento antihipertensivo), tabaquismo (actual o previo), diabetes (tipos I o II), dislipemia (colesterol LDL ≥ 2.6 mmol/L y/o triglicéridos ≥ 5.0 mmol/L, a tratamiento farmacológico) enfermedad cardiaca (valvulopatía, insuficiencia cardiaca congestiva o fibrilación auricular), cardiopatía isquémica (angina o infarto de miocardio), enfermedad cerebrovascular (ictus o accidente isquémico transitorio), enfermedad renal crónica (filtrado glomerular <60mL/min), EPOC, y neoplasia (previa o activa).

Se analizaron la permeabilidad primaria, primaria asistida y secundaria, así como el salvamento de la extremidad (ausencia de amputación mayor, entendiéndola ésta como amputación supra e infracondílea, y descartando las

amputaciones digitales o transmetatarsianas) y la supervivencia durante el periodo del estudio, en concordancia con los estándares recomendados por Rutherford y colaboradores para la publicación de resultados en pacientes con isquemia de miembros inferiores ¹⁹³. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el programa IBM SPSS Statistics versión 21 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Proyecto:

Factores inmunológicos en el fracaso de los injertos vasculares criopreservados

Investigador Principal: Dr. Mario González Gay

Explicación:

Yo:

Con DNI N°:

1. He hablado con
2. He recibido suficiente información sobre el Proyecto. Estoy satisfecho con esas explicaciones y las he comprendido.
3. He podido hacer todas las preguntas que he considerado necesarias sobre el proyecto. Se han respondido adecuadamente y he comprendido todas las explicaciones que me han dado.
4. Comprendo que mi participación es voluntaria.
5. Comprendo que puedo retirarme del Proyecto:
 - Cuando quiera.
 - Sin tener que dar explicaciones.
 - Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Que valorando lo anterior, doy libremente mi conformidad para la obtención de las muestras biológicas de sangre periférica y para la utilización de las muestras de biopsia que hayan sido obtenidas con fines diagnósticos o terapéuticos, que son necesarias para la realización de dicho estudio.

Guardo en mi poder una copia de este consentimiento y firmo este documento.

En Oviedo a de de 201

Firma del participante

Firma del médico

PROTOCOLO DE ESTUDIO DE ANTICUERPOS

Se realizó tipaje HLA y estudio de anticuerpos del paciente receptor previo al implante de la arteria criopreservada mediante un tubo de sangre anticoagulada (8 mL) y otro anticoagulado con ácido etilendiaminotetraacético o EDTA (5mL). Se solicitan las siguientes determinaciones de laboratorio:

- LBG Determinación de Anticuerpos anti-HLA postransplante
- LBG Otras solicitudes EDTA
- LBG Tiraje HLA pretransplante de órganos sólidos (receptor)

A la semana del implante se lleva a cabo nuevo estudio de anticuerpos:

- LBG Determinación de Anticuerpos anti-HLA postransplante
- LBG Otras solicitudes EDTA

Este control se repitió periódicamente al mes de la cirugía, así como a los 3, 6, 9 y 12 meses de la misma. En el laboratorio de Inmunología se estudiaron los anticuerpos anti HLA en el suero del receptor, así como el análisis de las subpoblaciones leucocitarias y el grado de activación de los linfocitos T CD4+ y CD8+ mediante citometría de flujo. En caso de trombosis o explante del injerto sin sustitución por nueva criopreservada, se procedió a suspender el análisis seriado de los anticuerpos en ese paciente.

El procedimiento de cribado se llevó a cabo mediante inmunoensayos basados en microesferas (LIFECODES Clase I y Clase II LSA™, Immunocor GTI Diagnostics, Inc., Wisconsin, USA). Estos ensayos permiten detectar anticuerpos IgG reactivos al panel frente a moléculas HLA. El protocolo consiste en incubar una alícuota de las microesferas con un pequeño volumen de la muestra de suero del paciente. Seguidamente, se lavan las microesferas sensibilizadas para eliminar los anticuerpos que no se hayan fijado. Se añade luego un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con ficoeritrina. Tras otro nuevo ciclo de incubación, se diluye la muestra problema y se analiza en el dispositivo Luminex® (Luminex Corporation, Austin, Texas), mostrado en la figura 13. Éste compara la intensidad de la señal emitida por cada microesfera con la de la microesfera específica del locus de más baja calificación incluida en la preparación, para determinar si aquella es positiva en cuanto al aloanticuerpo unido.

El protocolo de cribado para la detección de anticuerpos siguió los siguientes pasos:

1. Retirar la mezcla de microesferas LSA del congelador y descongelar en

- la oscuridad a temperatura ambiente.
2. Permitir que el tampón de lavado se equilibre con la temperatura ambiente (entre 20 y 24 °C) antes de usarlo.
 3. Humedecer previamente los pocillos que se van a utilizar con 100-300 μL de agua destilada. Entre 2 y 5 minutos después, se retira el agua aspirando suavemente la placa con el sistema de vacío.
 4. Centrifugar el vial de microesferas LSA a 600-800 xg durante 30 segundos para desprender del tapón o de las paredes del vial todas las microesferas o restos de líquido. Agitar bien el vórtex (menos de un minuto) para resuspender de forma homogénea las microesferas.
 5. Anadir 40 μL de microesferas LSA a cada uno de los pocillos asignados. Agitar en el vórtex el vial de las microesferas LSA cada 2 minutos para mantenerlas en suspensión. Añadir posteriormente 10 μL del suero del paciente y del suero control, y mezclar.
 6. Cubrir la placa con la cubierta de plástico adhesivo y protegerla de la luz. Incubar la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente (20-24 °C) en la oscuridad y sobre una plataforma rotatoria.
 7. Diluir el conjugado con tampón de lavado (5 μL de conjugado en 45 μL de tampón de lavado por muestra).
 8. Tras los 30 minutos de incubación, retirar la cubierta de plástico adhesivo y añadir 100 μL de tampón de lavado en cada pocillo. Mezclar para volver a suspender las perlas y succionar ligeramente la placa.
 9. Añadir 250 μL de buffer de lavado a cada pozo, mezclar para volver a suspender las perlas, succionar y repetir dos veces más el procedimiento para realizar un total de tres lavados.
 10. Añadir 50 μL de conjugado diluido a cada uno de los pocillos. Colocar la placa en una plataforma rotatoria a 200 rotaciones por minuto, protegida de la luz. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente (20-24 °C).
 11. Con una punta de pipeta limpia, añadir 130 a 150 μL de tampón de lavado en cada pocillo y mezclar para suspender las microesferas.
 12. Recoger los datos con el dispositivo Luminex® dentro de las 3 horas siguientes al proceso de cribado.



Figura 13. Analizadores moleculares por citometría de flujo Luminex® (Luminex Corporation, Austin, Texas).

También se llevó a cabo la tipificación de HLA del paciente receptor, mientras que el perfil de los donantes ya se analiza del mismo modo tras la extracción y puede ser obtenido de nuestra base de datos. En caso de que el origen del injerto estuviera en un banco de tejidos de otra provincia, no fue posible obtener el perfil HLA de dichos donantes dada la protección de datos de los pacientes en el programa nacional de trasplantes, al no estar adscritos dichos centros al presente estudio. En nuestro hospital la tipificación de alelos de HLA de clases I y II se realiza mediante kits LIFECODES HLA SSO®. Esta técnica se basa en la amplificación del ADN por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para multiplicar el número de copias de una región seleccionada del ADN, empleando oligonucleótidos con especificidad de secuencia (SSO) que permiten determinar qué alelos HLA están presentes en una muestra amplificada. El procedimiento consiste en la hibridación mediante sondas SSO monocatenario marcado obtenido mediante PCR. Cada una de las distintas sondas puede ser homóloga de una secuencia del ADN amplificado exclusiva de un alelo o grupo de alelos. Dicho de otro modo, estas sondas son capaces de hibridar preferentemente con una región complementaria que puede estar presente o no en el ADN amplificado. Además, el ADN amplificado hibrida también con una o más sondas de consenso homólogas a secuencias presentes en todos los alelos de un locus. La señal relativa obtenida por las sondas, al ser analizada en el Luminex®, permite asignar una reactividad positiva o negativa con el ADN, ofreciendo la información necesaria para determinar el fenotipo HLA de la muestra.

El protocolo para la tipificación de HLA SSO sigue los siguientes pasos:

- A. Purificación del ADN genómico, con una concentración entre 10 y 200 μL
- B. Amplificación del ADN (Reacción en cadena de la polimerasa o PCR)
 1. Igualar la temperatura de la muestra con la temperatura ambiente

(18-30 °C).

2. Agitar suavemente los reactivos en un vórtex durante 10 segundos aproximadamente. Posteriormente, centrifugado durante 5-10 segundos para que el contenido se desplace al fondo del tubo.
3. Siguiendo la tabla 6, preparar los componentes para la amplificación de n+1 reacciones, y completar con agua exenta de nucleasas hasta un volumen final de 20 µL por reacción.

Componente	Cantidad por reacción PCR, por muestra
Mezcla maestra LIFECODES®	6 µL
ADN genómico 10-200 ng/µL	Total ~80 ng
Polimerasa taq LIFECODES®	0,2 µL (1 U)
Agua exenta de nucleasas	Hasta un volumen final de 20 µL

Tabla 6. Componentes de la reacción para la amplificación mediante kits de tipificación de HLA LIFECODES®

4. Pipetear la cantidad adecuada de ADN genómico (40-120 ng) en los tubos de PCR, cerrándolos bien para evitar la evaporación.
5. Colocar las muestras en el termociclador.

C. Hibridación

1. Calentar la mezcla de sondas en el bloque calefactor a 55-60 °C durante 5-10 minutos para solubilizar los componentes.
2. Tratar durante brevemente (unos 15 segundos) la mezcla de sondas con ultrasonidos y agitarla posteriormente en vórtex durante 15 segundos para suspender por completo las microesferas.
3. En cada pocillo de una placa de termociclador, combinar 15 µL de la mezcla adecuada de sondas con 5 µL del producto de la PCR específico de locus.
4. Colocar la esfera de compresión de silicona encima de la placa y proceder a la hibridación de las muestras en las condiciones de incubación siguientes:

1º: A 97 °C durante 2 minutos 2º: A 47 °C durante 10 minutos 3º: A 56 °C durante 8 minutos 4º: Mantener a 56 °C
--

5. Mientras las muestras hibridan, preparar una mezcla al 200:1 de solución diluyente y PE-estreptavidina. Combinar 170 µL de solución

diluyente y 0,85 µL de 1mg/mL PE-estreptavidina por muestra, manteniendo la solución en la oscuridad y a temperatura ambiente.

6. En el paso final a 56 °C, y estando la bandeja en el termociclador, diluir cada muestra con 170 µL de la mezcla preparada de solución diluyente y PE-estreptavidina en un espacio de tiempo no superior a 5 minutos.
7. Sacar del termociclador la bandeja de muestras y colocar en el analizador Luminex®.

También se realizó la prueba de citotoxicidad cruzada (cytotoxic crossmatch test) para detectar anticuerpos fijadores de complemento. Células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de 6 donantes fueron aisladas del resto de la muestra de suero anticoagulado con EDTA mediante centrifugación en gradientes Ficoll-Hypaque (Lymphoprep™; Nycomed, Oslo, Noruega). PBMC fueron suspendidas en RPMI 1640™ (BioWhitaker, Verviers, Bélgica) a 2,5 x 10⁶ células/ mL y mezcladas (1 mL) en una placa de Terasaki con 1 mL de suero de cada paciente. El suero y las células se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente otros 60 minutos a la misma temperatura tras añadir complemento. Seguidamente se dispensó Fluoroquenck™ (One Lambda Inc, California, Estados Unidos) en el ensayo de microcitotoxicidad, tiñendo tanto a las células vivas (en verde) como las muertas (en rojo), fácilmente distinguibles mediante microscopía de fluorescencia. El test se consideró positivo cuando anticuerpos donante-específicos se unieron a linfocitos, activando el complemento y causando lisis celular en al menos el 20% de las células de cada pocillo.

SEGUIMIENTO CLÍNICO Y DE IMAGEN

La toma de muestras se llevó a cabo en todos los pacientes durante las sucesivas consultas externas de seguimiento, al mes, a los 3 meses, y cada 3 meses sucesivamente. Se valoró la clínica de isquemia/infección, explorando la presencia de pulsos y posibles lesiones en miembros inferiores. Durante la misma se realizó estudio ecográfico de la arteria criopreservada, tomando medidas seriadas del diámetro del vaso a distintos niveles en la hoja de seguimiento (Documento 2). Se registra, además, el hallazgo de estenosis o trombosis en el injerto, si los hubiera. En los casos en los que la clínica o la ecografía lo indicaron necesario, se solicitaron nuevas ecografías o se completaron estudios mediante Angio Tomografía Computarizada (tabla 7).

	Pre implante	7 días	1 mes	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
Tipaje HLA	✓	X	X	X	X	X	X
Estudio anticuerpos	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Eco Doppler	X	X	✓	✓	✓	✓	✓

Tabla 7. Calendario de seguimiento clínico durante los 12 primeros meses.

**FACTORES INMUNOLÓGICOS EN EL FRACASO DE LOS
HOMOINJERTOS DE ARTERIA CRIOPRESERVADA**

HOJA DE SEGUIMIENTO ECOGRÁFICO BY-PASS DE ARTERIA CRIOPRESERVADA

PACIENTE:

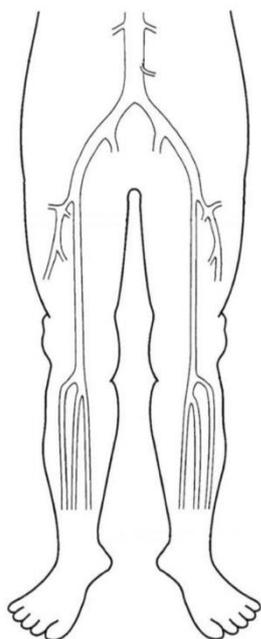
N.H.C.:

FECHA DEL ESTUDIO ECOGRÁFICO:

Nº CONTROL:

TIPO DE BY-PASS:

COMENTARIOS:



LOCALIZACIÓN	DIAMETRO (mm)
--------------	---------------

ANASTOMOSIS PROXIMAL	
ANASTOMOSIS DISTAL	

ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO

En aquellos pacientes con degeneración del injerto a lo largo del tiempo de seguimiento, y que además requirieron reintervención, se remitió una muestra de la arteria criopreservada resecada quirúrgicamente para estudio anatomopatológico, incluyendo inmunohistoquímica y de inmunofluorescencia. Este mismo procedimiento se llevó a cabo con aquellos pacientes con degeneración durante el periodo del estudio pero que habían recibido la arteria criopreservada en nuestro centro con anterioridad al inicio del mismo. Las muestras fueron obtenidas durante el recambio de los bypasses permeables afectados y se remitieron en fresco al Servicio de Anatomía Patológica de nuestro centro para procesamiento y posterior estudio (figura 14). Se evaluó la presencia de depósitos de inmunocomplejos (IgG, C3, C4 y HLA clase I) mediante inmunofluorescencia directa. Además, también se completó estudio inmunohistoquímico para IgG, C3, C4 y HLA clase I, incluyendo tinciones para actina y fibras elásticas. Adicionalmente, tejido obtenido de aneurismas de arteria nativa periférica en pacientes escogidos al azar, fueron analizados de la misma forma, sirviendo de casos control.

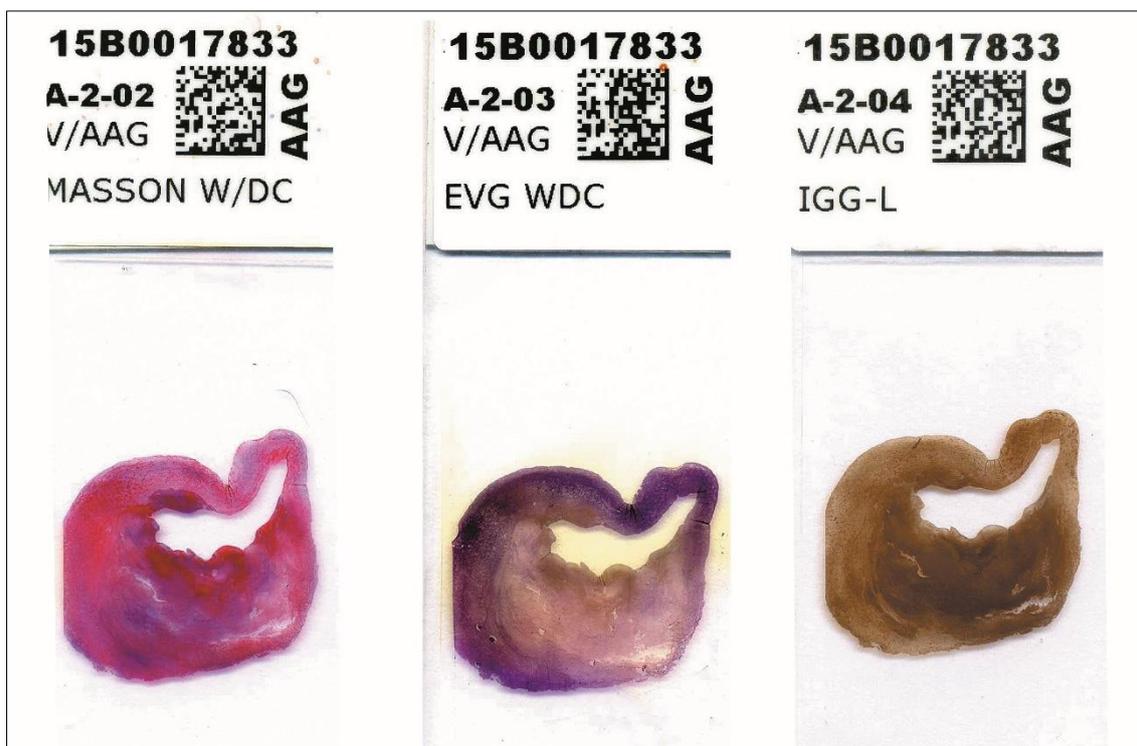


Figura 14: Secciones sobre portaobjetos de arteria criopreservada degenerada, procesadas y teñidas para análisis anatomopatológico e inmunohistoquímico. De izquierda a derecha: Tricrómico de Masson, Tinción de Van Gieson, y marcaje con anticuerpos IgG. Las muestras corresponden a la degeneración número 7 del estudio (ver el capítulo correspondiente de resultados).

HOMOINJERTOS ARTERIALES

Las arterias de donante fueron remitidas desde el Banco de tejidos humanos del Centro Comunitario de Sangre y Tejidos de Asturias, y en ausencia de injerto disponible localmente, del Banco de Sangre y Tejidos de Cataluña o del Complejo Asistencial Universitario de Burgos. Todas ellas fueron obtenidas durante la extracción multiorgánica de donantes cadáver dentro del Programa Nacional de Trasplantes y dentro de las 6 horas siguientes al exitus (tiempo de isquemia caliente). Desde la extracción a la congelación no transcurrieron más de 8 horas, permaneciendo el tejido refrigerado en todo momento a 4 °C (tiempo de isquemia fría).

El tipo de arteria empleada fue la aorta torácica y el segmento ilio-tronco tibioperoneo. Habitualmente, la aorta infrarenal se extrae junto con el injerto hepático de cara al trasplante de hígado, y no suelen estar disponible para trasplante vascular independiente.

Los criterios específicos para la donación de arterias son la edad del paciente entre 18 y 50 años, en ausencia de enfermedades vasculares, hipertensión y en el que se comprueba el buen estado de la pared arterial en examen “*de visu*” durante el explante.

PROTOCOLO DE CRIOPRESERVACIÓN

Tras la extracción se realiza un lavado cuidadoso (5 lavados con cánula de irrigación) con suero salino isotónico heparinizado. Por último, se mide la longitud de la arteria o vena y se introduce en un contenedor de vidrio estéril con la solución de recogida: *Dulbecco's Modified Eagle Medium* o DMEM (500 ml) + Combinación antibiótica (50 microlitros de Clindamicina, 70 microlitros de Amikacina y 500 microlitros de Vancomicina).

El procesado se hace en el área aséptica (“sala blanca”) del Banco de Tejidos y bajo campana de flujo laminar. Se extrae la arteria o vena del contenedor y se deposita en una bandeja estéril, procediendo a tomar un pequeño fragmento de la misma para control bacteriológico que se introduce en medio TRIS-glucosa o TG.

La técnica de crioconservación se ajusta rigurosamente a los siguientes pasos:

1. Se introduce la arteria en la bolsa de criopreservación.
2. Se llena la bolsa con 180 ml de DMEM.
3. Sellado de la bolsa.
4. Se coloca la bolsa sobre una bandeja de hielo, esperando unos 5-10 minutos para que la temperatura del DMEM descienda.

5. Se carga en una jeringa 20 ml de Dimetil Sulfoxido (DMSO).
6. A través de una chimenea, se introduce muy lentamente (en un tiempo no inferior a 10 minutos) la totalidad de la jeringa con el DMSO, agitando suavemente para obtener una distribución homogénea del crioprotector mientras la bolsa permanece sobre el hielo.
7. Se suelda la chimenea utilizada y se rotula en el exterior de la bolsa el tipo de arteria que contiene y su longitud.
8. Se Introduce la bolsa en la canastilla metálica homogeneizadora.
9. Descenso controlado de temperatura en un congelador biológico programable, desde +4 °C hasta -80 °C, realizando un descenso térmico lineal de -1 °C /minuto. También puede recurrirse a congelación sin rampa, dejando el tejido en un contenedor isoterma en el congelador eléctrico de -70 °C.
10. Una vez acabado el descenso térmico se introducen los tejidos en el tanque de nitrógeno en fase de vapor a -140 °C, donde será almacenado.

PROTOCOLO DE DESCONGELACIÓN

Del mismo modo, el proceso de descongelación debe seguir una serie de pasos estrictos:

1. Se coloca la bolsa conteniendo la arteria a temperatura ambiente dentro de la campana de flujo laminar y envuelta en un paño estéril durante 3 minutos.
2. Se Introduce en baño María a 37 °C hasta su total descongelación.
3. Seguidamente se lava con 50 ml de salino a 37 °C, agitando durante 2 minutos. Se tira el líquido y se repite el procedimiento 2-3 veces, recogiendo líquido del último lavado para control bacteriológico preimplante.

TÉCNICA DE IMPLANTE

Las arterias fueron transportadas al quirófano el día de la intervención desde el Banco de Tejidos Humanos del Centro comunitario de Sangre y Tejidos de Asturias, tras llevar a cabo previamente la descongelación de la arteria/s según el protocolo descrito.

El equipo quirúrgico procedió a ligar las colaterales y comprobar la estanqueidad del vaso. Los agujeros fueron reparados mediante sutura con polipropileno de 6/0. Si más de una arteria era necesaria para extender la longitud del bypass, ambas se anastomosaron en disposición termino-terminal.

Todos los pacientes recibieron terapia antiagregante indefinida al alta, salvo aquellos que requerían anticoagulación por otras patologías.

RESULTADOS

DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN

CARACTERIZACIÓN GENERAL DE LA POBLACIÓN

El periodo de inclusión en el estudio comprendió un total de 31 meses entre noviembre de 2015 y mayo de 2018, prolongándose el tiempo de seguimiento hasta diciembre de 2019. En total se realizó el análisis y seguimiento prospectivo, mediante consulta de revisión, control seriado de anticuerpos y ecografías, de 35 pacientes sometidos a cirugía de revascularización mediante el trasplante de arteria criopreservada.

La edad media fue de 72,8 años (con un rango de 46 a 100 años y una desviación tipo de 12,3). Si tomamos como referencia únicamente a los pacientes con patología infecciosa de base, la edad media pasa a ser de 70,6 años (rango de 48 a 84). En el grupo de pacientes intervenidos por isquemia la edad media fue de 73,3 (rango 48-100). No hay, por tanto, importantes diferencias en cuanto a edad entre ambas patologías. Tampoco la hay si tomamos como referencia el sexo del paciente (72,2 años de media en hombres por 75,2 años en mujeres).

Solamente se incluyeron 7 mujeres por 28 hombres (20% vs 80%).

En cuanto a los antecedentes médicos, se describen con detalle en la tabla 8:

	Tabaco	HTA	DM	DL	EPOC	ERC	Card. Isque.	Otras Card.	AIT/ ACV	Isq. Cron. MMII	Neo
1	Ex	Sí	No	Sí	No	No	No	No	No	Sí	No
2	Ex	No	No	No	No	No	No	No	No	Sí	Sí
3	Ex	Sí	No	Sí	No	Sí	Sí	No	No	Sí	No
4	No	Sí	Sí	Sí	No	No	Sí	No	No	Sí	No
5	Sí	No	No	No	Sí	Sí	No	No	No	No	No
6	Ex	Sí	Sí	Sí	No	No	No	Sí	No	Sí	No
7	No	Sí	Sí	No	No	No	No	No	Sí	No	No
8	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No	No	No	Sí	No

9	No	Sí	Sí	No	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No
10	No	Sí	Sí	No	No	Sí	No	No	No	No	No
11	No	Sí	Sí	Sí	No	No	No	Sí	No	Sí	No
12	No	Sí	Sí	No	No	No	No	No	No	Sí	No
13	Ex	No	No	No	Sí	No	No	No	No	Sí	No
14	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No	No	No	No	Sí	No
15	Sí	No	Sí	No	No	No	No	No	Sí	Sí	No
16	Sí	Sí	No	Sí	No	No	No	No	No	Sí	No
17	Ex	No	No	No	No	Sí	No	No	No	Sí	No
18	Ex	Sí	Sí	No	No	Sí	Sí	Sí	No	Sí	No
19	Ex	No	Sí	No	No	No	No	No	No	Sí	No
20	No	Sí	No	No	Sí	No	No	No	No	Sí	Sí
21	No	Sí	Sí	No	Sí	Sí	No	Sí	No	Sí	No
22	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No	No	No	No	Sí	No
23	Ex	Sí	Sí	Sí	No	No	No	No	No	Sí	Sí
24	Sí	Sí		Sí	Sí	No	No	No	No	Sí	Sí
25	Sí	No	Sí	No	No	No	No	No	Sí	Sí	No
26	Ex	No	Sí	No	No	No	No	No	Sí	Sí	No

27	Sí	No	No	No	No	No	No	Sí	No	Sí	Sí
28	Sí	Sí	Sí	No	Sí	No	Sí	Sí	No	Sí	No
29	No	Sí	Sí	Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No
30	Ex	Sí	Sí	Sí	No	No	Sí	No	No	Sí	Sí
31	Ex	Sí	Sí	No	No	No	Sí	Sí	No	Sí	No
32	Ex	No	No	No	Sí	No	No	No	No	Sí	No
33	Ex	Sí	Sí	No	Sí	No	No	No	No	Sí	No
34	No	Sí	No	Sí	No	Sí	Sí	Sí	No	Sí	No
35	No	Sí	Sí	Sí	No	No	Sí	No	No	Sí	No
Ex:14											
No: 12											
Sí:9											
	25	22	15	8	10	8	10	4	32	6	

Tabla 8. Cuadro con las comorbilidades de los pacientes estudiados de forma prospectiva. Tabaquismo: actual (Sí) o previo (Ex). HTA: hipertensión (>140/90 y que requieran tratamiento antihipertensivo). DM: diabetes (tipos I o II). DL: dislipemia (colesterol LDL ≥ 2.6 mmol/L o triglicéridos ≥ 5.0 mmol/L y a tratamiento farmacológico). EPOC: diagnosticado de enfermedad pulmonar obstructiva crónica. ERC: enfermedad renal crónica (filtrado glomerular < 60 mL/min). Card. Isque.: cardiopatía isquémica (angina o infarto de miocardio). Otras Card.: enfermedad cardíaca no isquémica (valvulopatía, insuficiencia cardíaca congestiva o fibrilación auricular). AIT/ACV: enfermedad cerebrovascular (accidente isquémico transitorio o ictus). Isq. Cron. MMII: isquemia crónica de miembros inferiores. Neo: neoplasia (previa o activa).

Un amplio número de pacientes presentaba múltiples patologías, con varios factores de riesgo cardiovascular asociado. Solamente 3 pacientes no registraban patología isquémica crónica de base, estando éstos relacionados con enfermedad aneurismática, trombosis aguda por síndrome protrombótico y un proceso infeccioso en paciente trasplantado renal, respectivamente.

La patología más prevalente, sin tener en cuenta la isquemia crónica de miembros inferiores (91,4%), fue la hipertensión arterial (71,4%), seguida del

tabaquismo (actual o previo: 65,7%), la diabetes mellitus (62,8%) y la dislipemia (42,8%). En la figura 15 se muestran los distintos porcentajes asociados a las comorbilidades teniendo en cuenta toda la muestra de pacientes prospectivos.

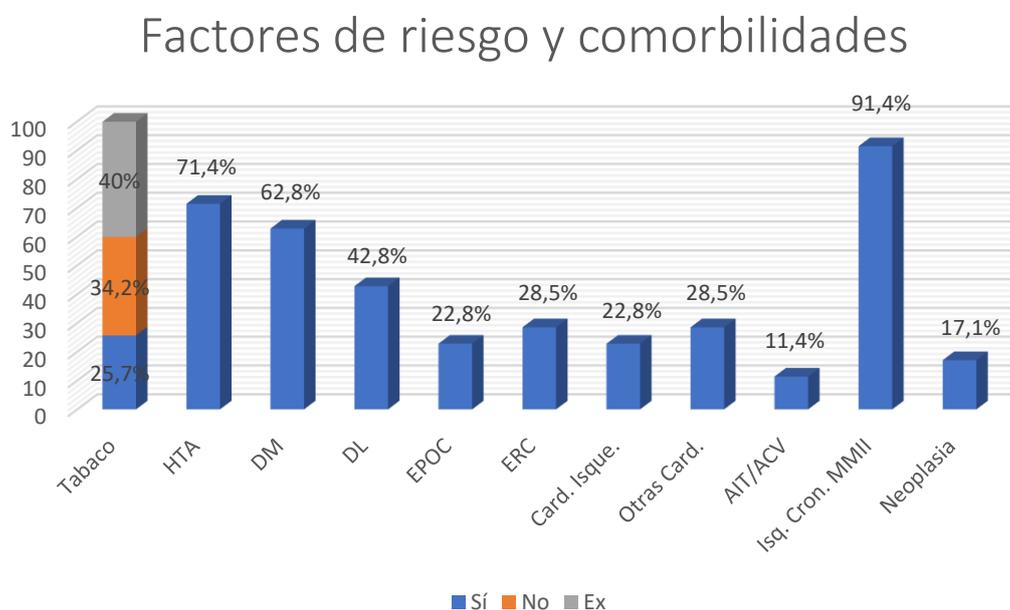


Figura 15. Porcentajes correspondientes a las patologías asociadas con los pacientes estudiados de forma prospectiva. La leyenda es superponible a la tabla 8.

Seis pacientes presentaban antecedente de neoplasia activa o previa. Por otra parte, dos pacientes estaban diagnosticados de al menos dos aneurismas de arteria nativa (femoral superficial + femoral profunda + poplíteo, y abdominal + poplíteo, respectivamente). Como veremos más adelante en los resultados del seguimiento, el primero de estos pacientes presentó degeneración aneurismática del bypass.

La indicación clínica para el implante del aloinjerto de arteria criopreservada fue isquemia crítica en 25 casos (71,4%) y proceso infeccioso en los 10 restantes (28,6%). Si desglosamos estos grupos en relación con el hábito tabáquico, el 60% de los pacientes isquémicos eran fumadores activos o lo habían sido previamente, por un 80% del conjunto de los pacientes con procesos infecciosos. Un número muy importante de estos últimos presentaban igualmente isquemia crónica de miembros inferiores, asociada con una infección en relación con cirugía de revascularización previa (8 de los 10 pacientes).

Dentro de las indicaciones clínicas por un cuadro isquémico, un 52% lo fueron por dolor en reposo, mientras que el 48% restante estaban asociadas a lesiones isquémicas que comprometían la viabilidad de la extremidad.

A 29 pacientes se les había realizado previamente cirugía de revascularización antes de implantarles el bypass de arteria criopreservada, el 82,8% de la muestra.

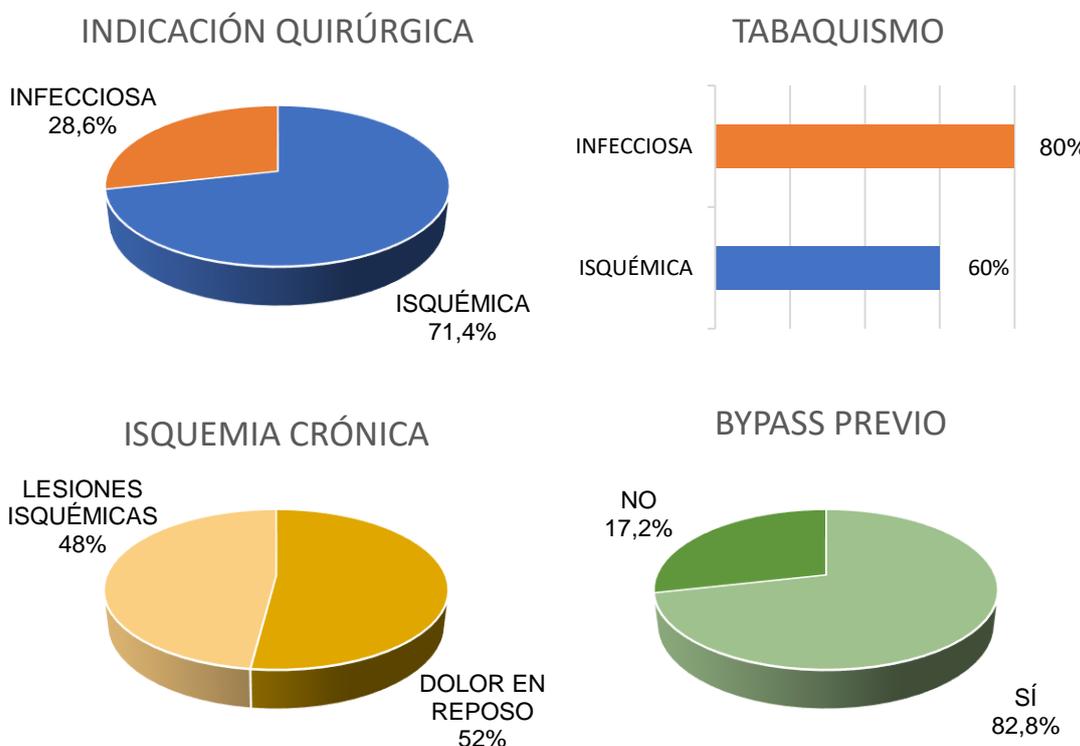


Figura 16. Gráficas representando la proporción de pacientes con indicación quirúrgica por isquemia vs infección, el porcentaje de tabaquismo en ambos grupos, la proporción de pacientes con isquemia que presentaban dolor en reposo vs los que tenían lesiones de origen isquémico, y el porcentaje de pacientes del total que se habían sometido previamente a cirugía de revascularización.

TIPOS DE BYPASS DE ARTERIA CRIOPRESERVADA

A continuación se muestran las distintas configuraciones de los bypasses implantados en aquellos pacientes incluidos en el estudio, de forma prospectiva, durante el periodo seguimiento.

La mayor parte de los aloinjertos criopreservados tienen la anastomosis distal en localización infracondílea (77,15%), siendo la configuración más común el bypass femoro-poplíteo a 3ª porción (44,4% del total de la muestra). Sin embargo, más de un tercio de todos los injertos está compuesto por bypasses a troncos distales (42,85%). Los bypasses suprainguinales y supracondíleos solo constituyen el 22,85% de la muestra (tabla 9). Dentro de los bypasses asociados a procesos infecciosos, solamente dos fueron exclusivamente

suprainguinales. Los ocho restantes tenían al menos la anastomosis distal a nivel inguinal o por debajo de la misma.

Aorto – Iliaco	2	SUPRAINGUINALES
Ilio – Femoral	5	SUPRACONDÍLEOS
Femoro – Poplíteo a 1ª porción	1	
Ilio – Tronco tibioperoneo – Tibial posterior	1	INFRACONDÍLEOS
Ilio – Tibial anterior	1	
Femoro – Poplíteo a 3ª porción	12	
Femoro – Tibial anterior	3	
Femoro – Tibial posterior	5	
Femoro – Peroneo	3	
Femoro – Tronco tibioperoneo	1	
Primera porción poplíteo – Tibial posterior	1	

Tabla 9. Tipos de bypass de arteria criopreservada presentes en la muestra en función de la localización su anastomosis distal. Se diferencia entre bypasses exclusivamente suprainguinales, bypasses con anastomosis distal supracondílea y bypasses a arterias infrageniculares.

RESULTADOS DEL SEGUIMIENTO

El periodo de seguimiento y recogida de datos comprendió desde la entrada del primer paciente en el estudio, en noviembre de 2015, hasta diciembre de 2019.

Sólo se perdieron durante el seguimiento tres pacientes por razones distintas a la muerte, la trombosis del bypass o el recambio del injerto, a los 5, 17 y 30 meses de la intervención, respectivamente (8,5% de la muestra). Se siguieron hasta su muerte, o el fin de 2019, a otros 32 pacientes, con un tiempo medio de seguimiento de 27,6 meses y un rango entre los 9 días y los 1340 días (44,67 meses). El rango intercuartílico o IQR fue de 16,5-35,5 meses.

En total se reintervinieron 15 pacientes por problemas con su bypass de arteria criopreservada, el 42,8% del total, de los cuales 9 requirieron más de una intervención. En la figura 17 se describen las 29 intervenciones secundarias realizadas en los 15 pacientes mencionados, diferenciando entre bypasses en riesgo de fracaso (trombosis, sangrado activo...), bypasses trombosados y recambio del bypass.

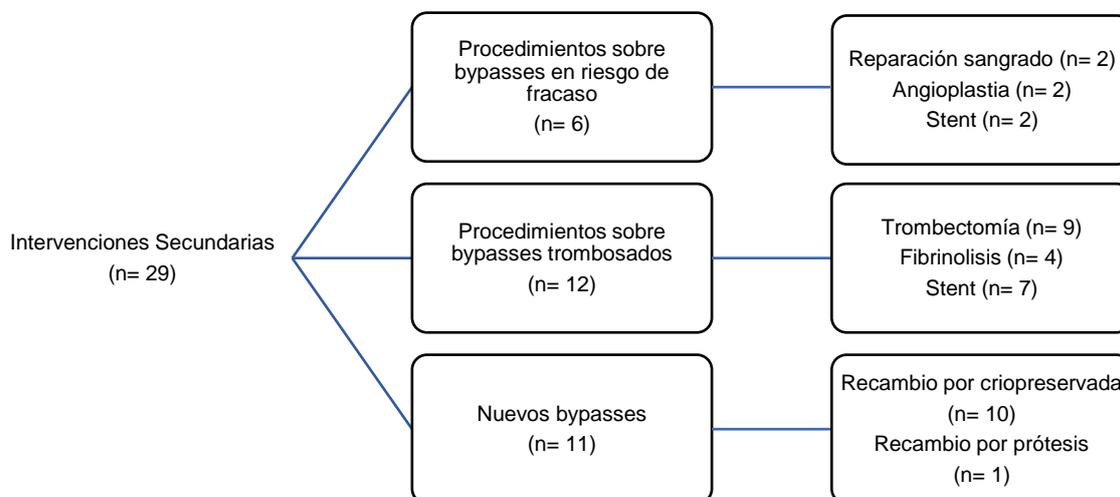


Figura 17. Cuadro con las intervenciones secundarias registradas durante el tiempo de seguimiento. Los procedimientos realizados sobre bypasses trombosados requirieron a menudo más de una técnica de revascularización, como fibrinólisis + stent o trombectomía + stent.

Dos pacientes presentaron sangrado activo por fallo en la anastomosis proximal, en relación con necrosis de la herida quirúrgica y proceso infeccioso previo, respectivamente, requiriendo ambos cirugía urgente reparadora.

Tres pacientes a seguimiento desde su implante presentaron degeneración aneurismática de sus bypasses de arteria criopreservada durante el periodo del estudio, lo que representa un 8,5% de la muestra. Los aneurismas se registraron a los 7, 28 y 22 meses, respectivamente, requiriendo dos de ellos intervención quirúrgica y encontrándose la restante a seguimiento. En estos tres casos no se incluyen los pacientes intervenidos previo al inicio del estudio y que presentaron degeneración durante el periodo de seguimiento, siendo analizados en su conjunto en el capítulo de degeneraciones aneurismáticas.

Si bien se ha buscado posibles relaciones entre las patologías asociadas y los pacientes que presentaron degeneración del injerto, el poder estadístico es muy escaso dado el tamaño muestral, por lo que no se pueden obtener conclusiones estadísticamente significativas. Así, como ejemplo, en la asociación diabetes versus degeneración aneurismática la muestra se conforma de 21 diabéticos y 14 no diabéticos. La proporción de la degeneración es 3/14 (0,21) para los no diabéticos y 0/21 (0,00) para los diabéticos. El valor p de la prueba exacta de Fisher es 0,056, pero el poder estadístico de este cálculo para una muestra de 35 pacientes es del 63%, por lo que solo acertaría clasificando menos de 2/3 de los mismos (figura 18).

Calculate: Power

Sample Size, n_B : 35

Power, $1 - \beta$: 0,6397

Type I error rate, α : 5%

0,21 Group 'A' Proportion, p_A

0,01 Group 'B' Proportion, p_B

0,66 Sampling Ratio, $\kappa = n_A/n_B$

Calculate

Figura 18. Cálculo del poder estadístico para la asociación diabetes mellitus versus degeneración aneurismática.

La permeabilidad de los bypasses es relativamente pobre, en consonancia con otras series publicadas en la literatura. La permeabilidad primaria estimada al año, los dos años y tres años fue de 58%, 38% y 38%, respectivamente, registrando una mediana de 12 meses (IQR= 2-27). La permeabilidad primaria asistida fue del 67%, 49% y 44% al año, dos años y tres años, respectivamente (la mediana fue de 13 meses y el IQR= 2-31). Finalmente, la permeabilidad secundaria para los mismos intervalos fue de 73%, 62% y 52%, respectivamente, la mediana de 16 meses, y el IQR=3-32 meses. Como puede observarse en las curvas de Kaplan-Meier de supervivencia para permeabilidad (figura 19), se registró un elevado número de trombosis durante el seguimiento, siendo escaso el porcentaje de bypasses funcionantes a medio y largo plazo. Si bien llama la atención que la curva de permeabilidad primaria asistida desciende por debajo de la de permeabilidad primaria, este hecho se debe a la mayor pérdida de pacientes a largo plazo en ese grupo de la muestra, en comparación con aquellos que no se intervinieron para mantener la permeabilidad del injerto.

Solamente cuatro pacientes (11,4%) requirieron amputación mayor, con una supervivencia de la extremidad del 94% al año y del 87% a los dos y tres años, respectivamente (figura 20). En relación con la supervivencia del paciente, ocho pacientes murieron durante el seguimiento, con tres muertes relacionadas con su patología isquémica/ infecciosa de base a los 9, 16 y 22 meses (mortalidad temprana). Los otros cinco exitus tuvieron lugar más avanzados en el seguimiento y estuvieron en relación con otras patologías, como ACV y cáncer. La supervivencia del paciente a uno, dos y tres años fue del 83%, 79% y 74%, respectivamente (figura 21).

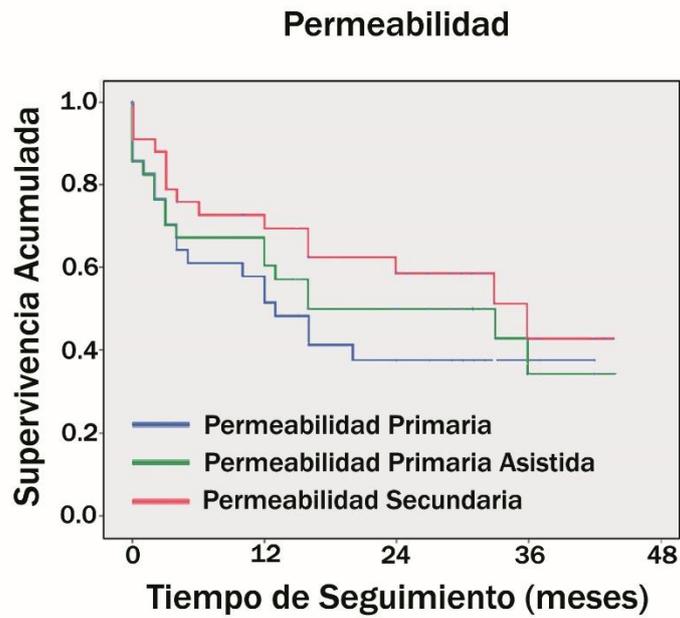


Figura 19. Curvas de Kaplan Meier de supervivencia reflejando la permeabilidad primaria, primaria asistida y secundaria de la muestra. Debido a la pérdida de seguimiento de pacientes, la permeabilidad primaria asistida baja por debajo de la permeabilidad primaria en el extremo de la curva.

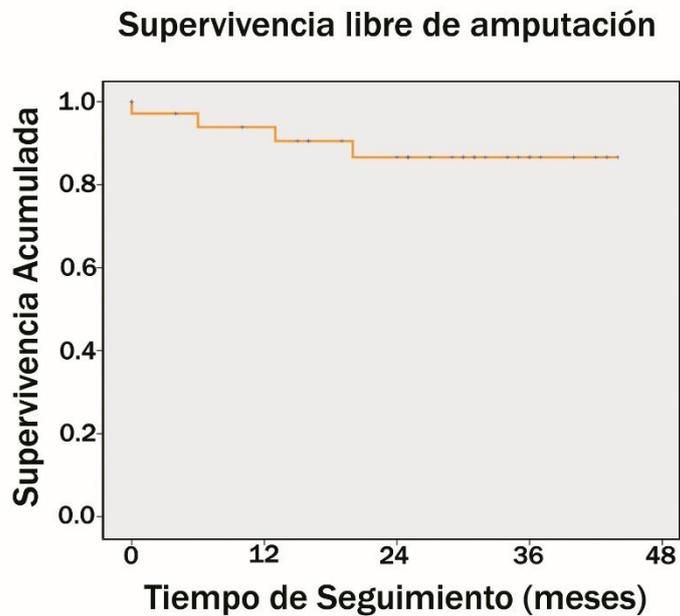


Figura 20. Curva de Kaplan Meier reflejando la supervivencia libre de amputación en nuestra muestra tras la cirugía de revascularización con arteria criopreservada.

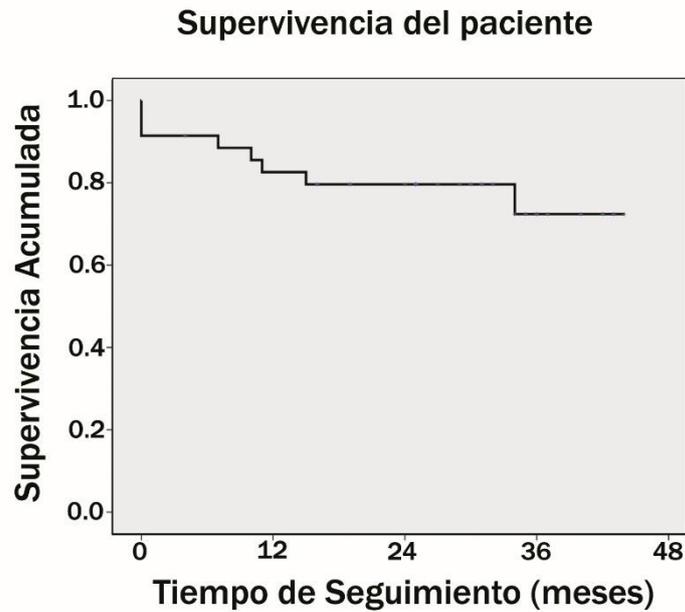


Figura 21. Curva acumulativa de Kaplan Meyer mostrando la supervivencia libre de muerte en nuestra muestra tras cirugía de revascularización con arteria criopreservada.

En la siguiente tabla se registran los resultados previamente descritos de permeabilidad y supervivencia libre de amputación y muerte a intervalos anuales. Se observa la diferencia patente entre las permeabilidades, por un lado, y los resultados en cuanto a mortalidad y amputaciones, por otro, que se acentúan con el tiempo de seguimiento.

Variable	1 año	2 años	3 años
Permeabilidad primaria	58%	38%	38%
Permeabilidad primaria asistida	67%	49%	44%
Permeabilidad secundaria	73%	62%	52%
Supervivencia libre de amputación	94%	87%	87%
Supervivencia libre de muerte	83%	79%	74%

Tabla 10. Resumen de las permeabilidades, la supervivencia libre de amputación y la supervivencia libre de muerte estimadas al año, dos años y tres años de la intervención.

ANÁLISIS DEL ESTUDIO POBLACIONAL

Si bien la muestra correspondiente al grupo de pacientes con controles seriados desde la intervención es relativamente pequeña en número (n=35), hay que tener en cuenta que el periodo de inclusión de 31 meses es relativamente corto en comparación con la mayoría de los estudios, aunque con la ventaja de ser un análisis prospectivo. Esto se debe, en parte, a que la revascularización mediante arterias criopreservadas es una técnica de recurso, para indicaciones muy específicas, y por tanto adquirir un tamaño muestral mayor requeriría un largo tiempo de inclusión de pacientes o la concurrencia de varios centros en el estudio. Tomando como referencia el artículo ya citado más relevante para nuestra investigación, Konrad y su equipo ⁹⁰ recogieron los resultados de 44 pacientes desde noviembre de 2002 hasta diciembre de 2012, en un intervalo de 121 meses.

La muestra poblacional es bastante representativa del paciente promedio afectado de isquemia crónica de miembros inferiores, con una relación clara entre dicha patología y el tabaquismo (65,7%), la hipertensión arterial (71,4%), la diabetes mellitus (62,8%) y la dislipemia (42,8%). Corresponden, por tanto, a los factores de riesgo principalmente asociados con la enfermedad arterial periférica ¹⁹⁴.

Además, un número significativo de estos pacientes presenta múltiples patologías, agrupando varios factores de riesgo cardiovascular. Aunque dicha asociación constituye igualmente una característica de los pacientes con isquemia crónica, la alta complejidad de muchos de ellos, con una elevada prevalencia de enfermedad renal crónica, EPOC, cardiopatía o cáncer, es indicativa de la dificultad añadida que muchos de ellos presentan de cara a su revascularización.

El 60% de los pacientes con indicación de bypass por isquémica crónica eran fumadores activos o lo habían sido previamente, frente a un 80% del grupo revascularizado por procesos infecciosos. Debemos recordar, igualmente, que 8 de los 10 pacientes con indicación por causa infecciosa eran igualmente isquémicos, por lo que, en total, un 65,7% de la muestra tenía el tabaquismo como antecedente. Estos resultados se aproximan a lo descrito en la literatura, con una prevalencia del 70% al 90% de tabaquismo actual o previo en pacientes con isquemia crónica de miembros inferiores ¹⁹⁵.

Concluimos, por tanto, que la muestra extraída del estudio es representativa de la población objetivo. Dicha representatividad permite extrapolar nuestros resultados a la hora de compararlos con otros estudios en pacientes isquémicos, aunque siempre con prudencia dado el reducido tamaño de la muestra.

La pluripatología es también una de las causantes de la escasa permeabilidad de muchos de estos bypasses de arteria criopreservada, que son indicados frecuentemente como último recurso ante el riesgo de pérdida de la extremidad, y a menudo sobre miembros que ya habían sido revascularizados previamente (82% de toda la muestra).

De la dificultad para revascularizar con éxito estos pacientes da buena cuenta el alto número de reintervenciones registradas durante el seguimiento, afectando al 42,8% de los mismos (15 de los 35 pacientes), y de los cuales 9 requirieron más de una reintervención.

Tampoco son favorables las cifras de permeabilidad, tanto Primaria, Primaria Asistida como Secundaria, demostrando en general una baja supervivencia de estos bypasses a medio y largo plazo. Como habíamos comentado en los capítulos iniciales, estos resultados van en consonancia con los descritos previamente en la literatura ²⁷. A pesar de que cifras tan bajas de permeabilidad en los trasplantes vasculares criopreservados podrían predecir un aumento en proporción de la pérdida de extremidad y la mortalidad en los pacientes, éste no se confirma posteriormente tanto en nuestro estudio como en otras series publicadas en la última década. De hecho, las cifras de salvamento de extremidad son claramente positivas (11,4% de amputación en nuestra muestra, con 94% y 87% de salvamento de extremidad al año y a los 3 años, respectivamente), con una mortalidad temprana y a los tres años aceptable, teniendo en cuenta la severidad de su arteriopatía periférica.

Debemos recordar que los pacientes con isquemia crítica de miembros inferiores presentan una morbi-mortalidad muy elevada, estimándose en la literatura médica que solo un 45% de los mismos va a permanecer vivo y con ambos miembros inferiores al año del diagnóstico ¹⁹⁵. Además, es bastante probable que estas cifras estén subestimadas en nuestro subgrupo poblacional ya que, como hemos visto, los pacientes candidatos a aloinjerto criopreservados son de alto riesgo, pluripatológicos, a menudo con cirugía de revascularización previa y cuyas posibilidades de optar por otras técnicas vasculares son muy escasas o nulas. Estas características no son necesariamente compartidas por todos los pacientes con isquemia crítica, ya que, como hemos mencionado previamente, se define como tal el dolor de la extremidad en reposo y/o la aparición de úlceras o gangrena de origen isquémico ¹⁹⁶. Muchos estudios han establecido como criterio de inclusión para isquemia crítica a grados III y IV de Fontaine, sin tener en cuenta otros factores hemodinámicos. Por tanto, pacientes con patología menos severa en términos de enfermedad arterioesclerótica sistémica han podido ser incluidos en algunas series, contribuyendo a una mejoría del pronóstico ^{21,197}.

Si tomamos como referencia la indicación infecciosa, en la que la isquemia crónica pasa a un segundo plano, el factor determinante no reside tanto en el peligro de perder la extremidad como en el riesgo de sepsis y/o hemorragia por rotura del bypass o fallo de la anastomosis, potencialmente fatales para el paciente. Esta situación se pone especialmente de manifiesto en las infecciones del sector aorto-iliaco, donde la mejor opción para reducir su altísima mortalidad (hasta un 76% con tratamiento conservador ³⁸) pasa por controlar y erradicar de forma definitiva la infección, desbridando el tejido nativo comprometido y retirando el material protésico afectado, si lo hubiera.

Resulta difícil, por tanto, comparar los bypasses protésicos de PTFE con los aloinjertos criopreservados en pacientes con cuadro isquémico y revascularización distal o en las situaciones de infección. Si bien existen artículos que informan de un salvamento de extremidad equivalente o incluso superior con PTFE ^{21,180}, lo cierto es que su indicación es poco probable en circunstancias de grave afectación arterial con escasa salida distal y en situaciones de infección franca. Recientemente se ha presentado un artículo comparando los resultados entre aloinjertos arteriales criopreservados e injertos protésicos vasculares con recubrimiento heparínico (PRH) en las revascularizaciones infrageniculares por isquemia crítica ²⁴. La conclusión de los firmantes es que el trasplante arterial criopreservado no es superior al PRH, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas en cuanto a permeabilidad y salvamento de la extremidad, y que por tanto el uso de aloinjertos podría no justificar el coste y la logística necesarios. Sin embargo, los propios autores reconocen que una de las limitaciones de su estudio radica en que los pacientes a los que se les implantaron arterias criopreservadas eran más propensos a pertenecer al estadio 4 de la clasificación Wifl (Wound, Ischemia and foot Infection), y, por tanto, con un mayor riesgo de pérdida de extremidad (figura 22). El Wifl es un sistema de clasificación integrado para extremidades inferiores en riesgo de amputación, desarrollado por la Society of Vascular Surgery y que va del estadio 1 (riesgo muy bajo) al 4 (riesgo alto).

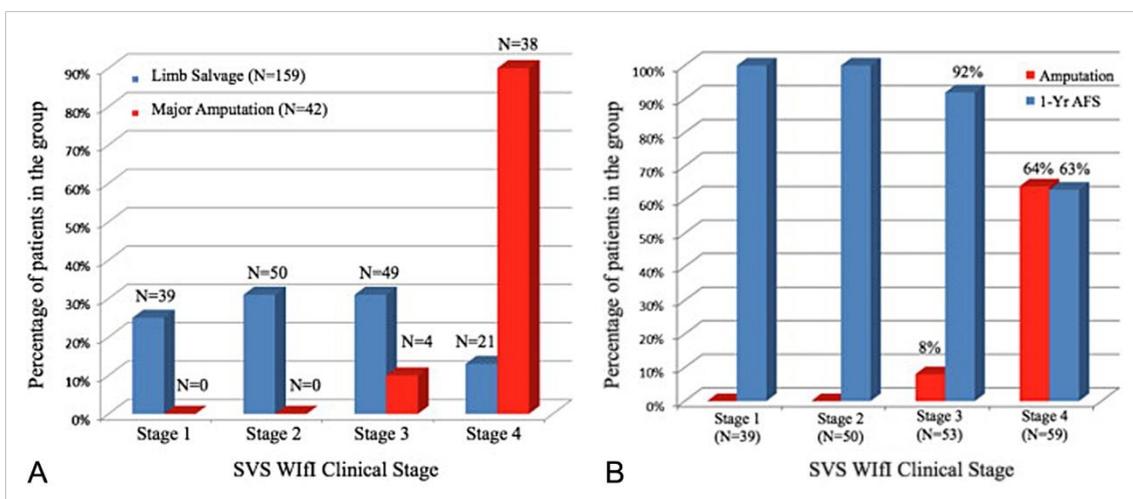


Figura 22. A: Distribución de las cohortes amputación y salvamento de extremidad entre los estadios 1 a 4 de la clasificación Wifl de la Society for Vascular Surgery (SVS). **B:** Incidencia de amputación mayor y supervivencia libre de amputación a un año (1-year amputation-free survival o 1-Yr AFS) dentro de los estadios 1 a 4 de la clasificación Wifl de la SVS. Obtenido de Zhan et al (2015) ¹⁹⁸.

La sensación general en la literatura, cuando se pone en entredicho el uso de los aloinjertos criopreservados, es que en muchas ocasiones se subestima precisamente el riesgo de estos pacientes. El empleo de trasplantes vasculares, siempre de recurso, tiene como objetivo el salvamento último de la

extremidad por el peligro inminente de amputación, o bien el control de la infección mediante una revascularización efectiva ante amenaza grave para la vida del paciente. Dicho esto, cualquier opción terapéutica que mejore las cifras de morbimortalidad tan elevadas en este subgrupo de pacientes debería ser tomada en cuenta, mucho más si los resultados, aun distando de ser ideales, permiten rescatar a un importante número de pacientes que de otro modo se verían avocados a amputación mayor o tratamiento antibiótico paliativo de su infección.

La falta de correlación entre los malos datos de permeabilidad y la aceptable tasa de amputaciones y muerte observados en nuestro estudio y en la literatura, puede encontrar una posible explicación en que los pacientes de la muestra podrían no haber necesitado el bypass inicialmente y el tratamiento conservador habría sido suficiente para evitar la amputación (error de indicación). Esta posibilidad, ya comentada en la introducción y postulada por Albertini, parece poco probable teniendo en cuenta que distintos equipos quirúrgicos presentan curvas similares de permeabilidad, amputación y supervivencia ²⁷. Habría que suponer que todos los centros sobrestiman el riesgo de isquemia crítica y sobreindican significativamente el uso de aloinjertos criopreservados, algo que parece en principio improbable a pesar de la heterogenicidad de los estudios sobre trasplantes vasculares.

Podría inferirse, igualmente, que a pesar de la escasa permeabilidad a medio y largo plazo, su efecto resulta suficiente los primeros meses como para permitir una cicatrización de las lesiones isquémicas y heridas quirúrgicas de amputación menor, o bien facilitar la resolución del cuadro infeccioso de base, lo que se traduciría en unos buenos resultados en cuanto a salvamento de extremidad y mortalidad.

Independientemente del criterio clínico empleado para definir la isquemia crítica, queda clara la importancia de una muy cuidadosa selección de pacientes para mejorar los resultados de permeabilidad de estos bypasses ⁵⁰. Aunque una interpretación estricta de esta estrategia mejoraría probablemente las cifras de permeabilidad de los aloinjertos criopreservados y permitiría optimizar los recursos disponibles (debemos recordar que las arterias criopreservadas son conductos escasos, caros y que requieren una importante logística para su procesado y conservación), surge el problema de que en muchos casos constituyen la mejor posibilidad de revascularización del paciente por muy escasa que esta sea. Por tanto, a menudo es necesario decidir si hacemos uso del conducto disponible con las mejoras opciones de permeabilidad (en este caso el aloinjerto criopreservado), si empleamos un injerto protésico con peores resultados en territorio distal, o si optamos por tratamiento médico conservador, con un riesgo muy significativo de pérdida de la extremidad.

Nuestro centro atesora una larga experiencia en el uso de arterias criopreservadas y un stock que, si bien no cubre toda la posible demanda de este tipo de bypasses y obliga puntualmente a abastecerse en bancos de

tejidos externos, al menos permite su uso cotidiano en nuestras intervenciones. Nuestra política en cuanto a la indicación de revascularización mediante bypasses de arteria criopreservada está basada, principalmente, en el riesgo real de amputación y menos en la predicción de permeabilidad, lo que nos permite sacar adelante un número mayor de pacientes a cambio de un mayor consumo de recursos. Obviamente, los criterios de indicación a la hora de usar un aloinjerto criopreservado van a variar dependiendo de cada centro. La disponibilidad de un Banco de Tejidos asignado al propio hospital, el número de donantes y la casuística de pacientes con isquemia crítica que son atendidos por el servicio influyen de forma determinante en cómo y cuándo se indica su uso. Hasta la futura disponibilidad de injertos desarrollados mediante bioingeniería, los aloinjertos criopreservados constituyen una opción de recurso para casos seleccionados en centros con disponibilidad de los mismos.

HALLAZGOS PRINCIPALES

(Análisis del estudio poblacional)

- El paciente candidato a trasplante de aloinjerto criopreservado es un subgrupo de pacientes pluripatológicos, con múltiples factores de riesgo, y que asocian un peligro inminente para su vida o la pérdida de extremidad, presentando escasas posibilidades de revascularización mediante otras técnicas o tipos de injerto.
- Resultados subóptimos en cuanto a permeabilidad primaria, primaria asistida y secundaria a medio y largo plazo, con una alta tasa de reintervenciones.
- La mortalidad a medio y largo plazo, así como el salvamento de la extremidad son, sin embargo, favorables, especialmente si tenemos en cuenta la evolución natural de estos pacientes con el tratamiento conservador.
- De cara a mejorar los resultados en la revascularización mediante arterias criopreservadas, es importante la correcta selección de los pacientes candidatos atendiendo a criterios clínicos y de disponibilidad de recursos, por lo que las indicaciones de uso pueden variar de unos centros a otros.

**RESULTADOS DE LA MUESTRA DE
PACIENTES CON DEGENERACIÓN
ANEURISMÁTICA DE SU ARTERIA
CRIOPRESERVADA**

INTRODUCCIÓN

En el grupo de pacientes que habían entrado en el estudio desde el inicio del mismo se registró la degeneración aneurismática de cuatro bypasses de arteria criopreservada en tres pacientes distintos. Al haberse realizado seguimiento desde el implante, disponemos de controles de imagen y anticuerpos seriados, salvo las excepciones atribuibles a la propia pérdida de seguimiento. En el paciente al que se realizó sustitución del bypass también se llevó a cabo análisis anatomopatológico e inmunohistoquímico, que se comentará en capítulos posteriores. Estas degeneraciones afectan, por tanto, a un 8,5% del total de pacientes que entraron en el estudio. Si contamos los 10 recambios de arteria criopreservada, como resultado obtenemos 4 degeneraciones en 45 bypasses analizados de forma prospectiva desde el inicio, lo que constituye un 8,8% del total.

El resto de las degeneraciones aquí presentadas proceden de analizar aquellos bypasses implantados previamente al inicio del estudio, pero que fueron diagnosticados de aneurismas en el trayecto del injerto durante el periodo de inclusión y seguimiento (desde noviembre de 2015 a diciembre de 2019). Se incluye, además, un apartado para la descripción específica de pacientes que sufrieron más de una degeneración aneurismática en distintos bypasses de arteria criopreservada, de gran interés para nuestro estudio y de la que no hemos encontrado antecedentes en la literatura.

La ausencia en muchos casos de imágenes obtenidas mediante Angio TC de los aneurismas se debe a que el seguimiento e indicación quirúrgica se llevaron a cabo mediante estudio ecográfico en el departamento de Diagnóstico Vascular No Invasivo de nuestro servicio. Igualmente, no se dispone de imágenes intraoperatorias de todas las intervenciones, especialmente en aquellas en las que se llevó a cabo cirugía urgente. Se incluyen las pruebas de imagen y las fotografías intraoperatorias de los casos en los que están disponibles.

PACIENTES CON DEGENERACIÓN ANEURISMÁTICA DEL ALOINJERTO CRIOPRESERVADO SEGUIDOS DESDE EL IMPLANTE

DEGENERACIÓN PROSPECTIVA A

- Correspondiente a la Degeneración Criopreservada 5 del análisis histopatológico y al paciente número 13 en el estudio de anticuerpos.

Primera degeneración aneurismática de una arteria criopreservada en este paciente.

Edad: 62 años en el momento del implante.

Antecedentes médicos:

- Exfumador
- HTA
- Hipertrigliceridemia
- Hiperuricemia
- Isquemia crónica de miembros inferiores (MMII)
- Aneurisma femoral derecho y poplíteo izquierdo

Indicación quirúrgica: Dolor en reposo (isquemia crónica de MMII grado III de Fontaine, estadio 4 de Rutherford, por trombosis de aneurisma poplíteo).

Intervenciones revascularizadoras previas: No

Tiempo de evolución hasta la degeneración aneurismática: 7 meses.

Tipo de bypass: Bypass desde 1ª porción poplíteo a tibial posterior.

Tratamiento de la degeneración: Recambio del bypass por nueva arteria criopreservada. Dicho injerto presentó sucesivamente una degeneración aneurismática a los 14 meses, con trombosis del mismo durante el seguimiento.

	1 mes	6 meses	9 meses
Anastomosis Proximal	5,9 mm	10,0 mm	15,0 mm
Rodilla	5,7 mm	18,0 mm	21,0 mm
Tercio Proximal de la Pierna	5,1 mm	20,0 mm	21,0 mm
Anastomosis Distal	4,5 mm	10,0 mm	10,0 mm

Tabla 11. Registro de seguimiento ecográfico del primer aloinjerto de arteria criopreservada hasta el recambio del bypass a los 10 meses. Las medidas son del diámetro en mm del segmento referido. El paciente no acudió al control de los 3 meses.

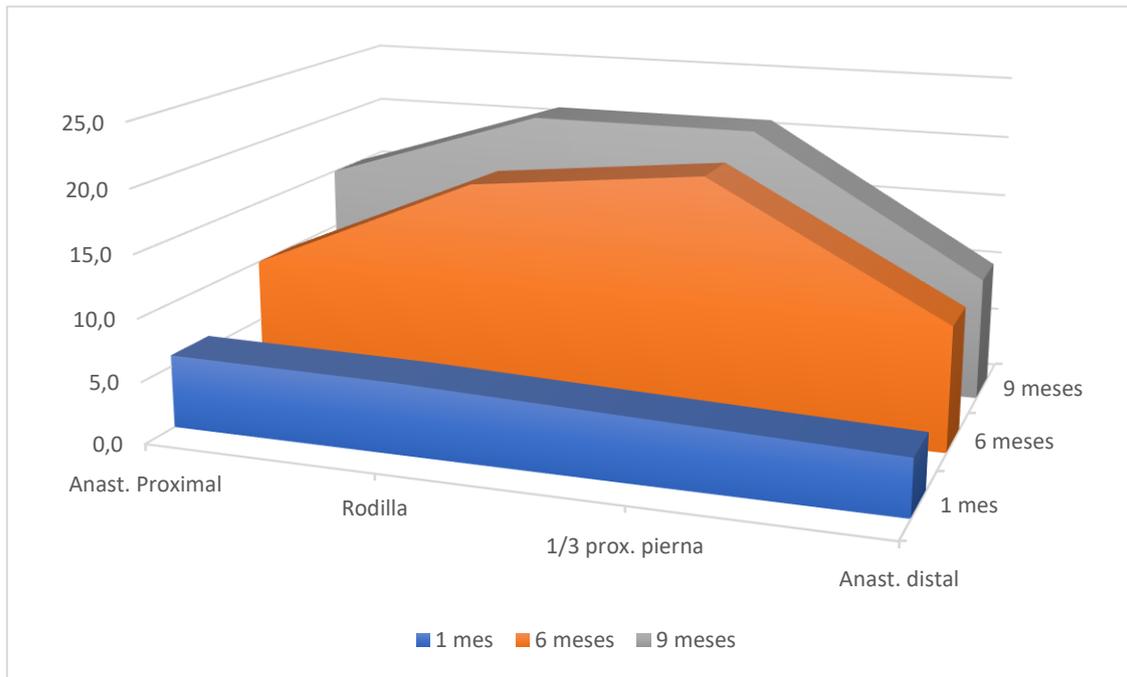


Figura 23. Gráfica representando visualmente el crecimiento por segmentos del diámetro del aloinjerto en las sucesivos controles ecográficos. En la vertical, tamaño del segmento en mm. El paciente no acudió al control de imagen a los 3 meses del implante.

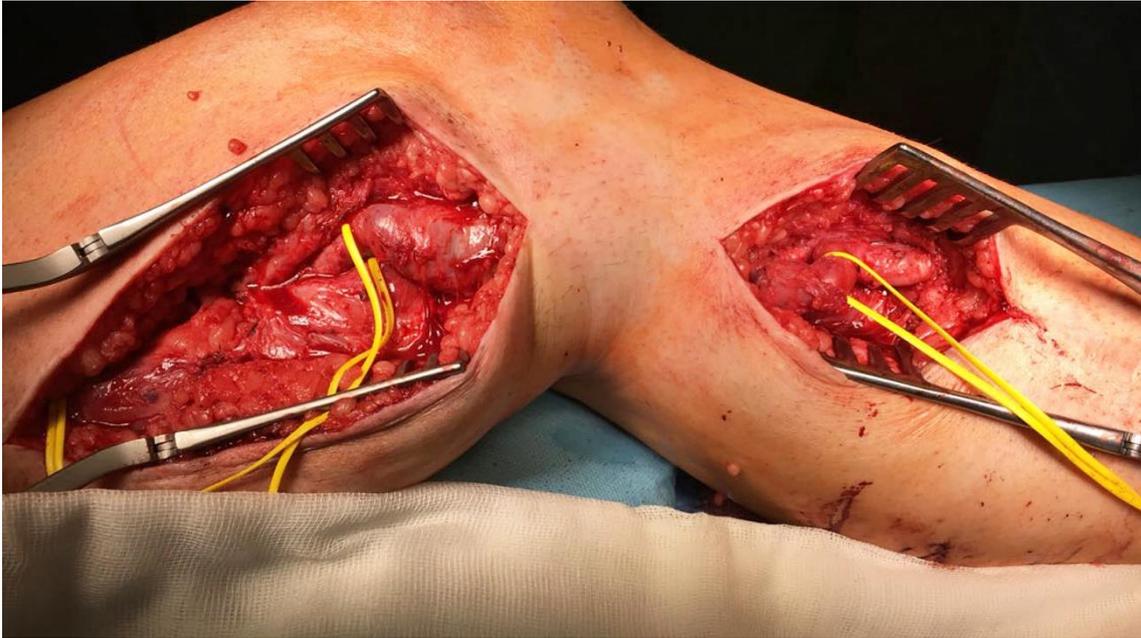


Figura 24. Imagen intraoperatoria de la arteria criopreservada dilatada. Disección supra e infragenicular. Se han pasado dos vessel loops (en amarillo) alrededor del injerto.



Figura 25. Segmento distal explantado de la arteria criopreservada degenerada.

El paciente presentó pérdida de seguimiento desde el tercer mes post implante de la nueva arteria criopreservada hasta los 14 meses del mismo. En ese momento se detectan varias degeneraciones aneurismáticas en la ecografía (tabla 12), que se confirman posteriormente en el Angio TC (figura 26).

	3 meses	14 meses
Anastomosis Proximal	8,5 mm	26,1 mm
1ª Porción Poplítea	12 mm	37,5 mm
Tercio Proximal de la Pierna	7 mm	32,1 mm
Anastomosis Distal	6 mm	26,2 mm

Tabla 12. Registro de seguimiento ecográfico del segundo aloinjerto de arteria criopreservada. Existe una pérdida de seguimiento desde los 3 a los 14 meses, con importante aumento del calibre y múltiples degeneraciones aneurismáticas. Las medidas son del diámetro en mm del segmento referido.

El paciente fue programado para nuevo recambio de bypass criopreservado, pero la cirugía no llegó a realizarse al trombosarse el aloinjerto antes de poder llevar a cabo la misma. El Angio TC constató, además, aneurismas de la arteria femoral superficial y profunda nativas del miembro inferior contralateral. A estas dilataciones hay que añadirle el aneurisma de arteria poplítea trombosado que originó el cuadro isquémico inicial y la indicación de revascularización, por lo que el paciente fue diagnosticado de distrofia polianeurismática.

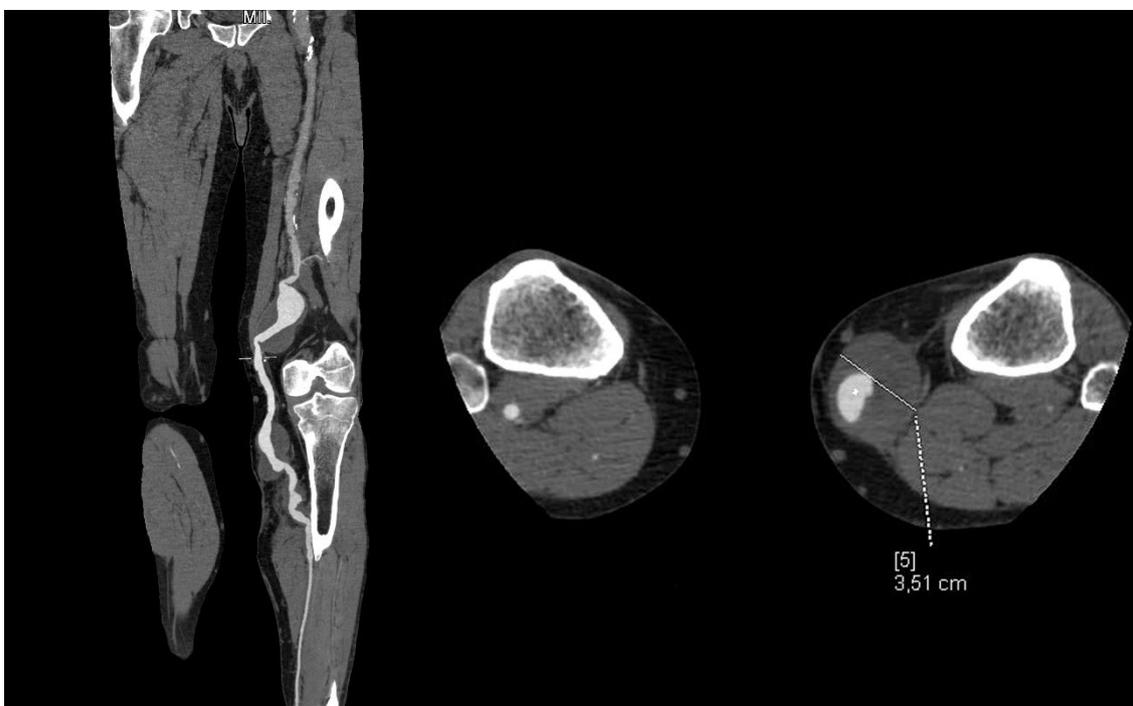


Figura 26. Angio TC de miembros inferiores. Antecedente de recambio del bypass por degeneración de la arteria criopreservada previa. Se observan múltiples dilataciones aneurismáticas en el trayecto del nuevo aloinjerto criopreservado, con un calibre máximo de 3,51 cm y abundante trombo mural.

DEGENERACIÓN PROSPECTIVA B

Primera degeneración aneurismática de una arteria criopreservada en este paciente.

Edad: 66 años en el momento del implante.

Antecedentes médicos:

- Exfumador
- Isquemia crónica de miembros inferiores
- Artritis reumatoide
- Adenocarcinoma de colon

Indicación quirúrgica: Lesión isquémica (isquemia crónica de MMII grado IV de Fontaine, estadio 6 de Rutherford).

Intervenciones revascularizadoras previas: Tromboendarterectomía (TEA) femoral+ Bypass a femoral profunda + Bypass a 1ª porción poplítea.

Tiempo de evolución hasta la degeneración aneurismática: 28 meses.

Tipo de bypass: Bypass Femoro-Poplíteo a 3ª porción.

Tratamiento de la degeneración: Degeneración en seguimiento.

	1 mes	3 m.	9 m.	12 m.	19 m.	27 m.	31 m.
Anast. Proximal	11,7 mm	18,0 mm	18,0 mm	18,0 mm	18,6 mm	10,0 mm	14,0 mm
2 cm	15,8 mm	15,9 mm	14,7 mm	11,0 mm	10,8 mm	10,0 mm	10,0 mm
20 cm	13,0 mm	10,0 mm	12,0 mm				
30 cm	8,0 mm	10,0 mm	10,0 mm				
Rodilla	10,0 mm	23,0 mm	25,0 mm				
Anast. Distal	8,0 mm	8,0 mm	12,4 mm	10,0 mm	10,0 mm	7,0 mm	7,0 mm

Tabla 13. Registro del seguimiento ecográfico del bypass de arteria criopreservada. Las medidas son del diámetro en mm del segmento referido y el tiempo de seguimiento en meses. Anast.: anastomosis. El paciente no acudió al control de imagen a los 6 meses del implante. Obsérvese la relativa estabilidad del diámetro del injerto durante casi dos años, con rápido crecimiento posterior del segmento correspondiente a la rodilla (ver figura 27).

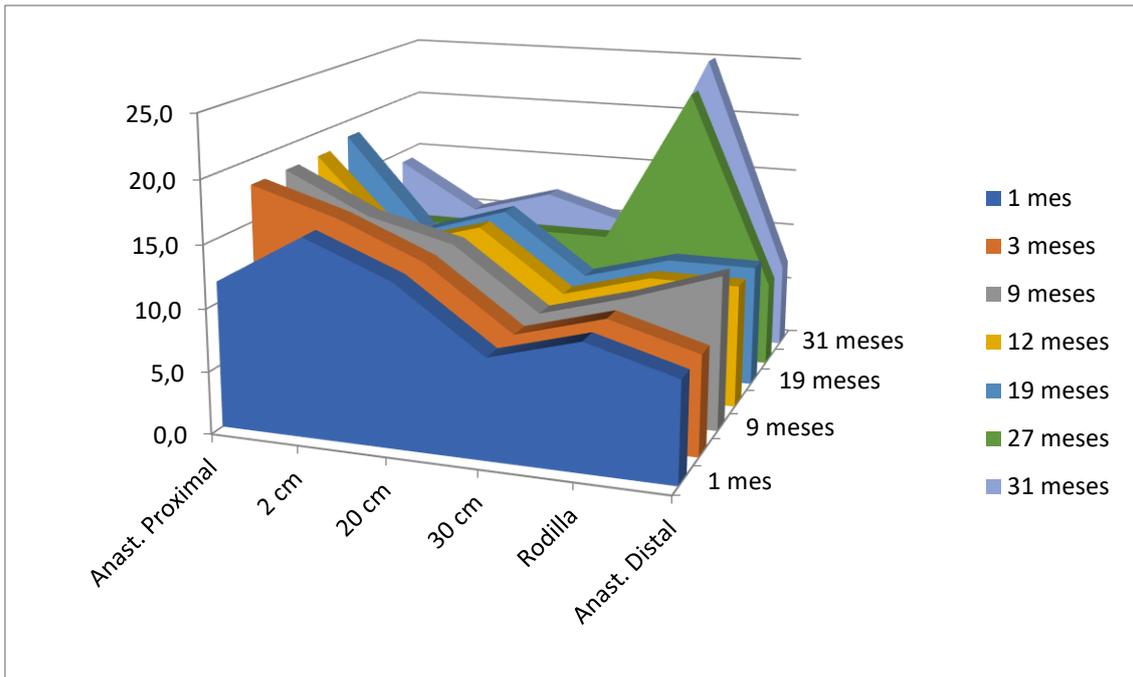


Figura 27. Gráfica representando visualmente el crecimiento por segmentos del diámetro del aloinjerto en las sucesivos controles ecográficos. En la vertical, tamaño del segmento en mm. El paciente no acudió al control de imagen a los 6 meses del implante. Las inconsistencias en el registro de un control ecográfico a siguiente se deben a la variabilidad interoperador de la ecografía.

El paciente continúa a seguimiento ecográfico al cierre del estudio.

DEGENERACIÓN PROSPECTIVA C

Primera degeneración aneurismática de una arteria criopreservada en este paciente.

Edad: 84 años en el momento del implante.

Antecedentes médicos:

- HTA
- Dislipemia
- Síndrome protrombótico (AIT, TEPA, Trombosis venosa de la retina, Trombosis subclavia izquierda)
- Isquemia crónica de miembros inferiores
- Neumoconiosis
- Hipotiroidismo

Indicación quirúrgica: Dolor en reposo (isquemia crónica de MMII grado III de Fontaine, estadio 4 de Rutherford).

Intervenciones revascularizadoras previas: No

Tiempo de evolución hasta la degeneración aneurismática: 22 meses.

Tipo de bypass: Bypass Femoral superficial-Tibial posterior.

Tratamiento de la degeneración: Trombosis aguda: Fibrinólisis + stent recubierto tipo Viabahn® (W.L. Gore y Asociados, Newark, Delaware, Estados Unidos). El bypass volvió a trombosarse posteriormente.

	1 mes	3 m.	6 m.	10 m.	13 m.	18 m.	22 m.
Anast. Proximal	9,8 mm	9,9 mm	11,1 mm	11,1 mm	11,0 mm	10,0 mm	11,0 mm
8 cm	8,8 mm	8,6 mm	9,4 mm	11,5 mm	11,0 mm	11,0 mm	11,0 mm
16 cm	8,3 mm	9,0 mm	10,1 mm	12,0 mm	12,3 mm	14,0 mm	20,0 mm
24 cm	6,8 mm	9,0 mm	8,8 mm	12,0 mm	10,0 mm	13,0 mm	13,0 mm
19 cm	6,8 mm	8,0 mm	8,4 mm	12,0 mm	10,0 mm	10,0 mm	10,0 mm
Anast. Distal	6,8 mm	6,5 mm	7,9 mm	10,0 mm	9,0 mm	10,0 mm	10,0 mm

Tabla 14. Registro del seguimiento ecográfico del bypass de arteria criopreservada. Las medidas son del diámetro en mm del segmento referido. Rápida degeneración de un único segmento a los 22 meses, que provocó la trombosis del injerto (ver figuras 28 y 29).

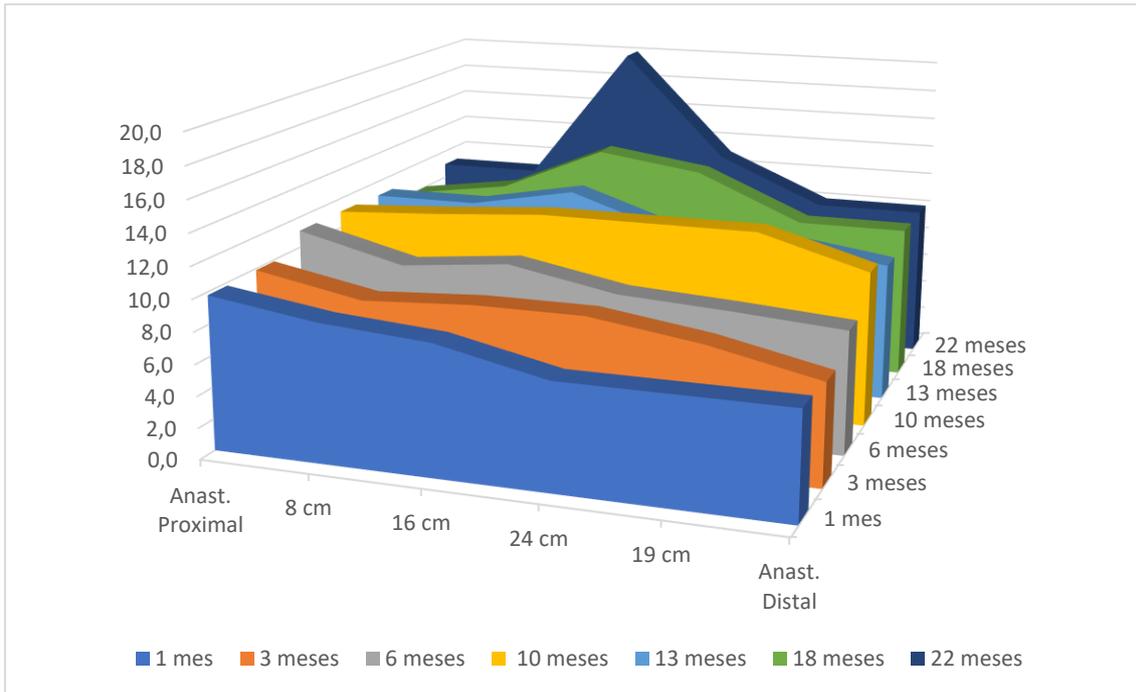


Figura 28. Gráfica representando visualmente el crecimiento por segmentos del diámetro del aoinjerto en las sucesivos controles ecográficos. En la vertical, tamaño del segmento en mm. Puede observarse el crecimiento brusco a los 22 meses de un segmento aislado del bypass.



Figura 29. Arteriografía de control post fibrinolisis. Se observa la dilatación aneurismática focal de 2 cm cerca del orificio de Hunter, origen de la trombosis del bypass. El tratamiento consistió en el implante de un stent recubierto tipo Viabahn®, que se trombosó a los dos meses.

**RESUMEN DE LAS DEGENERACIONES ANEURISMÁTICAS EN
ALOINJERTOS CRIOPRESERVADOS SEGUIDOS DESDE EL IMPLANTE**

	Paciente A	Paciente B	Paciente C
Edad	62	66	84
Indicación Quirúrgica	Dolor en reposo	Lesión isquémica	Dolor en reposo
N.º de Degeneraciones	Primera	Primera	Primera
Tiempo desde Intervención	7 meses	28 meses	22 meses
Tipo de Bypass	BP 1ª PP- T.Post	BP F-P a 3ªPP	BP Fs-T.Post

Tabla 15. Resumen de las características de los pacientes con implante de arteria criopreservada en el periodo de estudio que presentaron degeneración aneurismática durante el seguimiento. **BP:** Bypass. **1ªPP:** 1ª porción poplítea. **T. Post:** arteria tibial posterior. **F-P:** femoro-poplíteo. **Fs:** femoral superficial. La segunda degeneración aneurismática en el Paciente A se analiza en el apartado de Degeneraciones Múltiples.

Las características de los tres pacientes son muy heterogéneas y no presentan claros puntos en común. El tiempo de evolución hasta la aparición de degeneraciones aneurismáticas fue también muy variable.

HALLAZGOS PRINCIPALES

(Degeneraciones de trasplantes vasculares realizados durante el periodo del estudio)

1. El análisis de los tres pacientes no arroja puntos en común significativos.
2. Los injertos presentaron dilataciones multifocales o aisladas.
3. El tiempo de evolución hasta la aparición de las degeneraciones aneurismáticas varía de unos pocos meses a años.
4. El tiempo de evolución más corto (7 meses) se registró en el paciente con distrofia polianeurismática.

Estas características se mantienen, como veremos, en el conjunto de los casos registrados durante el periodo del estudio.

PACIENTES CON DOS O MÁS DEGENERACIONES DE ALOINJERTOS ARTERIALES CRIOPRESERVADOS

A continuación se describen los pacientes que presentaron más de una degeneración aneurismática durante el registro del estudio, tanto sobre un segundo bypass a otro nivel como sobre un recambio de arteria criopreservada. No toma en consideración degeneraciones de múltiples segmentos dentro del mismo aloinjerto. Se incluyen tanto a pacientes que realizaron el implante de bypass criopreservado durante el periodo del estudio como a aquellos con cirugía de trasplante arterial previo pero que desarrollaron una degeneración del aloinjerto durante el tiempo de seguimiento.

DEGENERACIÓN MÚLTIPLE. PACIENTE 1

- Correspondiente a la *Degeneración Prospectiva A* vista anteriormente, a la *Degeneración Criopreservada 5* del análisis histopatológico, y al paciente número 13 en el análisis de anticuerpos.

Número total de degeneraciones aneurismáticas: 2

Edad: 62 años en el momento del primer implante.

Antecedentes médicos:

- Exfumador
- HTA
- Hipertrigliceridemia
- Hiperuricemia
- Isquemia crónica de miembros inferiores
- Aneurisma femoral derecho y poplíteo izquierdo

Indicación quirúrgica: Dolor en reposo (isquemia crónica de MMII grado III de Fontaine, estadio 4 de Rutherford, por trombosis de aneurisma poplíteo).

Intervenciones revascularizadoras previas: No

Tiempo de evolución hasta la 1ª degeneración aneurismática: 7 meses

Tiempo de evolución hasta nuevo aneurisma desde el recambio: 14 meses

Tipos de bypass:

- Aloinjerto inicial: Bypass desde 1ª porción poplíteo a tibial posterior.
- Recambio: Bypass desde 1ª porción poplíteo a tibial posterior más distal.

Tratamiento de la 1ª degeneración: Recambio del bypass por nueva arteria criopreservada.

Tratamiento de la 2ª degeneración: Se trombosó. No nuevas cirugías de revascularización.

DEGENERACIÓN MÚLTIPLE. PACIENTE 2

- Correspondiente a la Degeneración Criopreservada 3 del análisis histopatológico.

Número total de degeneraciones aneurismáticas: 2

Edad: 67 años en el momento del primer implante.

Antecedentes médicos:

- Fumador
- HTA
- Dislipemia
- Cardiopatía isquémica tipo infarto agudo de miocardio.
- Isquemia crónica de miembros inferiores

Indicación quirúrgica: Dolor en reposo (isquemia crónica de MMII grado III de Fontaine, estadio 4 de Rutherford).

Intervenciones revascularizadoras previas: Múltiples en ambos MMII desde 1981.

- Simpatectomía lumbar + TEA ilio-femoral izquierda.
- Bypass femoro-femoral derecha-izquierda + femoro-poplíteo a 3ª porción izquierda.
- Bypass femoro-tronco tibioperoneo en miembro inferior izquierdo.
- Fibrinolisis del bypass femoro-femoral. Amputación supracondílea izquierda.
- Endarterectomía aorto-iliaca + bypass ilio-femoral profunda derecha.
- Endoprótesis aorto-monoiliaca.
- Bypass desde aorta infrarenal en termino-lateral a bypass ilio-femoral profunda previo.

Tiempo de evolución hasta la 1ª degeneración aneurismática: 27 meses

Tiempo de evolución hasta nuevo aneurisma desde el recambio: 17 meses

Tipos de bypass:

- Aloinjerto inicial: Bypass desde femoral común a tibial posterior (2 criopreservadas).
- Primer recambio: Bypass desde femoral común a tibial posterior (2 criopreservadas).
- Segundo recambio: Bypass desde femoral común a tibial posterior (2 criopreservadas).

Tratamiento de la 1ª degeneración: Recambio del bypass por nueva arteria criopreservada.

Tratamiento de la 2ª degeneración: Recambio del bypass por nueva arteria criopreservada (figuras 30, 31 y 32). Exitus a los 28 meses por causa no relacionada con su patología vascular, con bypass permeable y sin degeneraciones.



Figura 30. Imagen intraoperatoria. Tratamiento de la segunda degeneración aneurismática sobre bypass de arteria criopreservada desde femoral común a tibial posterior. Obsérvense las dilataciones aneurismáticas en tercio medio de muslo y rodilla, con sufrimiento cutáneo y riesgo de rotura a ese nivel.

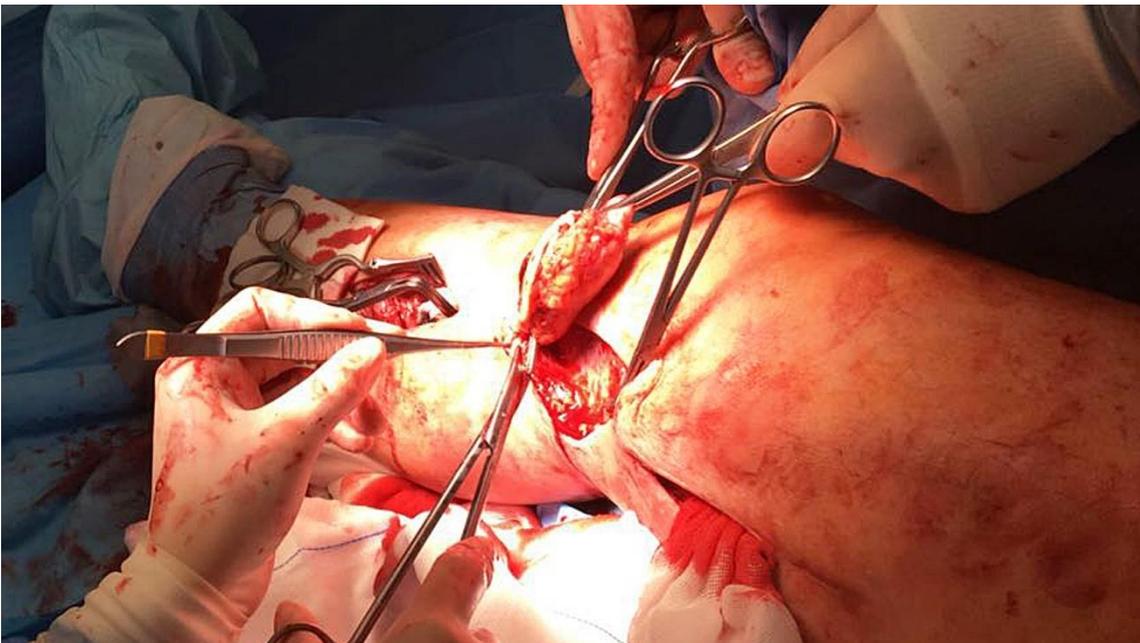


Figura 31. Imagen intraoperatoria de la segunda degeneración aneurismática. Resección del aneurisma en relación con segmento cutáneo afectado a nivel de la rodilla. Control mediante clampaje de la primera porción poplítea y próximo a la anastomosis distal sobre arteria tibial posterior.



Figura 32. Angio TC mostrando el resultado del tratamiento de la segunda degeneración: bypass femoro-tibial posterior en miembro inferior derecho mediante dos criopreservadas (segundo recambio). Obsérvense las múltiples cirugías previas, incluida la trombosis de la endoprótesis aorto-moniliaca y del bypass femoro-femoral de Dacron®. El paciente presenta amputación supracondílea del miembro inferior izquierdo.

DEGENERACIÓN MÚLTIPLE. PACIENTE 3

- Correspondiente a la Degeneración Criopreservada 2 del análisis histopatológico.

Número de degeneraciones aneurismáticas: 3

Edad: 64 años en el momento del primer implante.

Antecedentes médicos:

- Fumador
- HTA
- Hipercolesterolemia
- Diabetes mellitus
- Hiperuricemia

Indicación quirúrgica: Aneurismas poplíteos bilaterales

Intervenciones revascularizadoras previas: No

Miembro inferior izquierdo:

Tiempo de evolución hasta la 1ª degeneración aneurismática: 14 meses (1ª degeneración)

Tiempo de evolución hasta nuevo aneurisma desde el recambio: 27 meses (2ª degeneración)

Tipos de bypass:

- Aloinjerto inicial: Bypass desde femoral superficial izquierda a tibial posterior supramaleolar en miembro inferior izquierdo.
- Primer recambio: Recambio del bypass previo por nueva criopreservada.
- Segundo recambio: Recambio del bypass previo por nueva criopreservada.

Tratamiento de la 1ª degeneración: Recambio del bypass por nueva arteria criopreservada.

Tratamiento de la 2ª degeneración: Recambio del bypass por nueva arteria criopreservada (trombosis del mismo en el postoperatorio).

Miembro inferior derecho:

Tiempo de evolución hasta la degeneración aneurismática de ese aloinjerto criopreservado: 52 meses (3ª degeneración)

Tipos de bypass:

- Aloiinjerto inicial: Bypass de arteria criopreservada desde femoral superficial a peronea + secuencial a tibial posterior en miembro inferior derecho.

Tratamiento de la 3ª degeneración: Recambio por bypass no criopreservado.

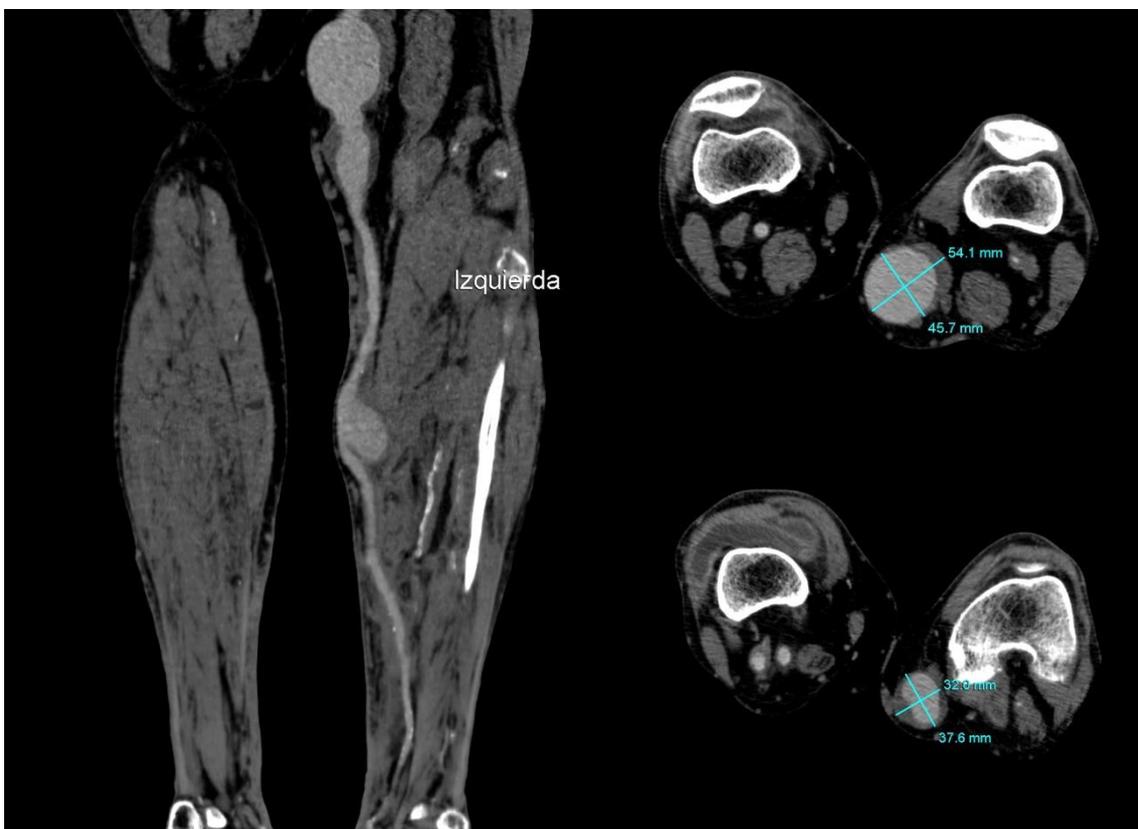


Figura 33. Angio TC mostrando la primera degeneración de arteria criopreservada (bypass desde femoral superficial izquierda a tibial posterior supramaleolar en miembro inferior izquierdo). Múltiples aneurismas a lo largo de la longitud del aloinjerto, el mayor localizado próximo a la articulación de la rodilla, de 54 mm de diámetro.

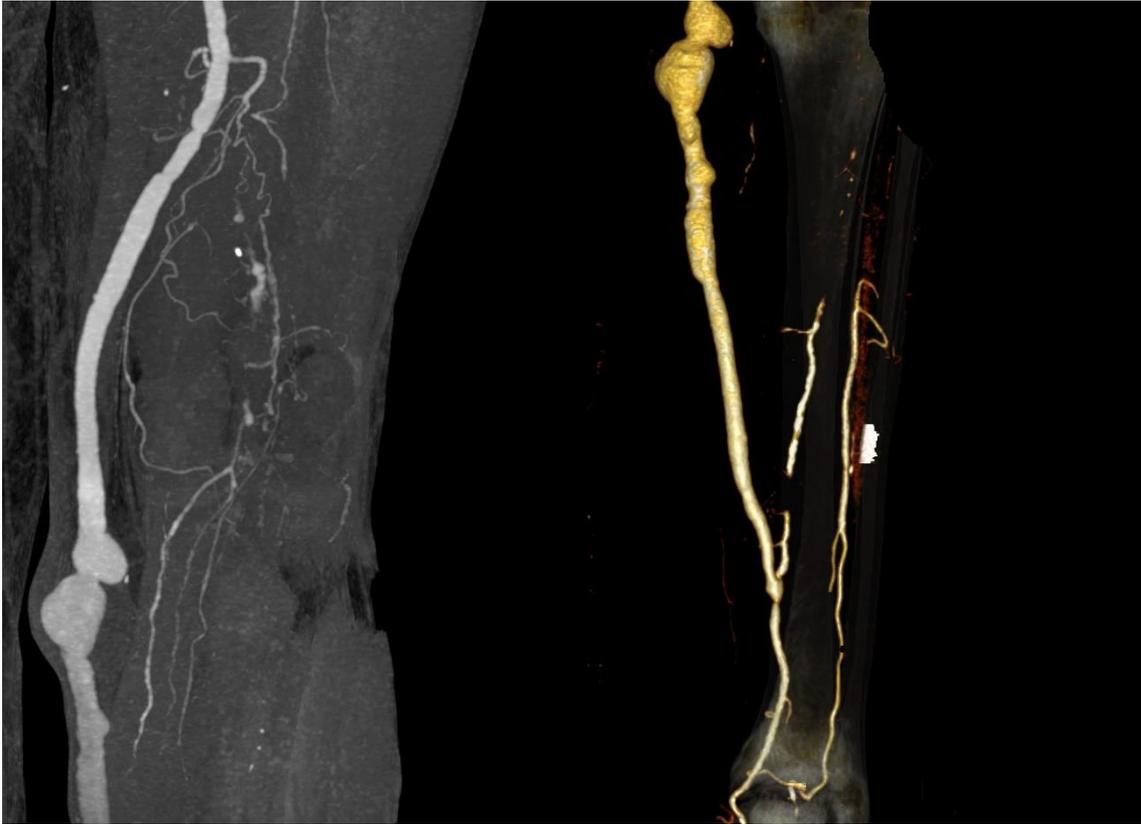


Figura 34. A la izquierda, Angio TC mostrando la segunda degeneración de arteria criopreservada (nuevo recambio de bypass desde femoral superficial izquierda a tibial posterior supramaleolar en miembro inferior izquierdo). A la derecha, reconstrucción en 3D del segmento arterial afectado.

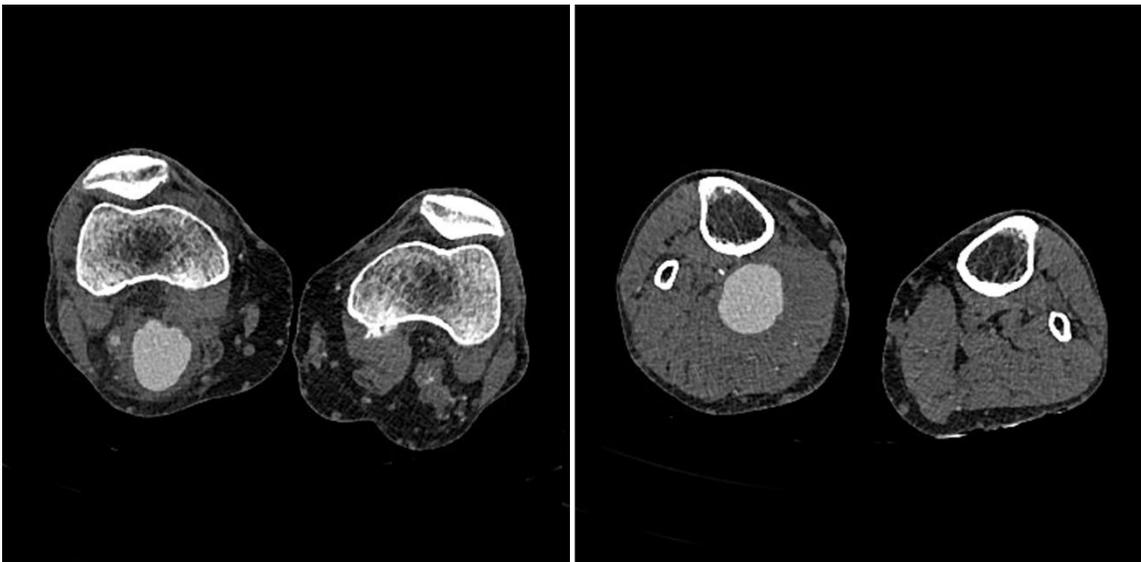


Figura 35. Angio TC mostrando la tercera degeneración de arteria criopreservada en el mismo paciente, en esta ocasión en la extremidad contralateral (bypass desde femoral superficial a peronea + secuencial a tibial posterior en miembro inferior derecho). Múltiples degeneraciones a lo largo de la longitud del injerto. Las imágenes muestran cortes transversales a nivel para (izquierda) e infragenicular (derecha).

DEGENERACIÓN MÚLTIPLE. PACIENTE 4

- Correspondiente a la Degeneración Criopreservada 7 del análisis histopatológico.

Número de degeneraciones aneurismáticas: 2

Edad: 71 años en el momento del primer implante.

Antecedentes médicos:

- Exfumadora
- HTA
- Fibrilación auricular
- Isquemia crónica de miembros inferiores

Indicación quirúrgica: Dolor en reposo (isquemia crónica de MMII grado III de Fontaine, estadio 4 de Rutherford).

Intervenciones revascularizadoras previas:

- Bypass femoro-poplíteo a 1ª porción con PTFE
- Trombectomía del bypass previo + bypass de 1ª a 3ª porción poplíteo con vena safena interna.

Tiempo de evolución hasta la 1ª degeneración aneurismática: 23 meses

Tiempo de evolución hasta nuevo aneurisma desde el recambio: 32 meses

Tipos de bypass:

- Aoinjerto inicial: Bypass desde iliaca externa a tibial anterior (2 criopreservadas)
- Primer Recambio: Recambio parcial desde tercio proximal de muslo a la anastomosis distal.
- Segundo Recambio: Bypass femoro-tibial anterior (2 criopreservadas).

Tratamiento de la 1ª degeneración: Recambio del bypass por nueva arteria criopreservada.

Tratamiento de la 2ª degeneración: Recambio del bypass por nueva arteria criopreservada (bypass permeable y sin degeneraciones, a seguimiento).

El seguimiento de imagen se realizó mediante ecografía.



Figura 36. Primera degeneración aneurismática. Imagen intraoperatoria de la preparación del campo quirúrgico. Obsérvense las dilataciones en tercio medio de muslo y rodilla

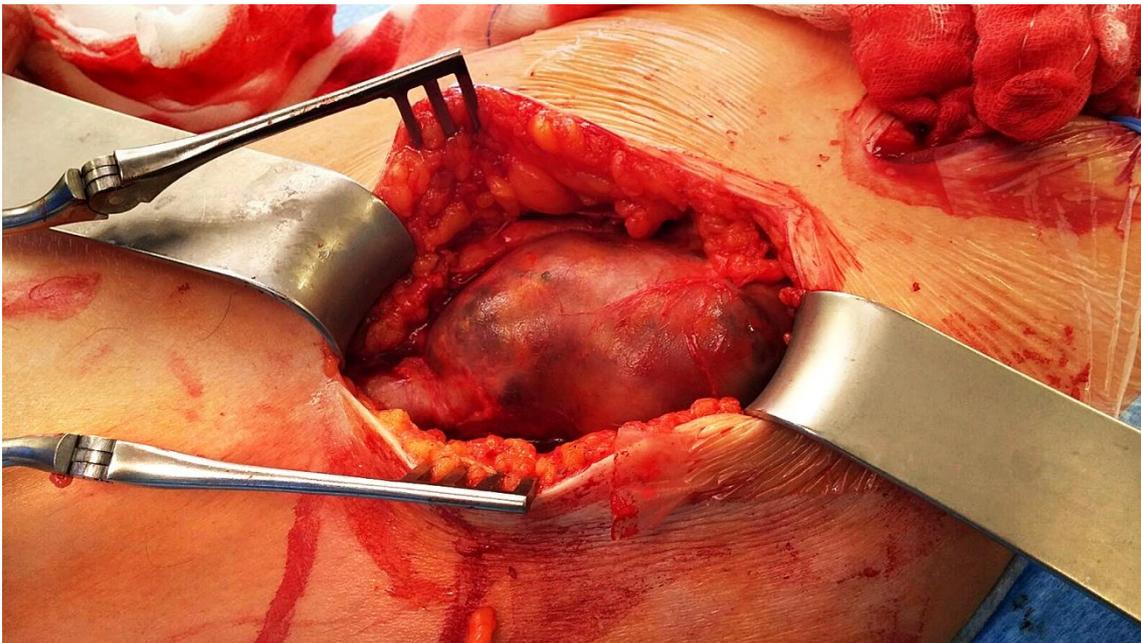


Figura 37. Imagen intraoperatoria de la primera degeneración. Exposición quirúrgica de la dilatación aneurismática en muslo, previo control proximal.

DEGENERACIÓN MÚLTIPLE. PACIENTE 5

Número de degeneraciones aneurismáticas: 2

Edad: 48 años en el momento del primer implante.

Antecedentes médicos:

- Fumador
- HTA
- Diabetes mellitus tipo 1
- Isquemia crónica de miembros inferiores

Indicación quirúrgica: Lesión isquémica (isquemia crónica de MMII grado IV de Fontaine, estadio 6 de Rutherford).

Intervenciones revascularizadoras previas:

- Bypass aorto-bifemoral de Dacron® (tereftalato de polietileno) + prolongación con Gore-Tex® (politetrafluoroetileno expandido. W.L. Gore & Associates, Flagstaff, USA) a 1ª porción poplítea izquierda

Tiempo de evolución hasta la 1ª degeneración aneurismática: 53 meses

Tiempo de evolución hasta nuevo aneurisma desde el recambio: 68 meses (Degeneración aneurismática + estenosis)

Tipos de bypass:

- Aoinjerto inicial: Bypass femoro-tronco tibioperoneo
- Primer Recambio: Recambio parcial desde 1ª a 3ª porción poplítea

Tratamiento de la 1ª degeneración: Recambio del bypass por nueva arteria criopreservada.

Tratamiento de la 2ª degeneración: Bypass trombosado. Tratamiento conservador.

El seguimiento de imagen se realizó mediante ecografía.

DEGENERACIÓN MÚLTIPLE. PACIENTE 6

- Correspondiente a la Degeneración Criopreservada 8 del análisis histopatológico

Número de degeneraciones aneurismáticas: 3

Edad: 60 años en el momento del primer implante.

Antecedentes médicos:

- HTA
- Distrofia polianeurismática

Indicación quirúrgica: Aneurisma poplíteo

Intervenciones revascularizadoras previas: No

Tiempo de evolución hasta la 1ª degeneración aneurismática: 67 meses (1ª degeneración. Pseudoaneurisma anastomótico)

Tiempo de evolución hasta nuevo aneurisma desde el recambio: 26 meses (2ª degeneración)

Tiempo de evolución hasta nuevo aneurisma desde el recambio anterior: 57 meses (3ª degeneración)

Tipos de bypass:

- Aloinjerto inicial: Bypass mixto arteria criopreservada – vena safena interna en anastomosis distal, desde femoral superficial a tibial posterior supramaleolar en miembro inferior izquierdo.
- Primer recambio: Recambio del bypass previo por nuevo aloinjerto (2 arterias criopreservadas)
- Segundo recambio: Resección del segmento afectado y recambio por vena safena proximal en termino-terminal
- Tercer recambio: bypass mixto femoro-peroneo de criopreservada + segmento de vena safena interna.

Tratamiento de la 1ª degeneración: Recambio del bypass por nueva arteria criopreservada.

Tratamiento de la 2ª degeneración: Recambio del segmento aneurismático con interposición de vena safena interna proximal. Posterior trombosis, que requirió recambio por bypass mixto femoro-peroneo de criopreservada + segmento de vena safena interna.

Tratamiento de la 3ª degeneración: Nueva trombosis. No se realizó tratamiento revascularizador.

RESUMEN DE PACIENTES CON DOS O MÁS DEGENERACIONES DE ALOINJERTOS ARTERIALES CRIOPRESERVADOS

	PDM 1	PDM 2	PDM 3	PDM 4	PDM 5	PDM 6
Edad	62	67	64	71	48	60
Infección	No	No	No	No	No	No
Otros aneurismas	Sí	No	Sí	No	No	Sí
Nº de degeneraciones	2	2	3	2	2	3
Tipo de bypass 1	1ª PP-T.post	Fc-T.post	Fs-T.post Izq.	I.ext-T.post	F- TTP	Fs-T.post mixto
Tiempo desde intervención 1	7 m	27 m	14 m	23 m	53 m	67 m
Tipo de bypass 2	1ª PP-T.post	Fc-T.post	Fs-T.post Izq.	Recam. distal	F- TTP	Fs-T.post
Tiempo desde intervención 2	14 m	17 m	27 m	32 m	68 m	26 m
Tipo de bypass 3	-	-	Fs-Per. Der.	-	-	F-Per. mixto
Tiempo desde intervención 3	-	-	52 m	-	-	57 m

Tabla 16. Resumen de las características de los pacientes con más de una degeneración aneurismática en distintos aloinjertos. **PDM:** Paciente con Degeneración Múltiple. La edad corresponde a la edad del paciente en años en el momento del diagnóstico de la degeneración. El número de degeneraciones indica la aparición de aneurismas en distintos bypasses, no de distintos segmentos dentro de un mismo aloinjerto. El Tipo de bypass hace referencia al bypass de arteria criopreservada sobre el que se produjo la dilatación aneurismática. El Tiempo desde intervención se refiere al tiempo en meses que tardó en detectarse la degeneración desde el implante del aloinjerto arterial. La numeración detrás de la leyenda indica el número del paciente o el orden de las cirugías y de los aneurismas, según corresponda. **1ª PP-T.post:** Bypass desde 1º porción poplíteo a tibial posterior. **Fc-T.post:** Bypass desde Femoral común a tibial posterior. **Fs-T.post Izq.:** Bypass desde Femoral superficial a Tibial posterior izquierda. **Fs-Per. Der.:** Bypass desde Femoral superficial a Peronea derecha. **I.ext-T.post:** Bypass desde Iliaca externa a Tibial posterior. **Recam.distal:** Recambio del segmento distal del bypass previo. **F- TTP:** Bypass desde Femoral a tronco tibioperoneo. **Fs-T. post mixto:** Bypass mixto de arteria criopreservada y segmento de vena desde Femoral superficial a tibial posterior. **F-Per. mixto:** Bypass mixto de arteria criopreservada y vena desde Femoral a Peronea.

El paciente número 1 (PDM 1), como se ha visto previamente, presentó una pérdida de seguimiento desde los meses 3 al 14 después del implante de una nueva arteria criopreservada, por lo que, aunque el diagnóstico de la segunda degeneración se produjo a los 14 meses, es probable que la misma se iniciase antes.

HALLAZGOS PRINCIPALES
(Pacientes con degeneraciones múltiples)

1. Ningún paciente presentaba patología infecciosa que pudiera favorecer la formación de aneurismas, siendo todos ellos isquémicos y/o con aneurismas poplíteos.
2. Los tiempos de evolución para las sucesivas degeneraciones solo disminuyeron con cada nueva criopreservada en dos de los ocho posibles casos, ya que en el resto se incrementaron. Incluso en los pacientes con tres degeneraciones no se objetiva una aceleración de este proceso.
3. Los dos pacientes que presentaron triple degeneración tenían antecedente de aneurismas de arteria nativa en distintas localizaciones, así como uno de los pacientes con dos degeneraciones (50% de todos los pacientes con degeneraciones múltiples).

PACIENTES CON UNA PRIMERA DEGENERACIÓN DE ARTERIA CRIOPRESERVADA IMPLANTADA ANTES DEL INICIO DEL ESTUDIO

A continuación se describen los pacientes que presentaron su primera degeneración aneurismática durante el registro del estudio, pero cuya cirugía de trasplante arterial se realizó antes del inicio del mismo.

DEGENERACIÓN SIMPLE. PACIENTE α

- Correspondiente a la *Degeneración Criopreservada 6* del análisis histopatológico.

Número de degeneraciones aneurismáticas: 1

Edad: 55 años en el momento del primer implante.

Antecedentes médicos:

- Fumador
- Hipercolesterolemia
- Isquemia crónica de miembros inferiores
- Carcinoma de próstata.

Indicación quirúrgica: Dolor en reposo (isquemia crónica de MMII grado III de Fontaine, estadio 4 de Rutherford).

Intervenciones revascularizadoras previas: Sí

- Bypass ilio-femoral izquierdo.
- Tromboendarterectomía de iliaca externa izquierda.
- Bypass aorto-bifemoral.
- Trombectomía rama derecha del bypass bifurcado + bypass femoro-poplíteo a 1ª porción con PTFE.
- Trombectomía rama derecha del bypass bifurcado + prolongación de la rama derecha del bypass femoro-poplíteo con PTFE + trombectomía del bypass distal derecho.

Tiempo de evolución hasta la degeneración aneurismática: 42 meses

Tipo de bypass: Bypass Femoro-Poplíteo a 3ª porción.

Tratamiento de la degeneración: Sobreinfección del pseudoaneurisma por fistulización a la piel. Se implantan de urgencia dos stent recubiertos tipo BeGraft® (Bentley Innomed GMBH, Hechingen, Germany) + resección de pseudoaneurisma fisurado.



Figura 38. Angio TC mostrando la degeneración del bypass de arteria criopreservada (bypass Femoro-Poplíteo a 3ª porción en miembro inferior derecho). A la izquierda, cortes transversales reflejando el pseudoaneurisma inguinal y la dilatación femoral del injerto. A la derecha, reconstrucción en 3D del segmento arterial afectado.

DEGENERACIÓN SIMPLE. PACIENTE β

Número de degeneraciones aneurismáticas: 1

Edad: 75 años en el momento del primer implante.

Antecedentes médicos:

- Fumador
- Hipercolesterolemia
- Isquemia crónica de miembros inferiores

Indicación quirúrgica: Dolor en reposo (isquemia crónica de MMII grado III de Fontaine, estadio 4 de Rutherford).

Intervenciones revascularizadoras previas: Sí

- Intento de recanalización poplíteica derecha. Inyección de células madre en arteria femoral superficial.

Tiempo de evolución hasta la degeneración aneurismática: 23 meses

Tipo de bypass: Bypass Femoral superficial – Tibial posterior derecha.

Tratamiento de la degeneración: Recambio por nuevo bypass criopreservado de Femoral superficial a Tibial posterior.

Posteriormente, este paciente requirió varias intervenciones revascularizadoras en miembro inferior izquierdo, incluido un bypass Femoro-Poplíteo a 3ª porción con arteria criopreservada en esa extremidad.

El seguimiento de imagen se realizó mediante ecografía.

DEGENERACIÓN SIMPLE. PACIENTE Y

- Correspondiente a la *Degeneración Criopreservada 1* del análisis histopatológico.

Número de degeneraciones aneurismáticas: 1

Edad: 58 años en el momento del primer implante.

Antecedentes médicos:

- Fumador
- Diabetes mellitus tipo 2
- Hipercolesterolemia
- Hiperuricemia
- Estenosis valvular aórtica
- Isquemia crónica de miembros inferiores

Indicación quirúrgica: Dolor en reposo (isquemia crónica de MMII grado III de Fontaine, estadio 4 de Rutherford).

Intervenciones revascularizadoras previas: Sí (en extremidad contralateral)

- Bypass de femoral común a peronea izquierda con vena safena interna *in situ*.
- Tromboendarterectomía de femoral común izquierda + profundoplastia.

Tiempo de evolución hasta la degeneración aneurismática: 19 meses

Tipo de bypass: Bypass Femoral común – Peronea.

Tratamiento de la degeneración: Trombosis del injerto criopreservado, con amputación supracondílea posterior por isquemia irreversible.

El seguimiento de imagen se realizó mediante ecografía.

DEGENERACIÓN SIMPLE. PACIENTE δ

- Correspondiente a la *Degeneración Criopreservada 4* del análisis histopatológico.

Número de degeneraciones aneurismáticas: 1

Edad: 64 años en el momento del primer implante.

Antecedentes médicos:

- Fumador
- Hipertensión arterial
- Diabetes mellitus tipo 2
- Dislipemia
- Silicosis
- Insuficiencia renal crónica
- Isquemia crónica de miembros inferiores

Indicación quirúrgica: Lesión isquémica (isquemia crónica de MMII grado IV de Fontaine, estadio 6 de Rutherford).

Intervenciones revascularizadoras previas: No

Tiempo de evolución hasta la degeneración aneurismática: 71 meses

Tipo de bypass: Bypass Femoral superficial - Tibial posterior.

Tratamiento de la degeneración: Sustitución del segmento degenerado por nueva arteria criopreservada.



Figura 39. Angio TC mostrando la degeneración de arteria criopreservada en miembro inferior izquierdo (bypass femoral superficial - tibial posterior). Al a izquierda, vista sagital del trasplante vascular degenerado. A la derecha se observa un corte transversal con la dilatación aneurismática de 5 cm de diámetro a nivel del tercio inferior de muslo.

RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE TODAS LAS DEGENERACIONES ANEURISMÁTICAS RECOGIDAS DURANTE EL SEGUIMIENTO

	Edad	Proceso Infec.	Tipo de Bypass	Nº Degen.	Tiempo desde cirugía 1	Tiempo desde cirugía 2	Tiempo desde cirugía 3
P. B	66	No	3ª PP	1	28 meses	-	-
P. C	84	No	Distal	1	22 meses	-	-
PDM 1	62	No	Distal	2	7 meses	14 meses	-
PDM 2	67	No	Distal	2	27 meses	17 meses	-
PDM 3	64	No	Distal	3	14 meses	27 meses	52 meses
PDM 4	71	No	Distal	2	23 meses	32 meses	-
PDM 5	48	No	Distal	2	53 meses	68 meses	-
PDM 6	60	No	Distal	3	67 meses	26 meses	57 meses
P. α	55	Sí	3ª PP	1	42 meses	-	-
P. β	75	No	Distal	1	23 meses	-	-
P. γ	58	No	Distal	1	19 meses	-	-
P. δ	64	No	Distal	1	71 meses	-	-
MEDIA (RANGO)	64,5 años (48-84)	Degeneran 8,3% de pacientes indicación infecciosa	Distal: 83,3% 3ª PP: 16,7%	1: 50% 2: 33,3% 3: 16,7%	33 meses (7-71)	30,6 meses (14-68)	54,5 meses (52-57)

Tabla 17. Recopilación de las características de todos los pacientes que presentaron degeneraciones aneurismáticas. El paciente A (P.A) se corresponde con el paciente con degeneración múltiple 1 (PDM 1), por lo que solamente se incluye una vez en la tabla. La designación de cada paciente sigue la empleada en las páginas previas. **P.:** Paciente. **PDM:** Paciente con Degeneración Múltiple. La edad corresponde a la edad del paciente en años en el momento del diagnóstico de la degeneración. El Tipo de bypass hace referencia al bypass de arteria criopreservada sobre el que se produjo la dilatación aneurismática. **3ª PP:** Bypass con anastomosis distal en 3ª porción poplítea. **Distal:** Bypass con anastomosis distal en troncos distales. **Nº Degen.:** Número de degeneraciones, aplicable a aneurismas en distintos bypasses y excluyendo degeneraciones de múltiples segmentos en el mismo injerto. El Tiempo desde cirugía se refiere al tiempo en meses que tardó en detectarse la degeneración desde el implante del aloinjerto arterial criopreservado.

El Paciente A, seguido desde el implante de su arteria criopreservada en nuestro estudio, corresponde igualmente al Paciente con Degeneración Múltiple 1, por lo que solo se incluye una vez en la tabla 17 bajo la designación PDM 1.

La media de edad de los pacientes fue de 64,5 años, con un rango de 48 a 84 años. La única degeneración aneurismática asociada a un proceso infeccioso (8,3% de la muestra de pacientes con patología infecciosa) corresponde a un paciente de 55 años en el momento del diagnóstico, si bien éste se produjo por la fistulización a la piel del pseudoaneurisma.

Casi todos los bypasses se realizaron sobre troncos distales, con tan solo dos casos de anastomosis en 3ª porción poplítea (16,7%). Durante el tiempo del estudio no se registraron aneurismas sobre bypasses aorto-iliacos o con anastomosis distal supragenicular, si bien es cierto que los bypasses infrageniculares constituyen la indicación más habitual para arterias criopreservadas en nuestro medio (77,1% de la muestra). Para seis pacientes se trató de su segunda degeneración, con dos pacientes que llegaron a registrar tres en su historial de seguimiento.

El tiempo medio de evolución para la primera degeneración fue de 33 meses, con un rango de 7 a 71 meses. El tiempo medio para la segunda degeneración fue 30,6 meses, con un rango de 14 a 68 meses. Dos pacientes presentaron tres degeneraciones aneurismáticas, a los 52 y 57 meses (54,5 meses de media).

**ANÁLISIS DE LA MUESTRA DE PACIENTES
CON DEGENERACIONES
ANEURISMÁTICAS**

Si bien en ocasiones se ha empleado la presencia de estenosis en las arterias criopreservadas como indicación de fracaso del bypass mediado inmunológicamente, la aparición de las mismas no es infrecuente en este y otros tipos de injertos vasculares, sobre todo en zonas próximas a la anastomosis o sometidas a fuerzas dinámicas. Debemos tener en cuenta que un bypass a troncos distales próximos al pie puede alcanzar los 80 cm de longitud, sin ramas colaterales de drenaje y con un importante aumento de las resistencias vasculares, como hemos descrito en capítulos previos. Las estenosis son comunes tanto en bypasses protésicos como de vena safena autóloga, y están asociadas principalmente con la existencia de alteraciones en el flujo laminar del vaso en zonas con turbulencias, especialmente a nivel de las anastomosis, así como la progresión de la enfermedad de base. Por tanto, creemos que las estenosis en estos injertos no constituyen un parámetro adecuado a la hora de valorar el componente inmunológico en el fracaso de las arterias criopreservadas, a diferencia de las degeneraciones aneurismáticas, mucho más excepcionales.

Uno de los hallazgos más interesantes en los resultados obtenidos en nuestra serie se observa en los pacientes con múltiples degeneraciones aneurismáticas de aloinjertos arteriales criopreservados, en los que los subsecuentes trasplantes vasculares no conllevan necesariamente una disminución del tiempo hasta la degeneración del nuevo bypass, a pesar de la exposición previa a antígenos de otros donantes en el momento de la segunda y sucesivas cirugías.

El tiempo de latencia medio hasta la aparición de una primera degeneración en una arteria criopreservada fue de 33 meses. Ese tiempo disminuye ligeramente, hasta los 30,6 meses de media, si tiene lugar una segunda degeneración sobre una nueva arteria criopreservada. En contra de lo que cabría esperar, los dos casos con degeneraciones sobre terceras arterias criopreservadas incrementan el tiempo de latencia hasta los 52 y 57 meses (media de 54,5 meses). Se trata de pacientes de 64 y 60 años, respectivamente, ambos con patología isquémica de base, sin procesos infecciosos asociados y con bypasses a troncos distales (tabla 18).

Paciente	Edad	Tipo de bypass	Latencia 1ª degeneración	Latencia 2ª degeneración	Latencia 3ª degeneración
PDM 3	64	Distal	14 meses	27 meses	52 meses
PDM 6	60	Distal	67 meses	26 meses	57 meses
Media	62	Distales	40,5 meses	26,5 meses	54,5 meses

Tabla 18. Características de los pacientes que presentaron tres degeneraciones en otros tantos bypasses de arteria criopreservada. Se mantiene como referencia la denominación empleada para cada paciente en el capítulo anterior. Ambos bypasses presentaban la anastomosis distal sobre troncos distales. **PDM:** paciente con degeneraciones múltiples.

Como veremos en detalle en el capítulo correspondiente al estudio inmunológico, la histocompatibilidad HLA aleatoria entre paciente y receptor es un evento muy poco frecuente, y la inmensa mayoría de los pacientes pasan a considerarse hipersensibilizados tras el primer trasplante vascular. Estos datos descartarían, en principio, que el comportamiento clínico observado en las degeneraciones múltiples pudiera deberse a la ausencia de rechazo crónico por concordancia entre los perfiles HLA.

Hasta donde sabemos, el reemplazo de una arteria criopreservada por otra no parece habitual en otros grupos de trabajo, a juzgar por las publicaciones disponibles en la literatura, bien por el riesgo de nuevas degeneraciones, bien por las limitaciones de disponibilidad en muchos centros. Lo cierto es que no hemos encontrado estudios que informen de la evolución de los pacientes con trasplantes vasculares múltiples. Afortunadamente, y dentro de las restricciones de stock que nos plantea el Banco de Sangre y Tejidos del Principado de Asturias, el Hospital Universitario Central de Asturias ha podido disponer de estos injertos en casi todas las situaciones clínicas que han sido necesarios, siendo escasas las ocasiones en que no se encontraron disponibles y nos hemos visto obligados a recurrir a bancos de tejidos externos.

Es importante destacar que, en muchos casos, la sustitución del bypass de arteria criopreservada por otro de iguales características puede ser la opción de revascularización con las mejores garantías de permeabilidad y supervivencia de la extremidad, a pesar de la degeneración previa. Incidentalmente, su uso repetido nos ha dado la posibilidad de tener una visión privilegiada del comportamiento de estos trasplantes en sujetos previamente sensibilizados, ya que no hemos encontrado publicaciones con series de casos que describan más de una degeneración aneurismática en el mismo paciente.

Sin embargo, y a raíz de los resultados del estudio, nos inclinamos por no recomendar la sustitución del aloinjerto afectado por otro de iguales características ante las elevadas posibilidades de que se repita el proceso degenerativo. Obviamente, este cambio de estrategia revascularizadora no siempre es una opción viable o con iguales garantías de permeabilidad y resistencia a las infecciones, ya que muchos de estos pacientes a menudo no poseían otras posibilidades de revascularización de iguales características en primer lugar y, por tanto, la sustitución por un nuevo bypass de arteria criopreservada puede seguir siendo, en muchos casos, la mejor opción de cara a salvaguardar la extremidad y/o la vida del paciente.

Además, recomendamos llevar a cabo cirugía de recambio temprana en arterias criopreservadas aneurismáticas, una vez detectada la degeneración del injerto, en contraposición al tratamiento conservador mediante seguimiento de imagen. Esta recomendación se basa en la evolución de este grupo de pacientes en nuestra serie, que presenta una progresión hacia el aumento sostenido del diámetro, la trombosis del bypass e incluso la rotura de la arteria trasplantada.

Si analizamos los tiempos de seguimiento, queda de manifiesto que dichas degeneraciones pueden acontecer relativamente pronto con respecto al momento del implante (en nuestra serie hemos registrado el evento más temprano a los 7 meses), pero es asimismo posible, y probablemente frecuente, el fracaso del aloinjerto tras años de seguimiento sin hallazgos patológicos significativos. El periodo de latencia más prolongado registrado en nuestro estudio fue de 71 meses, si bien hemos observado otros tres pacientes con periodos superiores a los 50 meses, lo que da una idea de la importancia del seguimiento periódico de todos los aloinjertos, tanto clínico como ecográfico, incluso años después la intervención.

En total se registraron de forma prospectiva en nuestra muestra cuatro degeneraciones en tres pacientes hasta la fecha de cierre del estudio, un 8,5% de los 35 pacientes que fueron seguidos de forma protocolizada desde el momento del trasplante. Como hemos comentado, si contamos los 10 recambios de bypass, en total se objetivó la presencia de aneurismas en un 8,8% de todos los bypasses realizados y seguidos desde el inicio del estudio. Este porcentaje es ligeramente superior a la media observada en las series publicadas en la última década, con la excepción del artículo de Lejay y colaboradores ⁵¹, en el que las dilataciones alcanzan el 22,6% de las arterias criopreservadas y que reporta 8 roturas espontáneas de otros tantos bypasses. En el caso concreto de esa serie nos inclinamos por pensar que existió algún problema con el procesamiento y/o criogenización de los aloinjertos, más allá de la evolución natural atribuible a estos trasplantes indicados por infección protésica previa. En concreto, de 25 aloinjertos que describen en el sector aorto-iliaco, se reportan 5 degeneraciones y 6 roturas espontáneas, mientras que en el sector periférico tuvieron lugar 7 degeneraciones y 3 roturas en 28 procedimientos. Estos números llaman la atención, sobre todo si tenemos en cuenta que ninguna otra serie ha superado el 5,4% de degeneraciones aneurismáticas en bypasses infrageniculares de arteria criopreservada en los últimos 10 años, y en varias no se ha descrito ningún caso (tabla 19).

Estudio	País	Indicación	Aloinjerto	Pacientes	Seguim.	Degener.
Furlough et al, 2019 ⁴⁷	USA	Infección	Arterial	57	27,8 meses	3,5%
Guevara-Noriega et al, 2019 ⁴⁸	España	Isquemia	Arterial	149	No indicado	5,4%
Masmejan et al, 2019 ⁴⁹	Suiza	Isquemia (BP Distal)	Arterial	42	31,6 meses	2,3%
Masabni et al, 2019 ⁴²	USA	Infección (Aorta)	Arterial	17	34,8 meses	0%

O'Banion et al, 2017 ⁵⁰	USA	Isquemia/ Infección	Venoso	73	10,1 meses	0%
Lejay et al, 2017 ⁵¹	Francia	Infección	Arterial	53	52 meses	22,6%
Heo et al, 2017 ⁵²	Corea	Infección (Aorta)	Arterial	25	19,1 meses	4%
Bossi et al, 2017 ⁵³	Italia	Infección (Aorta/ Periférica)	Arterial/ venoso	21	14 meses	0%
Lowampa et al, 2016 ⁵⁴	Bélgica	Infección	Arterial	96	49 meses	0,9%
Diamant et al, 2016 ⁵⁵	Uruguay	Isquemia/ Infección	Arterial	23	No indicado.	4,2%
Chang et al, 2014 ⁴⁶	USA	Isquemia	Venoso	81	11,8 meses	1,2%
Touma et al, 2014 ⁵⁶	Francia	Infección (Aorta)	Arteria	54	12,1 meses	1,8%
Harlander et al, 2014 ⁴¹	USA	Infección (Aorta)	Arteria	220	30 meses	2,7%
Zehr et al, 2011 ⁵⁷	USA	Isquemia	Venoso	54	15,5 meses	No indicado
Randon et al, 2010 ⁵⁸	Bélgica	Isquemia	Venoso	92	26,4 meses	4,34%
Bisdas et al, 2010 ⁶⁰	Alemania	Infección (Aorta)	Arteria	110	36 meses	0,9%

Tabla 19. Recopilación de los estudios de la última década con las series de pacientes revascularizados mediante aloinjertos criopreservados, tanto arteriales como venosos, para el tratamiento de patología isquémica y/o infecciosa. **Seguim.:** Seguimiento medio en meses. **Degener.:** Porcentaje de casos que presentaron degeneración aneurismática del bypass y/o aneurisma anastomótico. El estudio de Guevara-Noriega et al no indica el seguimiento medio, si bien informa una pérdida de seguimiento del 21,48% de los pacientes a los 5 años. Diamant et al tampoco ofrecen seguimiento medio, únicamente el tiempo de seguimiento de los pacientes vivos permeables. El estudio de Zehr et al no describe complicaciones, tan solo permeabilidad primaria, secundaria y salvamento de extremidad.

La razón de tomar como referencia los estudios desde el 2010 y no incluir series más antiguas se fundamenta en la necesidad de evitar, en la medida de lo posible, la inclusión de degeneraciones causadas por factores no inmunológicos. Para ello buscamos, precisamente, la actual estandarización de los protocolos de procesamiento y criopreservación de arterias y venas criopreservadas, que ha permitido reducir el riesgo de que el fracaso en los trasplantes vasculares esté en relación con la extracción, manipulación y conservación del aloinjerto.

No obstante, es probable que el verdadero alcance de los procesos degenerativos en los trasplantes vasculares en general se encuentre parcialmente infravalorado en la literatura a pesar de los múltiples estudios y series disponibles. Esto se debe a que, a pesar de tratarse de series que pueden superar en ocasiones los 3 años de seguimiento medio ^{51,54}, muchas otras son inferiores al año o directamente no lo especifican, indicando únicamente el rango de años entre los que se realizó el estudio ^{48,55}. Si bien los estudios con aloinjertos venosos criopreservados referidos en la tabla 19 presentan un porcentaje muy bajo de degeneraciones, también es cierto que los tiempos de seguimiento medio son los más bajos de toda la muestra, con una media de 15,5 meses, y por lo tanto insuficiente para detectar la verdadera incidencia de aneurismas en trasplantes venosos.

Uno de los casos (correspondiente al paciente con Degeneración Prospectiva A y al paciente con Degeneración Múltiple 1 en la descripción de las degeneraciones, a la Degeneración Aneurismática 5 en el análisis inmunohistoquímico y al paciente número 13 en el estudio de anticuerpos) presentó una rápida evolución a la hora de formar aneurismas de repetición en los sucesivos aloinjertos. Este paciente registró los tiempos de latencia más cortos, tanto para la primera como para la segunda degeneración, de todos los observados en la muestra (7 y 14 meses, respectivamente). Debemos tener en cuenta, además, que en este caso se produjo una pérdida de seguimiento durante casi un año, por lo que el periodo de evolución hasta esta última fue probablemente más corto de los 14 meses registrados. Además, en este paciente se constata antecedentes de al menos tres aneurismas de arteria nativa (poplítea, femoral superficial y femoral profunda), por lo que no se descarta algún mecanismo intrínseco que favorezca la degeneración de las estructuras arteriales y cuya fisiopatogenia pueda afectar tanto a los vasos propios como a los trasplantados.

Llama la atención que, a pesar del reducido tamaño de la serie de pacientes con más de una degeneración de arteria criopreservada (6 casos), otros dos pacientes también presentaron varios aneurismas de arteria nativa (tabla 20). El primero de ellos es un paciente isquémico, con aneurismas de arteria poplítea bilaterales (correspondiente al paciente con Degeneración Múltiple 3 y a la Degeneración Aneurismática 2 del análisis inmunohistoquímico) presentó tres degeneraciones consecutivas de aloinjertos criopreservados. Esto parece corroborar el posible mecanismo antes descrito. Además, los tiempos de evolución hasta la aparición de su dos primeras degeneraciones están también entre los más bajos de la serie, pero sin embargo la tercera incrementa su tiempo de latencia hasta los 52 meses. El último paciente corresponde a la Degeneración Múltiple 6 y a la Degeneración Criopreservada 8 del análisis

histopatológico. Diagnosticado de distrofia polianeurismática, no presentó una disminución del tiempo de latencia hasta la aparición de la tercera degeneración, sino que éste también aumentó ostensiblemente hasta los 57 meses.

	Edad	Proceso Infec.	Tipo de Bypass	Nº Degen.	Tiempo desde cirugía 1	Tiempo desde cirugía 2	Tiempo desde cirugía 3
PDM 1	62	No	Distal	2	7 meses	14 meses	-
PDM 3	64	No	Distal	3	14 meses	27 meses	52 meses
PDM 6	60	No	Distal	3	67 meses	26 meses	57 meses

Tabla 20. Características de los pacientes con degeneraciones aneurismáticas múltiples en sucesivas arterias criopreservadas y antecedentes de varios aneurismas de arteria nativa. Se mantiene como referencia la denominación empleada para cada paciente en el capítulo anterior. **Edad:** edad en años del paciente en el momento del primer implante. **PDM:** Paciente con degeneraciones múltiples. **Proceso infec.:** Infección de arteria nativa o prótesis vascular como indicación para el trasplante vascular. **Nº Degen.:** Número total de degeneraciones en sucesivas arterias criopreservadas registradas en el paciente hasta la fecha de cierre del estudio. El Tiempo desde cirugía se refiere al tiempo en meses que tardó en detectarse la degeneración desde el implante del aloinjerto arterial criopreservado.

En total, tres pacientes de los seis con degeneraciones de múltiples arterias criopreservadas tenían antecedentes previos de al menos dos aneurismas de arteria nativa. Si bien el tamaño muestral es pequeño, ya hemos comentado que no hemos encontrado series previas que describan múltiples degeneraciones aneurismática en el mismo paciente. Estos resultados llaman poderosamente la atención, e inciden en la sospecha de algún factor concomitante que pudiera actuar en conjunto con el rechazo crónico generado por estos trasplantes. La existencia de un posible componente autoinmune, o la participación de metaloproteasas capaces de afectar tanto a los aloinjertos vasculares como al árbol arterial nativo son, a falta de estudios que pudieran confirmar estos hallazgos, meras conjeturas para explicar estos resultados. Aunque se trata de un hallazgo pendiente de verificación mediante una muestra de mayor tamaño que aumente el poder estadístico, los datos son lo suficientemente llamativos como para desaconsejar, en la medida de lo posible, el empleo de aloinjertos criopreservados en pacientes con distrofia polianeurismática.

Hasta donde nosotros sabemos, este es el primer estudio que describe el comportamiento de las degeneraciones aneurismáticas en los aloinjertos de

arteria criopreservada implantados de forma consecutiva en los mismos pacientes.

Por otro lado, no existen recomendaciones estandarizadas sobre la frecuencia de los controles de imagen, por lo que es fácil que en publicaciones con seguimientos cortos y revisiones más distanciadas se puedan escapar al rastreo de degeneraciones incipientes en el momento del cierre de los distintos estudios. Las pruebas de imagen permiten descubrir dilataciones aneurismáticas no perceptibles con la exploración física, asintomáticas en todos los aspectos, antes de que aumente el diámetro del aneurisma y comprometa la viabilidad del bypass.

Si la degeneración de la pared de los aloinjertos vasculares criopreservados es una complicación relativamente frecuente de estos bypasses, se hace necesario un protocolo de control de imagen que permita diagnosticar y seguir las complicaciones de la forma más eficaz posible. En el momento actual no existen recomendaciones claras sobre el programa de seguimiento en los trasplantes vasculares, más allá de la importancia de realizar estudios de imagen seriados ante la posible aparición de estenosis en el bypass y, más frecuentemente, degeneraciones aneurismáticas. Dada la inocuidad, accesibilidad y el bajo coste de la ecografía, así como su capacidad para detectar fielmente tanto dilataciones como estenosis, creemos que debe ser el método de elección en el seguimiento de estos pacientes, con el apoyo puntual de otras pruebas de imagen, como la angiotomografía y la arteriografía, cuando la evolución clínica y la ecográfica así lo indiquen. Esta recomendación está en consonancia con la *Guía básica para el seguimiento no invasivo de la cirugía arterial*, del Capítulo de Diagnóstico Vascular No Invasivo de la Sociedad Española de Angiología y Cirugía Vascular ¹⁹⁹. Si bien la mayoría de los grupos no realiza seguimiento de imagen de los injertos infrainguinales protésicos, debido a que no ha conseguido mejorar los resultados por la alta frecuencia de trombosis sin lesión identificable o corregible ^{200,201}, sí se aconseja realizar monitorización ecográfica de los injertos venosos autólogos infrainguinales, ya que su uso puede ayudar a mantener una mayor permeabilidad de estos bypasses y con ello el salvamento de la extremidad.

Aunque no existen protocolos claros sobre el seguimiento específico de los aloinjertos vasculares criopreservados, cabría realizar un control seriado cuanto menos equivalente al de los homoinjertos venosos. En vista de los resultados del presente estudio, nuestra recomendación es llevar a cabo una ecografía al menos cada 6 meses durante un periodo no inferior a 5 años (60 meses) desde el momento del trasplante vascular. De esta forma se podrían diagnosticar la formación de la mayoría de los aneurismas antes de que éstos llegasen a comprometer la viabilidad del injerto. Posteriormente, si bien habría posibilidad de cambiar a un control de imagen anual, somos de la opinión de que estaría indicado el seguimiento ecográfico semestral durante toda la vida útil de éstos bypasses, en base a su capacidad para iniciar un rápido proceso de degeneración incluso tras años sin cambios significativos en su diámetro. De todos modos, estas recomendaciones deben adaptarse a cada caso y complementarse con otros estudios (Angio Tc, Arteriografía, Gammagrafía...) cuando sea necesario, según la evolución clínica del bypass.

HALLAZGOS PRINCIPALES

(Resultados de la muestra de pacientes con arterias criopreservadas degeneradas)

- La degeneración aneurismática de los aloinjertos arteriales criopreservados es una complicación relativamente frecuente y probablemente infradiagnosticada en las series publicadas, dada su capacidad para iniciarse años después del trasplante vascular.
- Subsiguientes aloinjertos vasculares no reducen necesariamente el tiempo de latencia hasta una nueva degeneración del bypass, a pesar de las sensibilizaciones sucesivas tras la exposición a antígenos específicos de cada donante.
- En vista de la frecuencia de nuevas degeneraciones en un mismo paciente, se desaconseja el implante de otra arteria criopreservada salvo que no se disponga de otras opciones de revascularización o éstas no presenten iguales garantías de permeabilidad y/o resistencia a las infecciones. Recomendamos, igualmente, la sustitución temprana de arterias criopreservadas aneurismáticas en vista de la evolución natural observada.
- Al menos en ciertos casos, se sospecha de factores etiopatogénicos concomitantes en la formación de estos aneurismas, capaces de afectar tanto a vasos propios como a trasplantes arteriales. Hemos observado que hasta un 50% de los pacientes que registraron degeneraciones múltiples tenían como antecedente aneurismas de arteria nativa en más de una localización. Por tanto, la presencia de aneurismas de arteria nativa previos se consideraría una contraindicación relativa para el implante de aloinjertos vasculares criopreservados.
- Se recomienda el seguimiento clínico y ecográfico semestral e indefinido de los trasplantes vasculares como método para diagnosticar posibles complicaciones y mejorar la permeabilidad de estos injertos a largo plazo.

**RESULTADOS DE LA ANATOMÍA
PATOLÓGICA EN LAS DEGENERACIONES
ANEURISMÁTICAS DE ARTERIA
CRIOPRESERVADA**

PACIENTES CONTROL

Aneurisma Humeral de Arteria Nativa

Ausencia de endotelio, con trombo fibrinoide adherido en la luz. Neoíntima con actividad proliferativa de miofibroblastos.

Cambios degenerativos ateromatosos en los que destaca la actividad proliferativa de los miofibroblastos, más que los depósitos de lípidos, que son irrelevantes.

Destaca la irregular distribución de las capas de la túnica media, aunque persiste la celularidad en ella.

Respuesta inflamatoria crónica linfoplasmocitaria en la pared, focal, afectando a todas las capas.

La inmunohistoquímica/ inmunofluorescencia para IgG (Inmunoglobulina G), C3 (componente 3 del complemento) y C4 (componente 4 del complemento) revela una distribución uniforme del marcaje, sin aumento significativo que haga pensar en la participación de componente humeral en el proceso degenerativo de la pared, que es muy leve (figura 40).

Hallazgos principales: Pared de arteria aneurismática con trombosis intimal, cambios degenerativos parietales e inflamación crónica moderada.

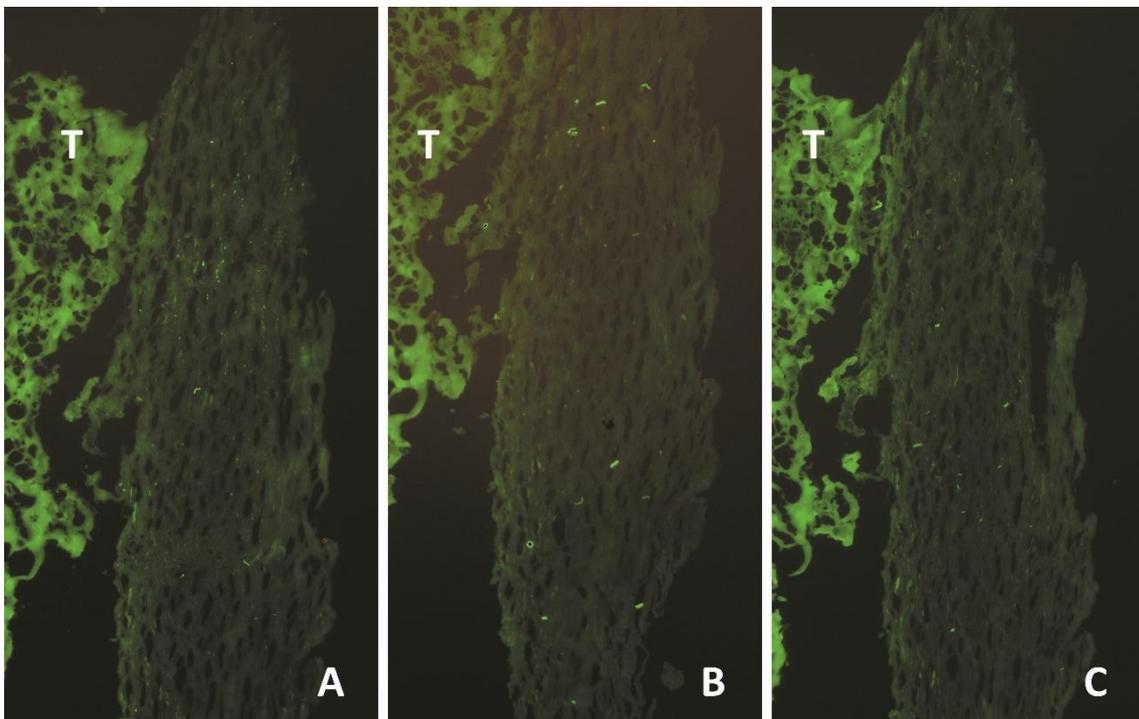


Figura 40: Marcaje por inmunofluorescencia. **A:** C3 x20. **B:** C4 x20. **C:** IgG x20. Distribución homogénea del marcaje en las tres muestras. La zona con mayor inmunofluorescencia, marcada con una **T**, corresponde al trombo intraluminal.

Aneurisma de Arteria Poplítea Nativa

Pared arterial altamente deteriorada, con íntima denudada y trombo luminal reciente.

Se observan zonas en las que la capa muscular está totalmente ausente y sustituida por tejido fibroso (figura 41).

Inflamación crónica intramural, con neoformación de vasa vasorum.

Inmunohistoquímica para IgG, C3, actina y fibras elásticas: no hay evidencia de depósitos inmunes.

Hallazgos principales: Pérdida de celularidad parietal de las tunicas íntima y muscular, fibrosis severa, inflamación crónica y trombosis.

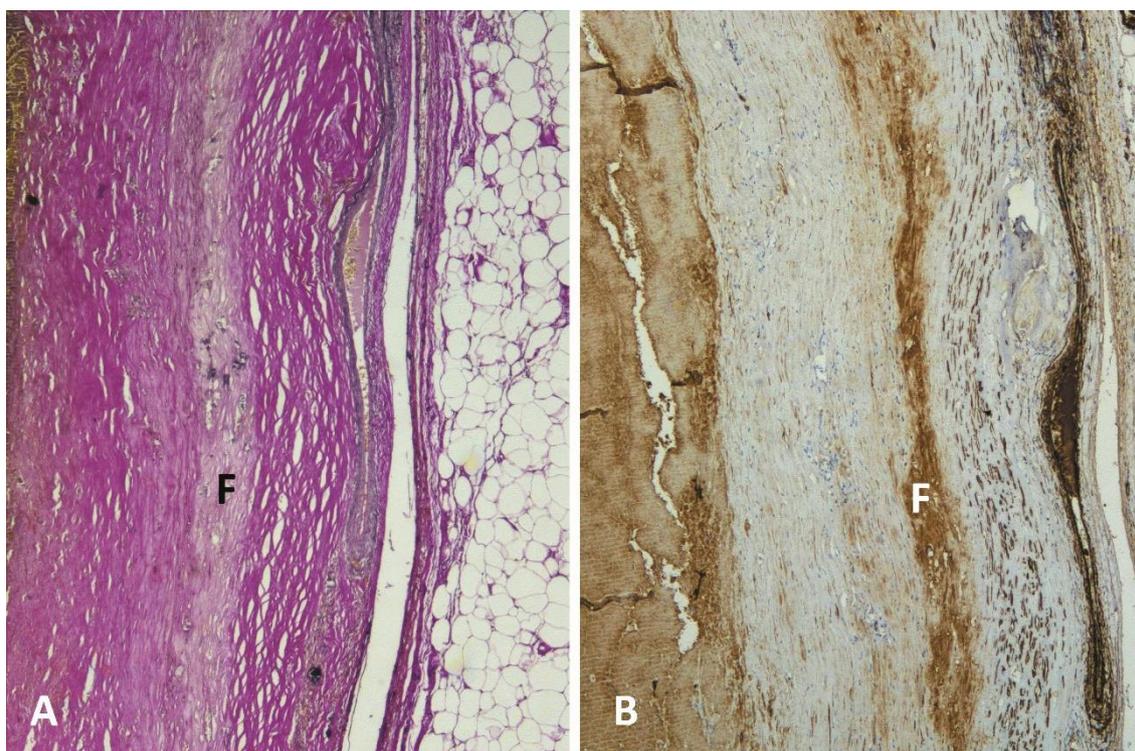


Figura 41: Marcaje inmunohistoquímico. **A:** Fibras elásticas x4. **B:** Actina x4. Sin evidencia de depósitos inmunes. **F:** Áreas de fibrosis, con desaparición de la capa muscular. La banda más oscura a la derecha es un artefacto. A la izquierda se observa trombo intraluminal.

HALLAZGOS PRINCIPALES
(Pacientes Control: Aneurismas de Arteria Nativa Periférica)

1. Inflamación crónica afectando a todas las capas.
2. Cambios degenerativos parietales.
3. Inmunohistoquímica/ inmunofluorescencia sin evidencia de depósitos inmunes significativos

La celularidad de la íntima y media van a depender del nivel de degeneración/ fibrosis parietal, desde una alteración de la distribución de las capas hasta la pérdida completa de la capa muscular en la zona afectada.

DEGENERACIÓN ANEURISMÁTICA DE ALOINJERTOS DE ARTERIA CRIOPRESERVADA

DEGENERACIÓN ARTERIA CRIOPRESERVADA 1

Tiempo de evolución:

El aloinjerto fue explantado 36 meses post trasplante.

Hallazgos histológicos:

Erosión superficial y acúmulos de fibrina en la íntima.

Alteración severa de la arquitectura del vaso, con fibrosis parietal, pérdida de fibras elásticas y marcada hipocelularidad de las capas parietales.

Infiltrado inflamatorio moderado de células mononucleares.

El estudio por inmunofluorescencia permite observar un marcaje difuso de IgG y C3 en las zonas más acelulares, probablemente inespecífico (figura 42).

Hallazgos principales: Cambios degenerativos severos y mínima inflamación.

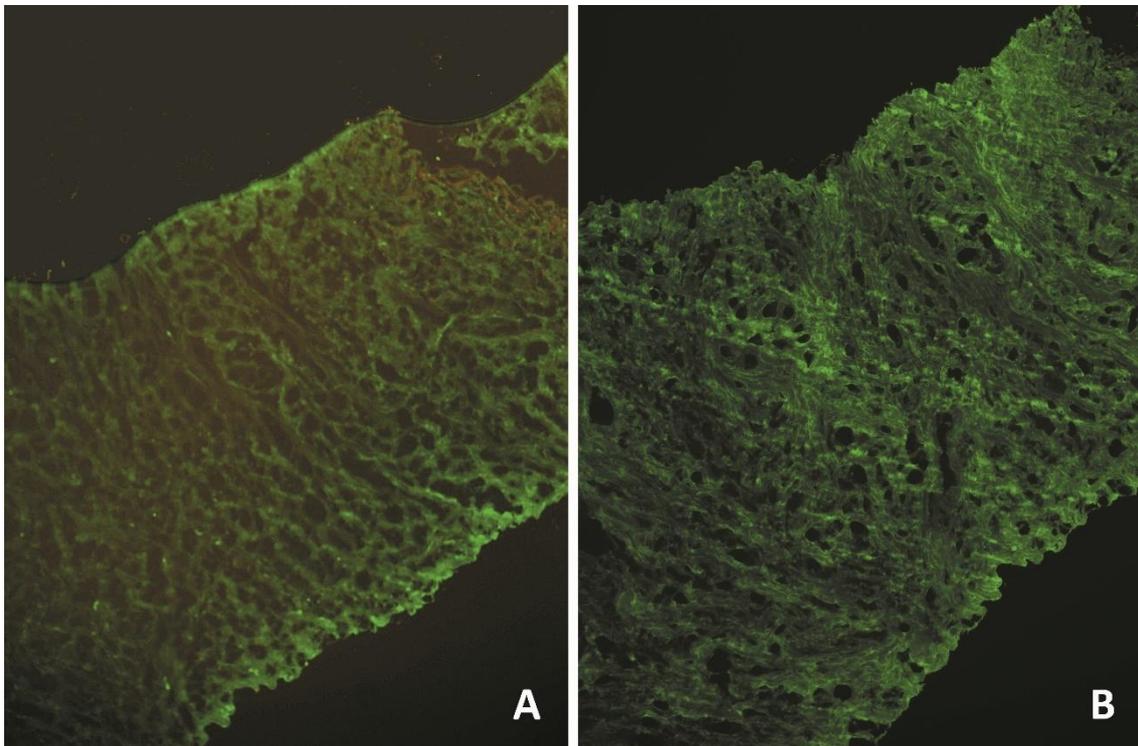


Figura 42: Marcaje por inmunofluorescencia. **A:** C3 x10. **B:** IgG x10. Depósitos inmunes difusos en las zonas más acelulares.

DEGENERACIÓN ARTERIA CRIOPRESERVADA 2

Tiempo de evolución:

El injerto fue retirado 53 meses tras el implante. Se trataba de la tercera criopreservada degenerada en este paciente, revascularizado mediante aloinjertos arteriales bilaterales.

Hallazgos histológicos:

Pérdida completa del endotelio, con áreas de erosión y formación de trombo.

Pérdida subtotal de elásticas limitantes, persistiendo únicamente la limitante de la íntima.

Tanto la media como la adventicia son marcadamente hipocelulares (figura 43).

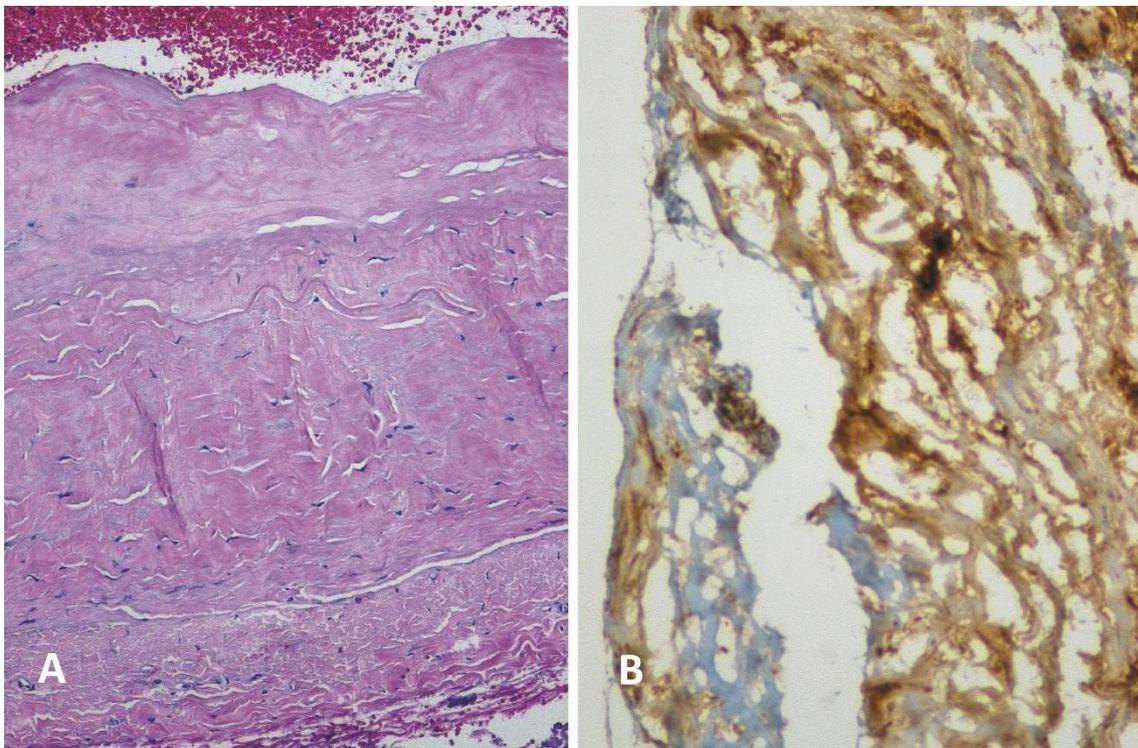


Figura 43: **A:** Tinción con Hematoxilina-Eosina (HE) x10. Destaca la notable hipocelularidad de las capas. **B:** Inmunohistoquímica. Marcaje con HLA de clase I x10. Se observan depósitos en la túnica media.

Ausencia de infiltrado inflamatorio.

Se observan depósitos de C3, IgG y HLA de clase I en la túnica media (figura 44).

Hallazgos principales: Arteria criopreservada degenerada sin inflamación celular. Depósitos de inmunocomplejos en la túnica media.

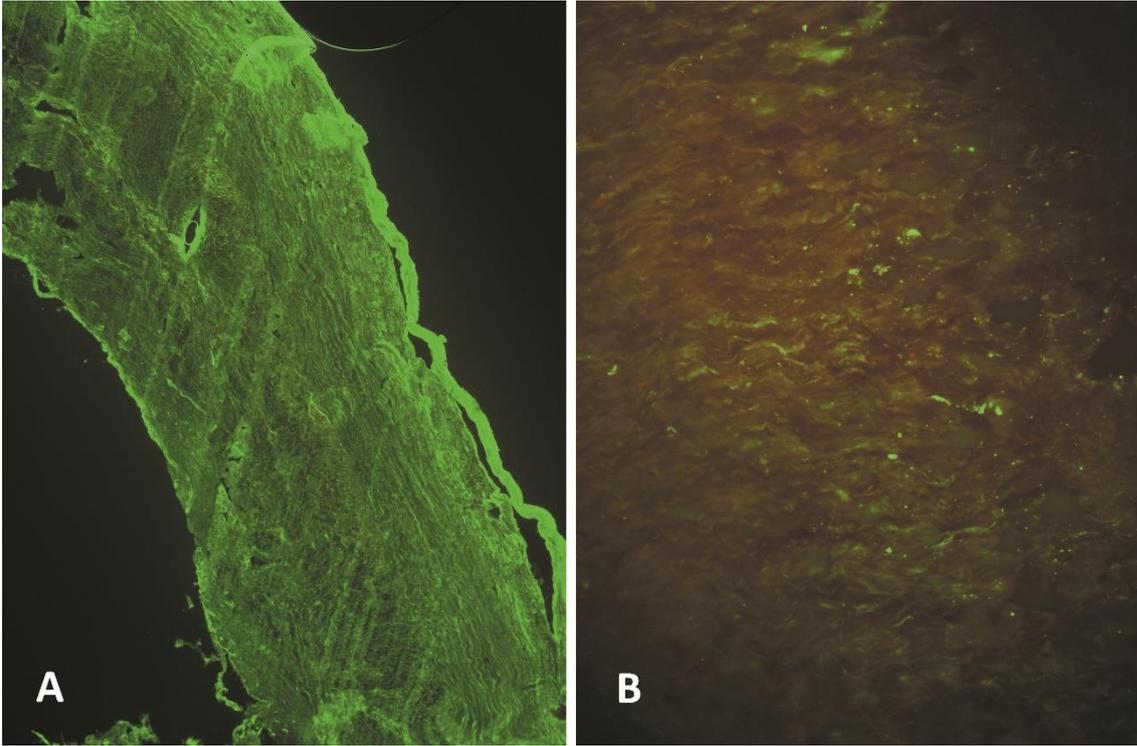


Figura 44: Marcaje por inmunofluorescencia. **A:** IgG x10. **B:** C3 x40. Depósitos inmunes en la túnica media.

DEGENERACIÓN ARTERIA CRIOPRESERVADA 3

Tiempo de evolución:

El injerto fue retirado 24 meses post implante. Segunda degeneración aneurismática de una arteria criopreservada en este paciente.

Hallazgos histológicos:

Proliferación intimal en disposición anular que muestra cerca de la luz algunos acúmulos de calcio e histiocitos espumosos, sin la estructura clásica de la placa de ateroma. La celularidad de la íntima está formada por escasos miofibroblastos (figura 45.A).

La túnica media tiene neovascularización por vasa vasorum, con marcada fibrosis e hipocelularidad. Llama la atención la fragmentación de las fibras elásticas.

La pared conserva algunas membranas elásticas limitantes.

No se ven cambios destacables en la adventicia.

No hay infiltrado inflamatorio.

El estudio inmunohistoquímico con anticuerpos IgG para material parafinado muestra evidencia de depósitos de IgG en la íntima, con mayor densidad en la zona subendotelial, y que va disminuyendo hasta llegar a la zona de la membrana elástica limitante de la íntima (figura 45.B). La inmunofluorescencia muestra positividad intersticial para C3, IgG y HLA de clase I (figura 46).

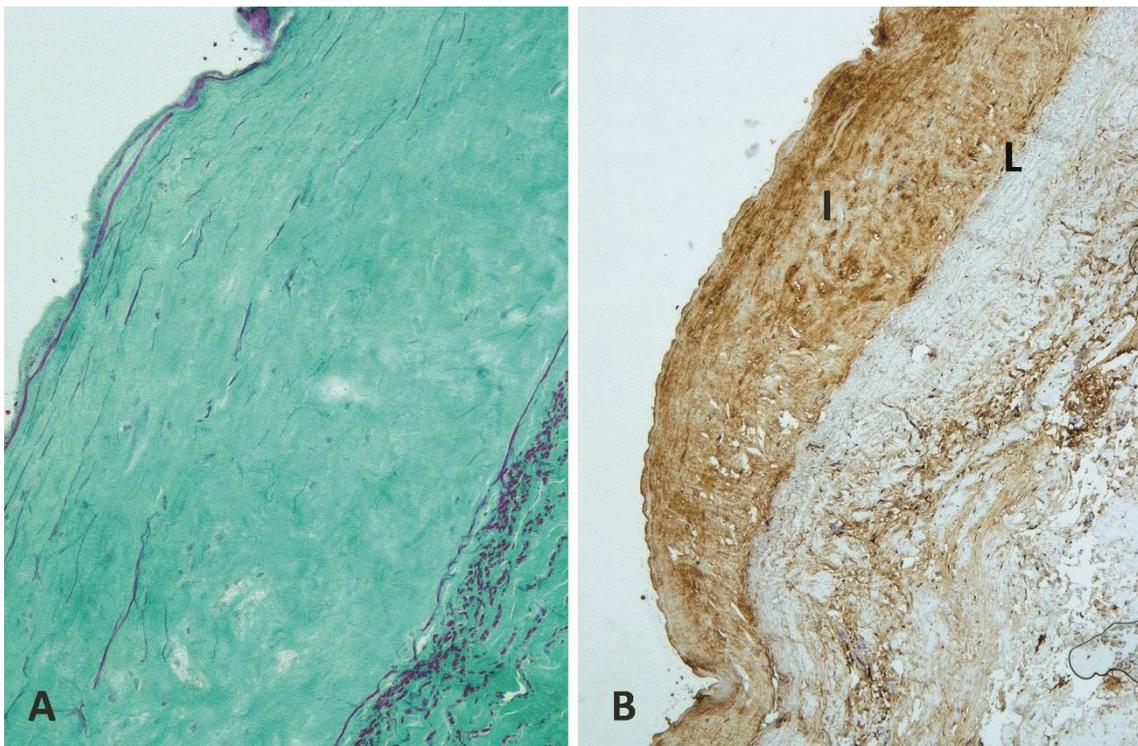


Figura 45: **A:** Tinción Tricrómico de Gomori x10. Esta tinción se usa para destacar el tejido muscular y conectivo. Detalle de la íntima, cuyas escasas células están formadas por miofibroblastos. **B:** Inmunohistoquímica. IgG 10x. Depósitos localizados predominantemente en la neointima (I), desde la zona subendotelial hasta la membrana elástica limitante de la íntima (L).

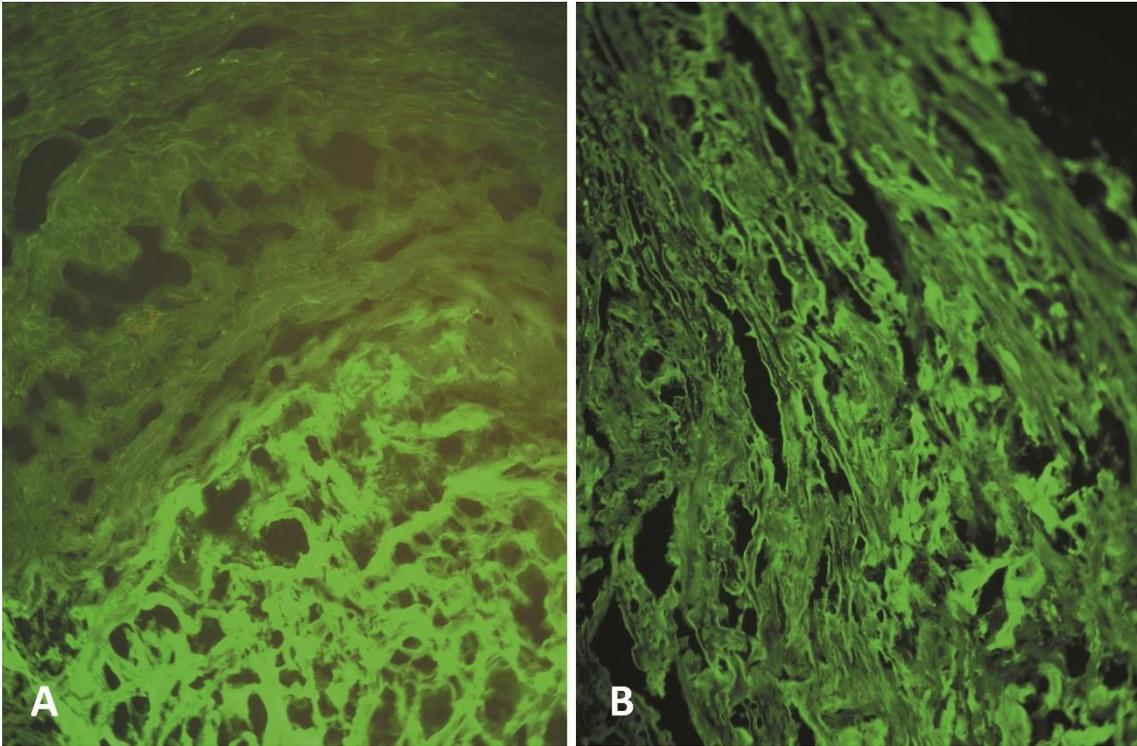


Figura 46: Marcaje por inmunofluorescencia. Positividad intersticial. **A:** C3 x20. **B:** IgG 20x.

DEGENERACIÓN ARTERIA CRIOPRESERVADA 4

Tiempo de evolución:

El injerto fue retirado 5 años después del trasplante. Segunda degeneración aneurismática de una arteria criopreservada en este paciente.

Hallazgos histológicos:

La íntima está totalmente destruida y sustituida por un trombo fibrinoide en organización que forma parte de la pared del aneurisma neoformado.

Pérdida casi total de las fibras elásticas, persistiendo solamente la matriz de colágeno.

La pérdida de células de la media es de moderada a severa, pero existen casi siempre algunas células viables en su espesor

Sólo hay una lámina de fibras elásticas adventicial muy fina.

El infiltrado inflamatorio celular es muy escaso, siendo las células inflamatorias presentes linfocitos y células plasmáticas, agrupadas de manera focal y fundamentalmente en la adventicia. No se observan células inflamatorias en la media ni en la íntima.

Arterioesclerosis de tipo lipídico, predominando el colesterol intracelular en macrófagos espumosos. Estos macrófagos se acumulan tanto en la media como la adventicia, pero solo en pequeños focos en la íntima. Su distribución no coincide, por tanto, con la disposición clásica de una placa de ateroma.

El examen por inmunofluorescencia muestra que solamente la íntima y el trombo son positivos para Fibrinógeno, siendo el resto de la pared negativa para C3, C4, IgG, Fibrinógeno y Albúmina (figura 47). Los resultados se consideran, por tanto, negativos.

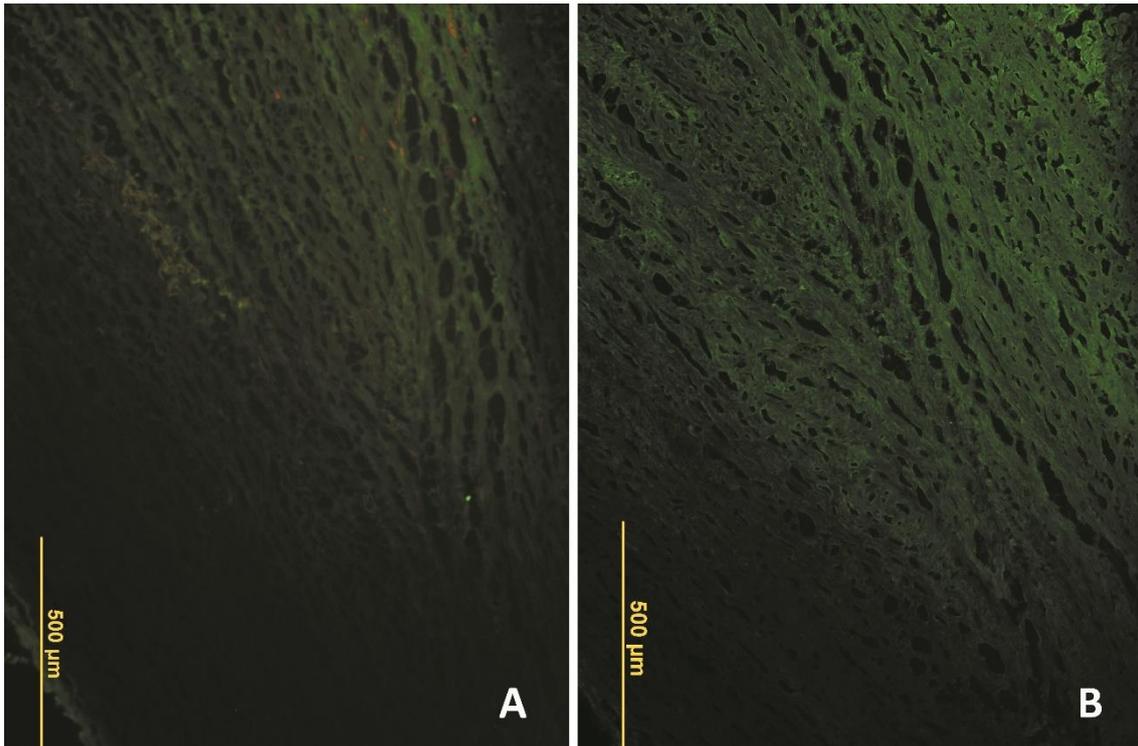


Figura 47: Marcaje por inmunofluorescencia. No evidencia de depósitos de inmunocomplejos. **A:** C3 x10. **B:** IgG x10.

DEGENERACIÓN ARTERIA CRIOPRESERVADA 5

Tiempo de evolución:

La arteria criopreservada fue explantada 10 meses después de la intervención.

Hallazgos histológicos:

Degeneración de la pared, así como un segmento en que entre íntima y media se acumula material trombótico. No aterosclerosis ni calcificación

Focos de inflamación crónica.

El estudio de inmunohistoquímica revela marcaje en la íntima y túnica media, predominantemente estromal, extracelular, de IgG y C3. No se observan depósitos de IgG en la media en las zonas no dañadas (figura 48).

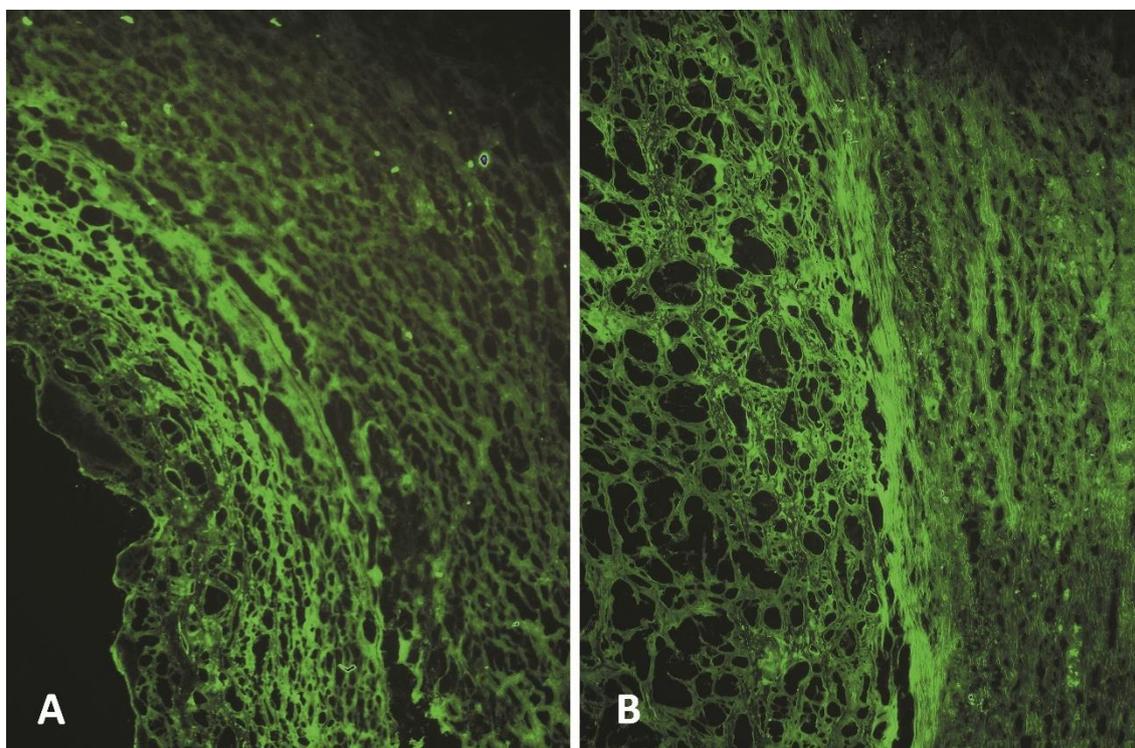


Figura 48: Marcaje por inmunofluorescencia. **A:** C3 x10. Íntima positiva. **B:** IgG x10. Depósitos de inmunocomplejos en las zonas dañadas.

DEGENERACIÓN ARTERIA CRIOPRESERVADA 6

Tiempo de evolución:

El aloinjerto fue extraído 57 meses después del trasplante. Proceso infeccioso concomitante.

Hallazgos histológicos:

Hay un tejido de granulación neoformado de endotelios prominentes y fibroblastos activados, sustituyendo la íntima.

La pared de la arteria criopreservada está severamente dañada por un proceso reparativo fibrosante que destruye incompletamente las láminas elásticas. Llama la atención también la presencia de fibrosis colágena.

El marcaje por inmunofluorescencia para IgG y C4 muestra positividad transparietal para IgG y negatividad para C4 (figura 49). El marcaje HLA de clase I también es positivo (figura 50).

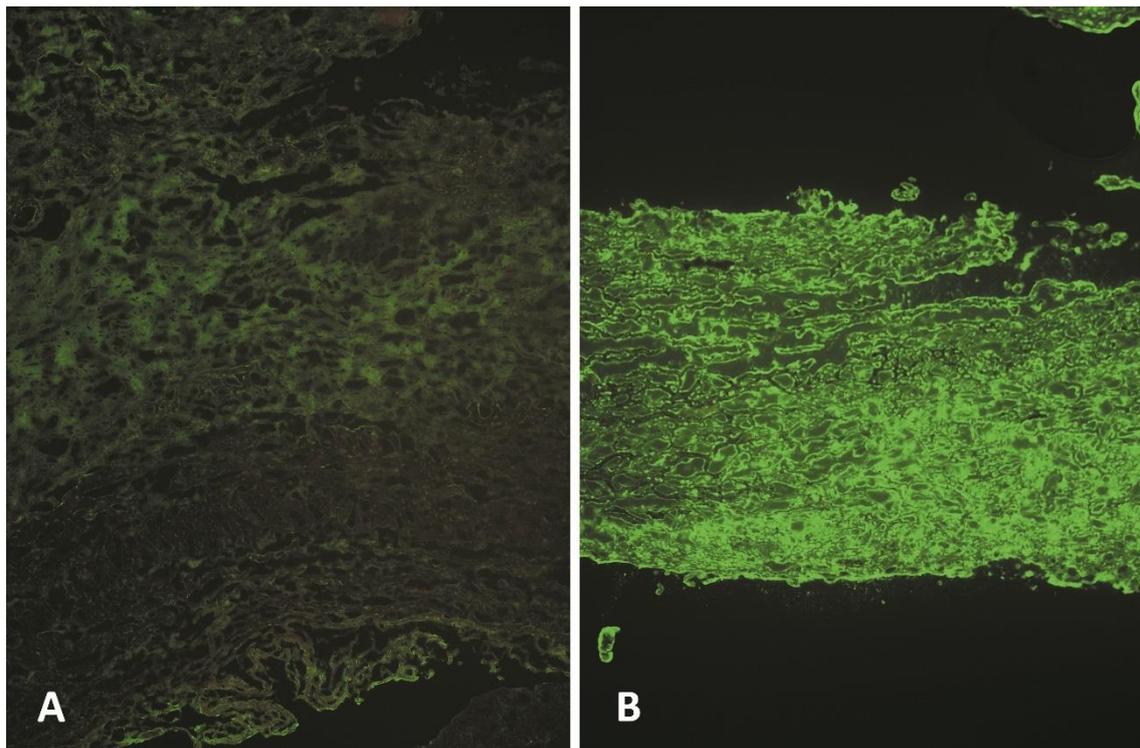


Figura 49: Marcaje por inmunofluorescencia. **A:** C4 x10. No se observan depósitos de inmunocomplejos. **B:** IgG x4. Positividad transparietal.

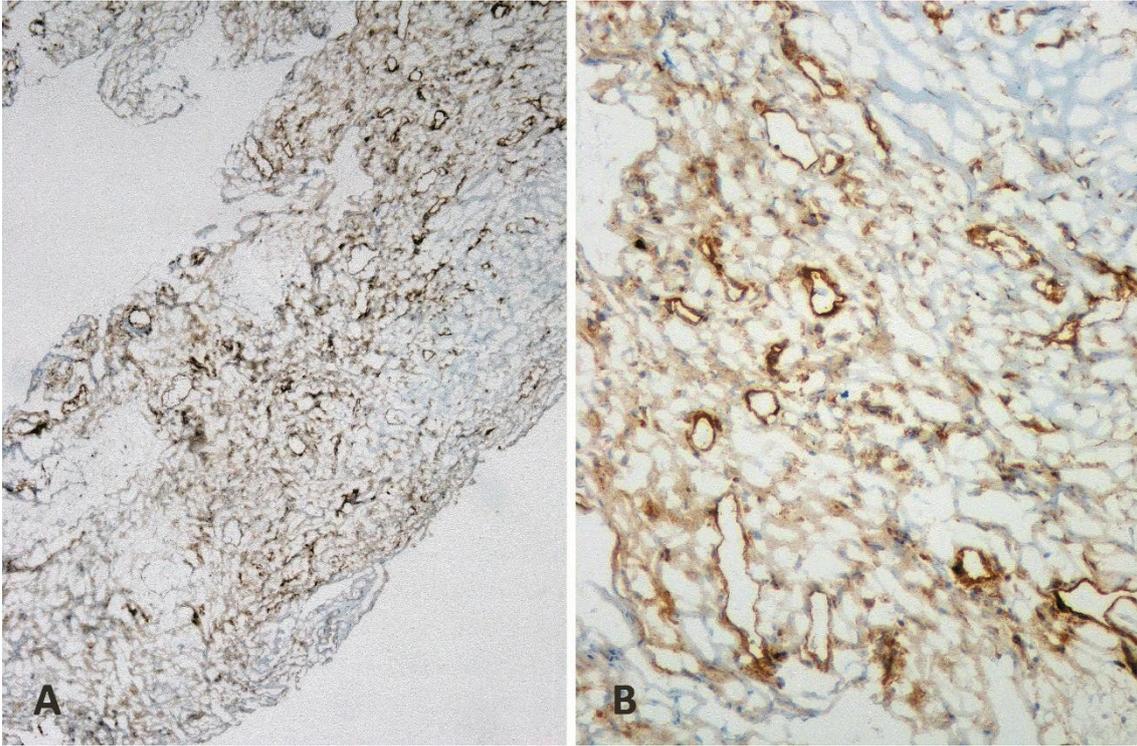


Figura 50: Inmunohistoquímica. Marcaje con HLA de clase I. **A:** HLA I x4. **B:** HLA I x10.

DEGENERACIÓN ARTERIA CRIOPRESERVADA 7

Tiempo de evolución:

El aloinjerto fue explantado 33 meses después de la cirugía.

Hallazgos histológicos:

Extensa sustitución de la pared por trombo fibrinoide, que deja sólo una zona ectásica de pared vascular, la cual ha perdido gran parte de sus características diferenciales.

Ausencia de íntima y presencia de apenas algunas fibras elásticas en la media. Marcada pérdida de células musculares en esa capa, sustituidas por fibroblastos y estroma colágeno (figura 51).

No se observa la presencia de células inflamatorias

La inmunohistoquímica detecta aumento de HLA de clase I e IgG en el espesor de la media de la pared vascular residual (figura 52).

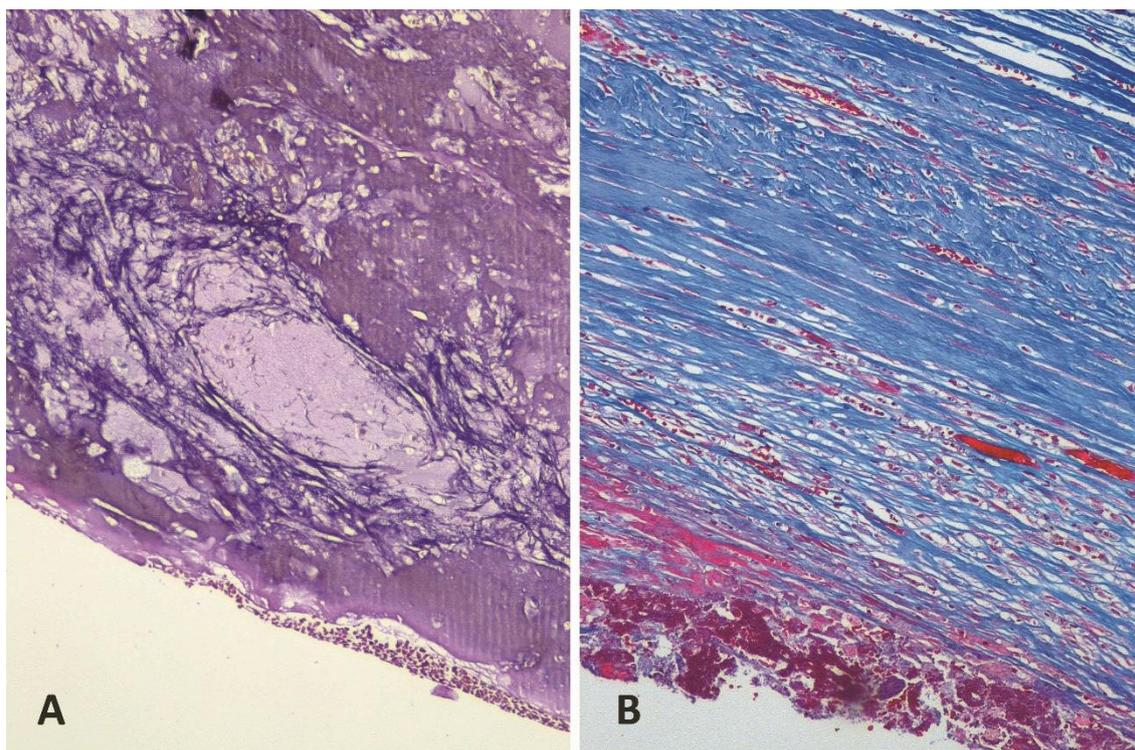


Figura 51: **A:** Tinción de Elásticas x40. Disminución de las fibras elásticas con degeneración vacuolar. **B:** Tricrómico de Masson x10 (permite visualizar las fibras de colágeno tipo I y las fibras reticulares). Fibrosis de la íntima y la media, sin apenas muscular ni íntima.

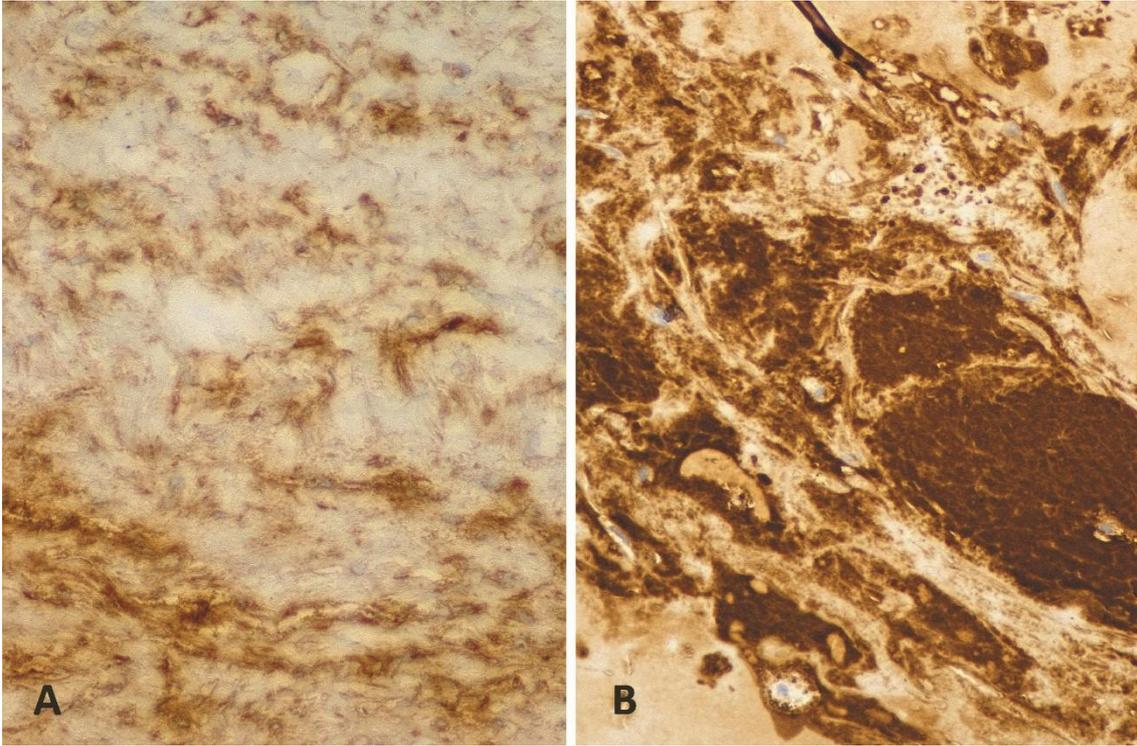


Figura 52: Inmunohistoquímica. **A:** Depósitos de IgG intramurales. **B:** Aumento de la expresión de HLA de clase I, con presencia de antígenos de histocompatibilidad en torno a las fibras elásticas.

DEGENERACIÓN ARTERIA CRIOPRESERVADA 8

Tiempo de evolución:

El aloinjerto fue explantado 26 meses después de la cirugía. Segunda degeneración de arteria criopreservada en este paciente. Doble degeneración anastomótica, proximal y distal, correspondiente a dos criopreservadas distintas empleadas en el mismo bypass y anastomosadas en termino-terminal para alcanzar la longitud necesaria.

Hallazgos histológicos:

Degeneración Proximal (Muestra P)

Cambios muy marcados a nivel de la íntima, que está completamente ocluida por un proceso trombótico del que llama la atención la notable reacción neovascularizadora partiendo de los vasa vasorum y que permea todo el espesor de la pared, alcanzando el trombo central y extendiéndose a lo largo de toda la muestra.

Pérdida notable de celularidad en el estroma de la túnica media, persistiendo en gran parte la integridad de las fibras elásticas y sin aumento de la fibrosis en esta capa.

No hay infiltrado inflamatorio asociado. No se observan cambios degenerativos ateromatosos.

Hallazgos principales: Pérdida celular severa de la túnica media y proliferación intimal posttrombótica (figura 53).

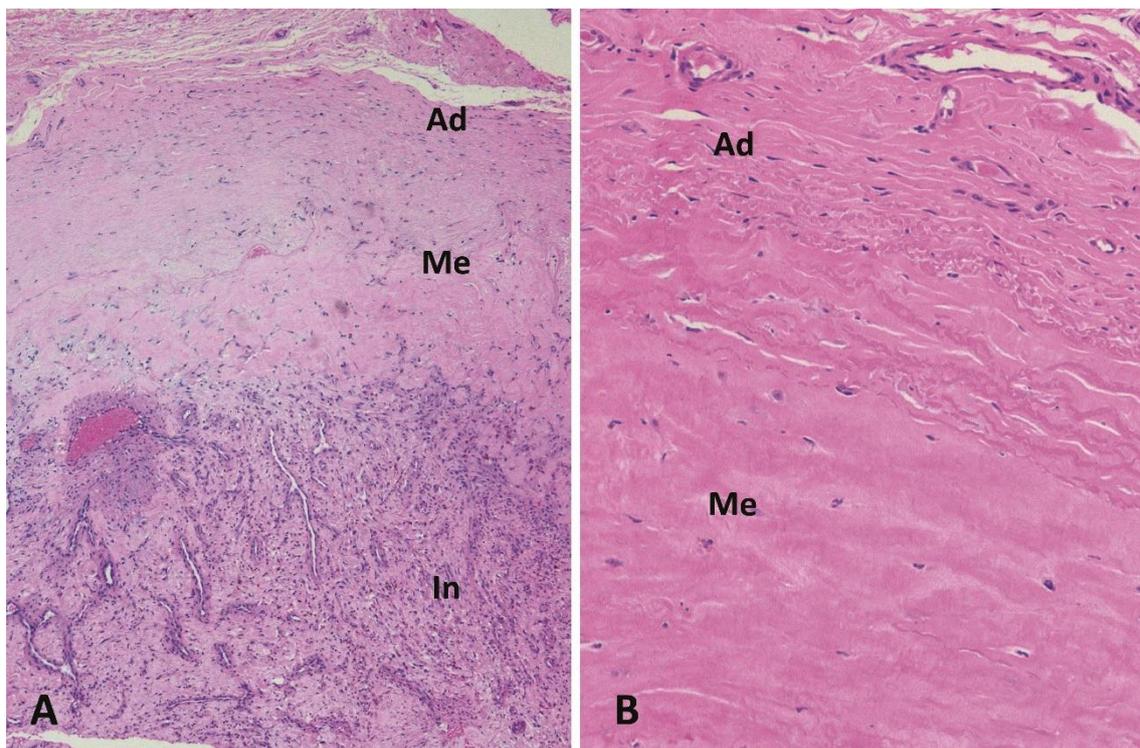


Figura 53: Tinción HE. **In:** Intima. **Me:** Media. **Ad:** Adventicia. **A:** x4 aumentos. Importante pérdida de la celularidad de la capa media, con una gran proliferación intimal posttrombótica y proceso de neovascularización. **B:** x10 aumentos. Escasas células en el estroma de la capa media. No se objetivan infiltrados inflamatorios.

Degeneración Distal (Muestra D)

Notable engrosamiento intimal, con calcificación y osificación que afecta también a la propia túnica media, en un proceso de metaplasia ósea.

Marcada hipocelularidad de la túnica media, con pérdida de la práctica totalidad de las células de esa capa, sustituidas por tejido fibroso. La lámina elástica no está clara.

A diferencia de la muestra proximal (Muestra P), hay infiltrado inflamatorio en pequeño foco, de tipo linfoplasmocitario.

Hallazgos principales: Marcada calcificación de la pared asociada a engrosamiento intimal y focos inflamatorios (figura 54).

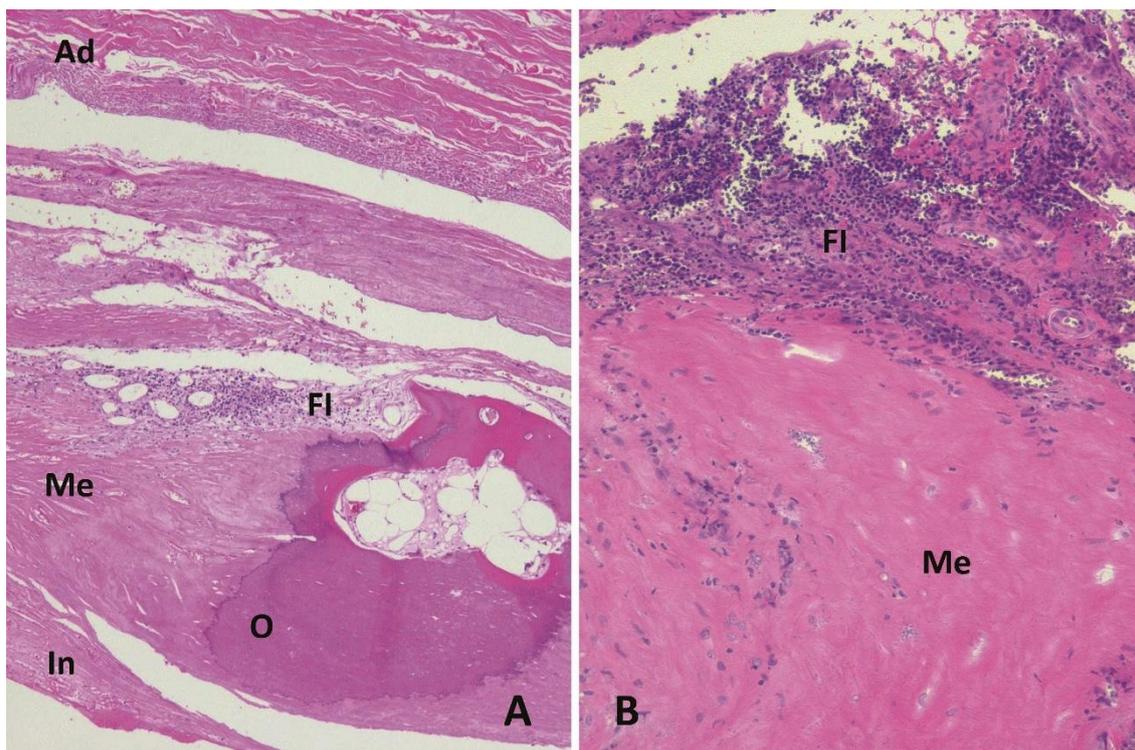


Figura 54: Tinción HE. **In:** Intima. **Me:** Media. **Ad:** Adventicia. **A:** x4 aumentos. Áreas de calcificación/ osificación (**O**), con zonas de infiltrado inflamatorio de pequeño foco (**FI**). **B:** x10 aumentos. Pérdida de la celularidad de la capa media, en la que se observa fibrosis del tejido. Presencia de focos inflamatorios localizados (**FI**).

La tabla 21 muestra las principales diferencias anatomopatológicas entre la degeneración proximal y distal registrada en este paciente. Hay que tener en cuenta que ambas arterias criopreservadas se implantaron en un mismo

bypass, por lo que el tiempo de exposición al sistema inmune del huésped fue idéntico y las fuerzas hemodinámicas a las que fueron sometidas pueden considerarse prácticamente equivalentes. Por un error en el procesamiento de las muestras a su recepción por el laboratorio de Anatomía Patológica, no pudo realizarse estudio de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica.

	INFILTRADO INFLAMATORIO	FIBROSIS DE LA MEDIA	CALCIFICACIÓN Y OSIFICACIÓN
MUESTRA P	-	-	-
MUESTRA D	+	+	+

Tabla 21. Diferencias histológicas entre las muestras proximal y distal de la degeneración de arteria criopreservada 8, correspondientes a degeneraciones anastomóticas de dos arterias de distinto donante conformando un mismo bypass.

RESUMEN DE LOS HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS DE LAS ARTERIAS CRIOPRESERVADAS DEGENERADAS
--

La tabla 22 recopila los hallazgos anatomopatológicos principales atendiendo al tiempo de evolución desde la cirugía hasta la degeneración y el explante, la presencia de focos inflamatorios o de calcificación y la presencia de depósitos de inmunocomplejos en la inmunofluorescencia e inmunohistoquímica.

	Infiltrado Inflamatorio	Focos de calcificación y esclerosis	Positividad Inmunofluorescencia/ Inmunohistoquímica
10 meses	+ (focos)	-	+
24 meses	-	+	+
26 meses (P)	-	-	No disponible
26 meses (D)	+	+	No disponible
33 meses	-	-	+
36 meses	+	-	Inespecífico
53 meses	-	-	+
57 meses	-	-	+
60 meses	Muy escaso	+	-

Tabla 22. Diferencias entre las distintas muestras en cuanto a inflamación, calcificación/ esclerosis e inmunofluorescencia/ inmunohistoquímica, distribuidas en función del tiempo de implante. **P:** Degeneración anastomótica proximal. **D:** Degeneración anastomótica distal (ambas muestras corresponden a degeneraciones anastomóticas de dos arterias de distinto donante conformando un mismo bypass).

Como puede observarse, no existe un patrón temporal con respecto a la presencia de células inflamatorias o de calcificación y esclerosis. Por su parte, la positividad para inmunofluorescencia/ inmunohistoquímica, aunque presente en casi todas las muestras, tampoco parece seguir una regla fija, pudiendo ser negativa.

HALLAZGOS PRINCIPALES
(Anatomía Patológica de las Arterias Criopreservadas Degeneradas)

1. Hipocelularidad de las capas parietales, afectando especialmente a la túnica media que, si bien en ocasiones puede ser casi total, mantiene algunas células viables.
2. Pérdida progresiva de la íntima, sustituida por tejido de granulación.
3. Pérdida de la laminación de las fibras elásticas, con fragmentación de las mismas y persistiendo en ocasiones únicamente la matriz de colágeno.
4. Proceso reparativo fibrosante parietal, con presencia de fibroblastos activados.

Hallazgos variables según la muestra:

- A) Presencia de focos de inflamación crónica, con infiltrado de células mononucleares (linfocitos y células plasmáticas).
- B) Focos de calcificación y esclerosis, con histiocitos espumosos con colesterol intracelular que pueden observarse en todas las capas, con una distribución difusa que no coincide con la estructura clásica de la placa de ateroma.
- C) Presencia de depósitos de inmunocomplejos (C3, IgG y HLA de clase I) en las túnicas íntima y media, afectando principalmente a las zonas más degeneradas y acelulares.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO

Como cabría esperar, los casos control, compuestos por aneurismas de arteria nativa periférica, muestran inflamación crónica afectando a todas las capas, asociada a cambios degenerativos en la pared de los vasos y sin depósitos inmunes. La pérdida de células parietales depende en este grupo del nivel de degeneración, pero incluso en el caso de registrarse la pérdida completa de la capa muscular, ésta solo se ve en las zonas afectadas, y por tanto se descarta un proceso fisiopatológico que afecte a la totalidad de la arteria.

Por el contrario, las arterias criopreservadas analizadas muestran una hipocelularidad de todas las capas, aunque especialmente relevante en la capa media. Se observa la presencia de fibroblastos activados, responsables de la fibrosis parietal y el tejido de granulación intimal. Sin embargo, a pesar de que estos cambios son constantes en las muestras analizadas, también hemos visto otros hallazgos que no son igual de consistentes en la serie. Tres son los hallazgos variables entre los pacientes con degeneración aneurismática de arteria criopreservada:

En primer lugar, la presencia de infiltrado inflamatorio solo se observa en algunas muestras. De hecho, una mayoría de las mismas no registra células inflamatorias en la pared del vaso degenerado. Esta variabilidad llama especialmente la atención, ya que como describimos inicialmente en el capítulo de introducción sobre los cambios histopatológicos de estos injertos, el rechazo crónico provoca, fundamentalmente, infiltrado inflamatorio de la adventicia, necrosis de la media y proliferación de la íntima.

El segundo hallazgo variable en las arterias degeneradas consistió en la presencia de focos de calcificación y esclerosis, con histiocitos espumosos de colesterol intracelular, y que además afecta a todas las capas con una distribución anular, difusa. Ya hemos comentado previamente que esta distribución no coincide con la estructura clásica de la placa de ateroma, y sí con la vasculopatía del trasplante descrita en los vasos de órganos sólidos, especialmente en las arterias coronarias de corazones trasplantados ¹⁴⁴. Estas alteraciones serían responsables de la aparición de estenosis mediada inmunológicamente, si bien las fuerzas hemodinámicas en las regiones de turbulencia que conforman las anastomosis y la propia evolución de la enfermedad arterial periférica participarían igualmente en el desarrollo de esta complicación.

En tercer lugar, el análisis inmunohistoquímico y con inmunofluorescencia arroja también cierta variabilidad. Se objetiva la presencia de depósitos de inmunocomplejos (C3, IgG y HLA de clase I) en las tunicas íntima y media, que tienen tendencia a acumularse en torno a las zonas más dañadas del injerto y con menor celularidad, lo que sugiere un componente humoral en el proceso de rechazo de los trasplantes arteriales. Los resultados descritos coinciden con los descritos por los equipos de Bieber, Hayry y Plissonnier en el trasplante cardiaco y vascular ^{120,122,123}. Sin embargo, aunque estos hallazgos son claramente mayoritarios entre los pacientes de nuestra muestra, están ausentes en un paciente, y son dudosos en otro. Esta falta de homogeneidad

resulta especialmente llamativa, teniendo en cuenta que lo que cabría esperar sería la presencia de depósitos de inmunocomplejos en todas las arterias criopreservadas trasplantadas al comprobarse las diferencias entre antígenos de histocompatibilidad de donante y receptor. Si nuestros resultados en el capítulo de inmunología confirman que todos los pacientes registran una reacción inmunológica consistente en la formación de anticuerpos donante-específicos, entonces ¿por qué no se observan depósitos de inmunocomplejos en todos ellos?

La razón para estos dos hallazgos podría encontrarse en el modelo de rechazo vascular de Plissonnier y su equipo^{120,121}, que ya hemos descrito en la introducción de este trabajo. En él, aunque se describen aloinjertos de aorta de rata no criopreservados, se muestra un proceso de rechazo vascular crónico consistente en una serie encadenada y a la vez simultánea de cambios parietales mediados inmunológicamente. En función del momento puntual en el que se analiza el injerto, y por tanto del proceso crónicos de rechazo, se observarían unas u otras alteraciones en la pared de la arteria criopreservada.

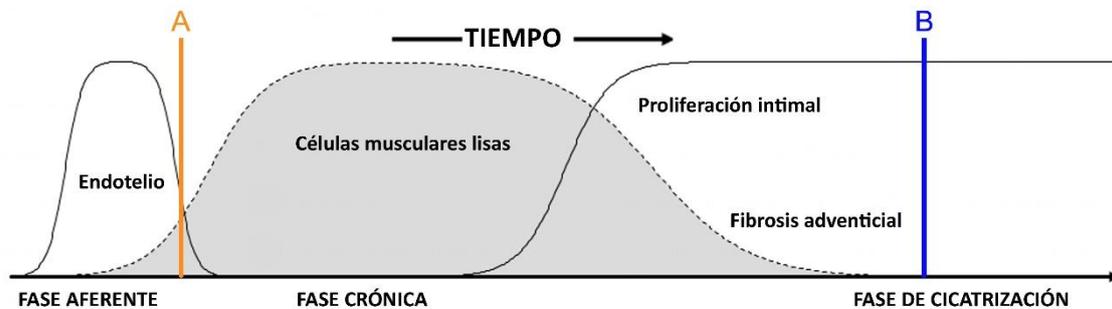


Figura 55. Representación esquemática de las diferentes fases en el proceso de rechazo de aloinjertos de aorta de rata. Las barras muestran hipotéticos cortes transversales en el tiempo para analizar puntualmente el rechazo crónico de estos injertos. Modificado de Plissonnier et al, 1995¹²⁰.

En este modelo, un estudio inmunohistoquímico en la fase de cicatrización (Barra B azul de la figura 55) no arrojaría los mismos resultados que en la fase crónica (Barra A amarilla), ya que en el primero el endotelio original del donante han sido sustituidas por una proliferación intimal de células musculares lisas migradas a tal efecto, y las células musculares lisas de la capa media se han necrosado como consecuencia del proceso crónico de rechazo. Los depósitos de inmunoglobulinas observados en la capa media aparecen como pequeños acúmulos granulares rodeando células musculares lisas en áreas donde se está produciendo necrosis de las mismas. La cronología de estos depósitos coincide con la de los pocos linfocitos observados en la media, sin observarse nuevos depósitos posteriormente.

Si tomamos como referencia el modelo de Plissonnier y confirmado posteriormente para aloinjerto criopreservados de aorta de rata por Motomura^{124,125}, los hallazgos descritos en nuestra muestra podrían explicarse atendiendo a un criterio de temporalidad, dependiendo de la fase del rechazo crónico en el que se encuentra inmerso el injerto. Por lo tanto, la ausencia de los mismos en

una muestra histológica no implica que la reacción inmunológica no esté presente, y además no podemos descartar que ésta no afecte de forma distinta a diferentes segmentos del injerto, lo que explicaría por qué unas secciones terminan degradándose y otras no. Las degeneraciones aneurismáticas pueden producirse tanto a los pocos meses del trasplante (en nuestra serie la degeneración más temprana fue a los 10 meses), como años después del implante (67 meses de tiempo de latencia máximo en nuestro estudio). Llama la atención, como ya habíamos comentado, que no se objetiva una relación clara entre el tiempo de implante y la presencia de células inflamatorias, calcificación o esclerosis (ver tabla 22 en capítulo previo de resultados anatomopatológicos).

Esto parece corroborar la idea de una etiología multifactorial en el fracaso de los trasplantes de arteria criopreservada, en los que el rechazo inmunológico tiene lugar en todos los injertos, pero las consecuencias del mismo no serán uniformes ni seguirán el mismo patrón temporal entre unos y otros bypasses. En cuanto a la positividad para inmunofluorescencia, sólo es claramente negativo en el injerto explantado a los 60 meses, el de mayor tiempo de trasplante. Quizá podría inferirse una posible disminución de la misma en el tiempo justificada por la eventual desaparición de los depósitos de inmunocomplejos, pero desde luego se trataría de una conclusión a tomar con mucha cautela solamente a luz de nuestros resultados y requeriría un mayor tamaño muestral para confirmarla.

Esta hipótesis de trabajo explicaría los hallazgos en el aloinjerto extraído a los 26 meses del implante (degeneración de arteria criopreservada número 8 en el anterior capítulo de resultados anatomopatológicos). Se trata de un caso de doble degeneración, en las anastomosis proximal y distal, correspondiente a dos criopreservadas distintas anastomosadas en posición termino-terminal para alcanzar la longitud requerida por el bypass. Lo que resulta verdaderamente interesante es que la presencia de infiltrado de células inflamatorias, así como de calcificación y esclerosis parietal, solamente se observan en el segmento distal. Cabría esperar que dos arterias criopreservadas implantadas simultáneamente, que son sometidas prácticamente al mismo distrés hemodinámico al conformar un único bypass, y que han evolucionado a sendas degeneraciones parietales, compartiesen hallazgos anatomopatológicos una vez explantadas. En este caso, la influencia del sistema inmune del huésped ha ejercido su efecto durante el mismo espacio de tiempo, con idéntico resultado en cuanto a degradación del tejido, pero con diferentes características anatomopatológicas. Estos resultados sugieren que las diferencias antigénicas entre un aloinjerto y otro pueden ser responsables de reacciones inmunológicas en distinto grado de evolución, pero que, sin embargo, no impiden la degeneración de ambos segmentos, si bien es igualmente probable la participación de otros factores concomitantes responsables de los aneurismas observados.

No obstante, debemos tomar estos hallazgos con prudencia, ya que la muestra de estudio es relativamente baja y sería necesario una "n" mayor para poder obtener conclusiones definitivas. A pesar de ello, hemos reunido un número considerable de aloinjerto degenerados explantados para el análisis, sobre todo si tenemos en cuenta las publicaciones disponibles con estudios

anatomopatológicos e inmunohistoquímicos sobre arterias criopreservadas en humanos, y más concretamente sobre arterias criopreservadas degeneradas.

Como ya hemos visto en la introducción, el porcentaje de degeneraciones en aloinjertos criopreservados es menor al de los trasplantes vasculares en fresco (ver la tabla 2). La revisión realizada sobre las publicaciones en la literatura médica con respecto a la aloantigenicidad de estos injertos da cuenta de la dificultad para establecer un criterio definitivo.

Cabría suponer que el proceso de criopreservación reduce la degeneración de lo aloinjertos en razón a, al menos, una de las siguientes causas:

- a) Disminuye la reacción inmunológica del huésped a pesar de ser capaz de activar la misma en virtud de los antígenos presentes en el aloinjerto.
- b) Algún otro factor del proceso de criopreservación genera cambios en la estructura de la pared del vaso que actúan como protector frente a la degeneración aneurismática del aloinjerto.

Es nuestra opinión, en virtud de los resultados de nuestro estudio y la revisión bibliográfica, que los trasplantes vasculares criopreservados continúan siendo capaces de generar una respuesta inmunológica que además es específica frente al donante. A pesar de ello, los cambios histológicos consecuencia del proceso de criogenización y descongelación sí van a reducir la degeneración aneurismática de estos injertos, ya que, si bien es discutible que el infiltrado inflamatorio no presente diferencias entre aloinjertos en fresco y criopreservados, el menor número de dianas celulares inmunoestimuladoras en estos últimos (fundamentalmente células endoteliales y musculares lisas) produciría una reacción de rechazo crónico menos lesiva para la pared del bypass.

RESULTADOS DEL ESTUDIO INMUNOLÓGICO

Todos los pacientes mostraron una reacción inmunológica tras el trasplante arterial, consistente en un incremento significativo de anticuerpos anti-HLA detectable al mes de la cirugía. Estos cambios no fueron observados en el primer control, a la semana del implante, pero fueron consistentes a posteriori. Se evaluó la presencia de anticuerpos específicos frente a donante (DSA) en 14 pacientes con 16 bypasses, en los que el perfil HLA del donante estaba disponible y se había confirmado una permeabilidad del injerto de al menos 3 meses. Estas condiciones permiten comparar los perfiles de donante y receptor, confirmar la especificidad de las inmunoglobulinas generadas y analizar la formación de anticuerpos en el tiempo, si bien se reduce notablemente el tamaño de la muestra. Esto se debe a la baja permeabilidad y el empleo, en ocasiones, de arterias criopreservadas obtenidas de otros bancos de tejidos nacionales, no siendo imposible obtener el perfil HLA del donante en dichos casos.

No se objetivó el hallazgo de compatibilidad HLA aleatoria entre ninguno de los donantes y sus receptores respectivos, salvo para algunos alelos o genes. Al igual que en el estudio general de anticuerpos anti-HLA, se comprobó que todos los pacientes mostraban una reacción inmunológica detectable tras el trasplante vascular, consistente en anticuerpos IgG específicos frente a antígenos de histocompatibilidad de sus respectivos donantes, aunque su formación era significativamente mayor contra antígenos HLA-A, HLA-B y HLA-DR. También fue éste el caso de anticuerpos producidos en relación con incompatibilidad HLA o HLA-mismatching. Se registró la presencia de DSA frente a HLA-A, HLA-B y HLA-C (HLA de clase I) en un 92,8%, 92,8% y 28,5%, respectivamente, mientras que para HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP (clase II) esos porcentajes se correspondían con 71,4%, 57,1% y 35,7%.

Por otro lado, 13 pacientes (92,8% de la muestra) fueron considerados hipersensibilizados, mostrando un Panel Reactive Antibody o PRA superior al 94%. Solamente un paciente presentaba un PRA inferior, del 76,7%. Cuando nuevos aloinjertos fueron implantados al paciente 13, el valor PRA aumentó en consecuencia, incrementando el grado de sensibilización (figura 56).

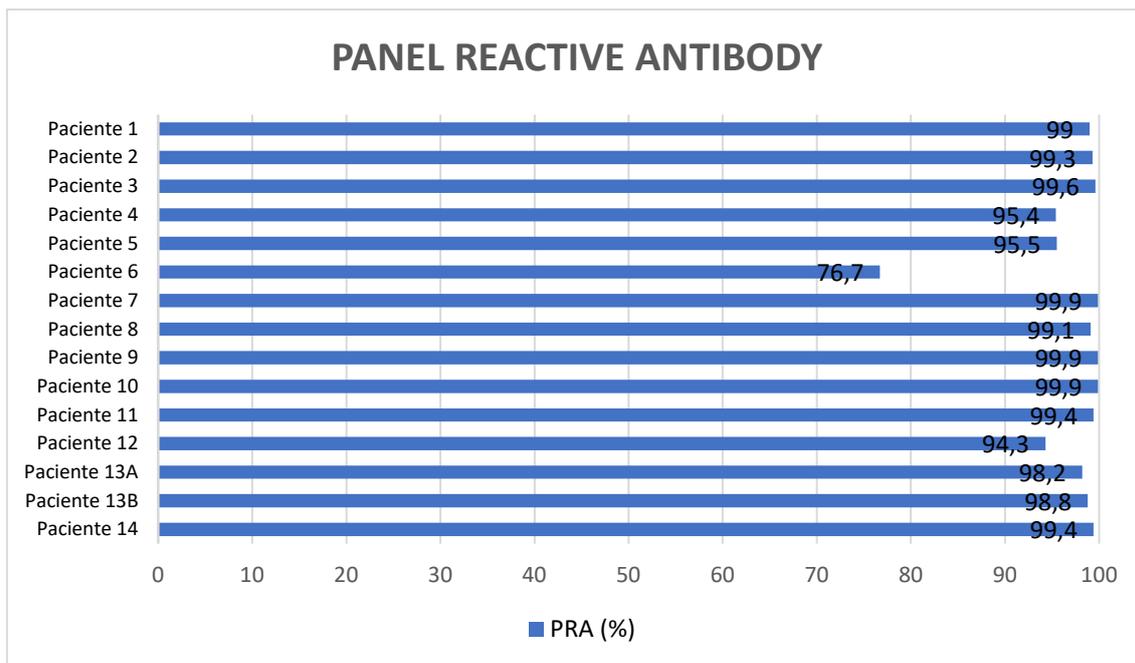


Figura 56. Representación gráfica de los valores del Panel Reactive Antibody test para cada paciente. El paciente 13 recibió dos aloinjertos vasculares separados en el tiempo, mostrándose los PRA correspondientes.

A continuación se exponen, de forma resumida, los resultados de los perfiles antigénicos para HLA de clase I y II tanto de los donantes como de los receptores de nuestra serie, así como el hallazgo durante el seguimiento de anticuerpos específicos frente a antígenos del donante (tabla 23).

Aunque en la tabla no se indican los valores cuantitativos de los anticuerpos, permite ver las coincidencias antigénicas y la formación de DSA ante la ausencia de las mismas. Se muestra el tipaje serológico, excepto en alelos sin equivalente serológico, en cuyo caso se emplean los primeros dígitos.

Tabla resumen de fenotipos de HLA y producción de DSA

ID	Paciente (receptor)		Donante	
	HLA clase I	HLA clase II	HLA clase I	HLA clase II
1	A1,68; B44,53; C4,16	DR7,1; DQ2,5; DP11,17	A1,2; B44,57; C5,7	DR7,12; DQ7,9; DP4,6
2	A2,29; B18,44; C4,7	DR7,11; DQ2,7; DP4,-	A2,3; B35,50; C4,6	DR7,17; DQ2,-; DP4,7
3	A2,-; B51,58; C7,15	DR13,17; DQ2,6; DP4,13	A1,-; B8,57; C6,7	DR7,17; DQ2,-; DP2,4
4	A3,11; B7,18; C5,7	DR15,17; DQ2,6; DP2,4	A2,3; B8,44; C5,7	DR11,13; DQ6,7; DP4,17
5	A11,30; B7,44; C4,7	DR4,-; DQ4,8; DP3,4	A2,68; B45,51; C6,15	DR13,14; DQ7,8; DP3,10
6	A29,30; B8,38; C7,12	DR11,17; DQ2,7; DP4,11	A2,68; B45,51; C6,15	DR13,14; DQ7,8; DP3,10
7	A1,-; B57,-; C6,-	DR7,13; DQ6,9; DP2,4	A2,31; B50,51; C6,15	DR7,7; DQ2,9; DP4,-
8	A1,33; B65,57; C6,8	DR4,15; DQ6,8; DP4,23	A2,-; B39,50; C6,12	DR11,13; DQ6,7; DP2,4
9	A29,-; B65,-; C3,8	DR1,17; DQ2*,5; DP2,4	A29,32; B44,52; C12,16	DR7,17; DQ2*,-, DP2,11
10	A25,33; B62,65; C3,8	DR1,12; DQ5,7; DP3,10	A2,3; B35,50; C4,6	DR7,17; DQ2,-; DP3,4
11	A2,-; B35,49; C4,7	DR4,11; DQ7,8; DP4,-	A2,31; B50,51; C6,15	DR7,-; DQ2,9; DP3,4
12	A29,68; B44,-; C16,-	DR4,7; DQ2,8; DP4†,11	A68,68; B39,50; C6,7	DR8,16; DQ4,5; DP3,4†
13A	A1,11; B39,57; C7,12	DR4,7; DQ7,9; DP3,4	A1,2; B44,57; C5,7	DR7,12; DQ7,9; DP4,6
13B			A2‡,3; B44‡,53; C4,5	DR1,15; DQ5,6; DP2,6
14A	A2,-; B44,51; C5,15	DR11,13; DQ5,7; DP4,13	A1,29; B8,44; C7,16	DR1,4; DQ5,8; DP4,4
14B			A29,32; B44,-; C5,16	DR7,12; DQ2,7; DP4,11

* Receptor: DQA01*05:01. Donante: DQA01*02:01. †: Receptor: DPB04:01. Donante: DPB04:02. ‡: DSA formados previamente, después del primer trasplante vascular.

Table 23. Perfiles de HLA para donantes y receptores en la muestra. Tanto el paciente 13A/13B, como el 14A/14B, corresponden a trasplantes vasculares consecutivos en los respectivos pacientes. El guión indica antígenos homocigotos. Anticuerpos específicos frente a HLA del donante (DSA) se muestran en negrita. Las coincidencias de HLA entre donantes y receptores aparecen subrayadas.

En el caso del paciente 14A/14B, ambos aloinjertos fueron implantados muy próximos entre sí, en menos de una semana, por lo que no se alcanzó el tiempo necesario para el análisis de anticuerpos entre ambos bypasses. Los pacientes 2 y 10, 5 y 6, así como 1 y 13, recibieron arterias criopreservadas del mismo donante, respectivamente, y por tanto el perfil HLA del donante es idéntico entre ambos injertos.

Es importante señalar, de particular interés para nuestro estudio, que durante el seguimiento se objetivó la degeneración aneurismática de las arterias criopreservadas de los pacientes 6 y 12.

Esta tabla, si bien representa de una forma simplificada la presencia de anticuerpos específicos frente a antígenos de donante, no refleja otros aspectos de interés, como el número de anticuerpos presentes. Seguidamente se muestran un análisis pormenorizado para cada paciente de los perfiles de HLA de donante y receptor, la especificidad de los anticuerpos hallados, la presencia de otros anticuerpos no donante específicos y la cuantificación de los mismos frente a los alelos de HLA de clase I y II. Este último parámetro se representa por medio de gráficas de barras en las que el número de anticuerpos reflejado la medida de inmunofluorescencia (el procedimiento de medición se describe en detalle en el capítulo de Material y Métodos).

PAC. 1	HLA A		HLA B		HLA C		HLA DR		HLA DQ			HLA DP	
	A1	A68	B44	B53	C4	C16	DR7	DR1	DQ2	DQ5	DP11	DP17	
RECEPTOR	A1	A2	B44	B57	C5	C7	DR7	DR12	DQ7	DQ9	DP4	DP6	
D.S.A.		Sí		Sí	No	No		Sí	Sí	Sí	No	No	
OTROS AC	Sí (A69)		Sí(B15,B58)		No		Sí (7)		Sí (1)			No	

Tabla 24. Perfiles HLA para donante y receptor, incluyendo la formación de anticuerpos clasificados por clases (tanto donante específicos como otros anticuerpos).

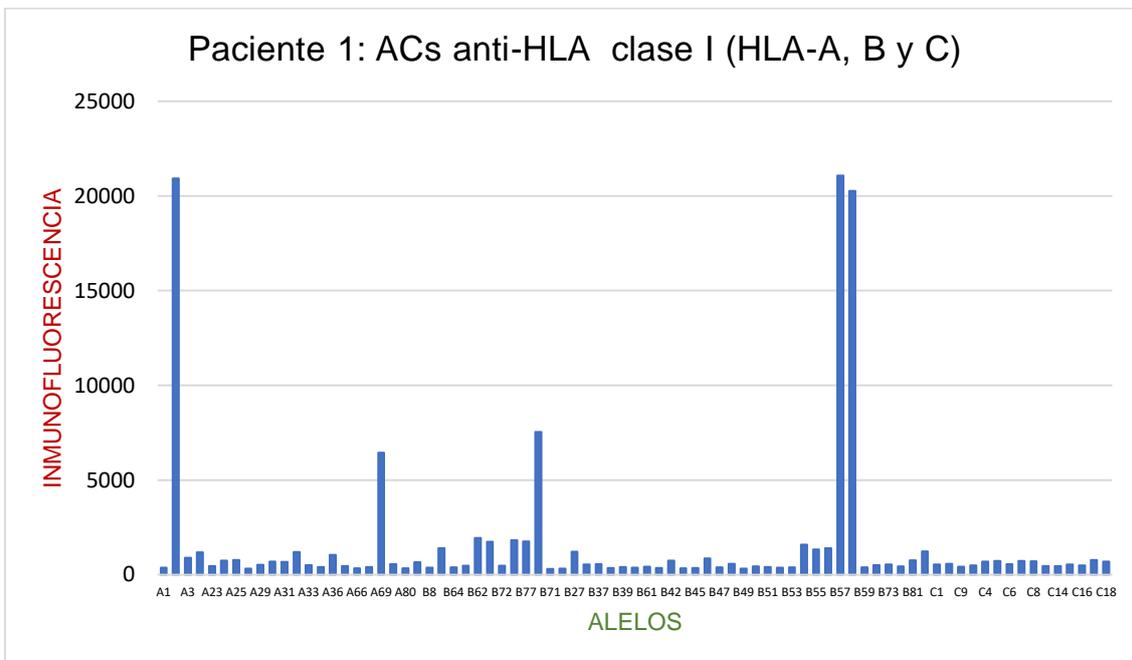


Figura 57. Análisis cuantitativo por inmunofluorescencia de los anticuerpos anti-HLA de clase I

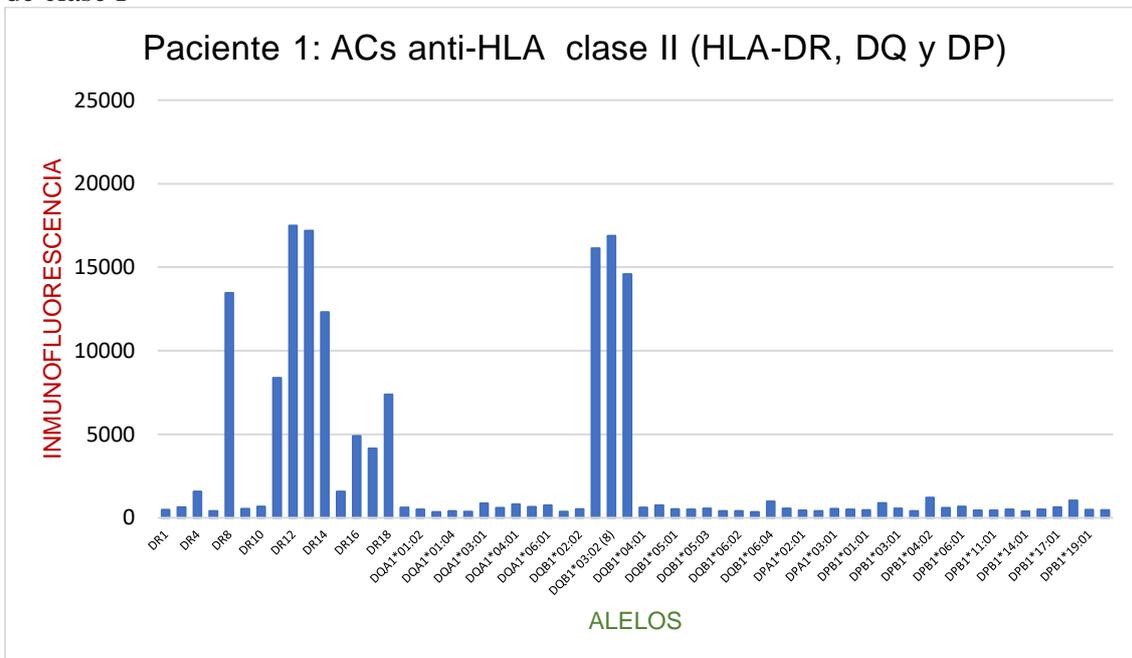


Figura 58. Análisis cuantitativo por inmunofluorescencia de los anticuerpos anti-HLA de clase II

PAC. 2	HLA A		HLA B		HLA C		HLA DR		HLA DQ		HLA DP	
	A2	A29	B18	B44	C4	C7	DR7	DR11	DQ2	DQ7	DP4	DP4
DONANTE	A2	A3	B35	B50	C4	C6	DR7	DR17	DQ2	DQ2	DP3	DP4
D.S.A.		Sí	Sí	Sí		No		Sí			Sí	
OTROS AC	Sí (12)		Sí (29)		Sí (C3)		Sí (8)		No		Sí (12)	

Tabla 25. Perfiles HLA para donante y receptor, incluyendo la formación de anticuerpos clasificados por clases (tanto donante específicos como otros anticuerpos).

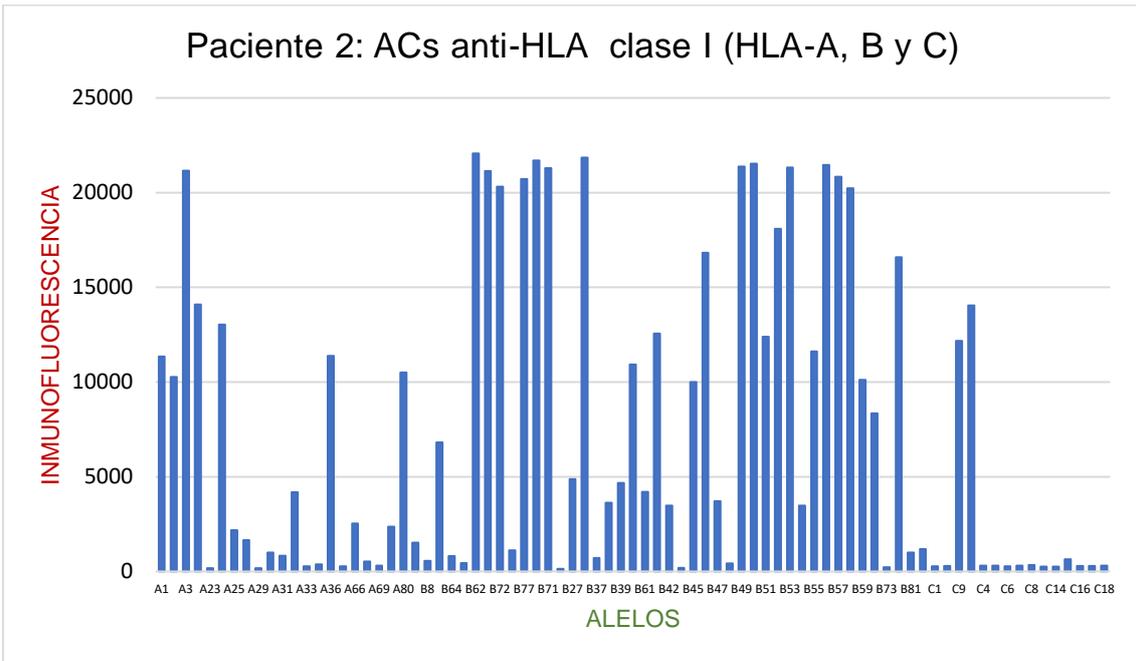


Figura 59. Análisis cuantitativo por inmunofluorescencia de los anticuerpos anti-HLA de clase I

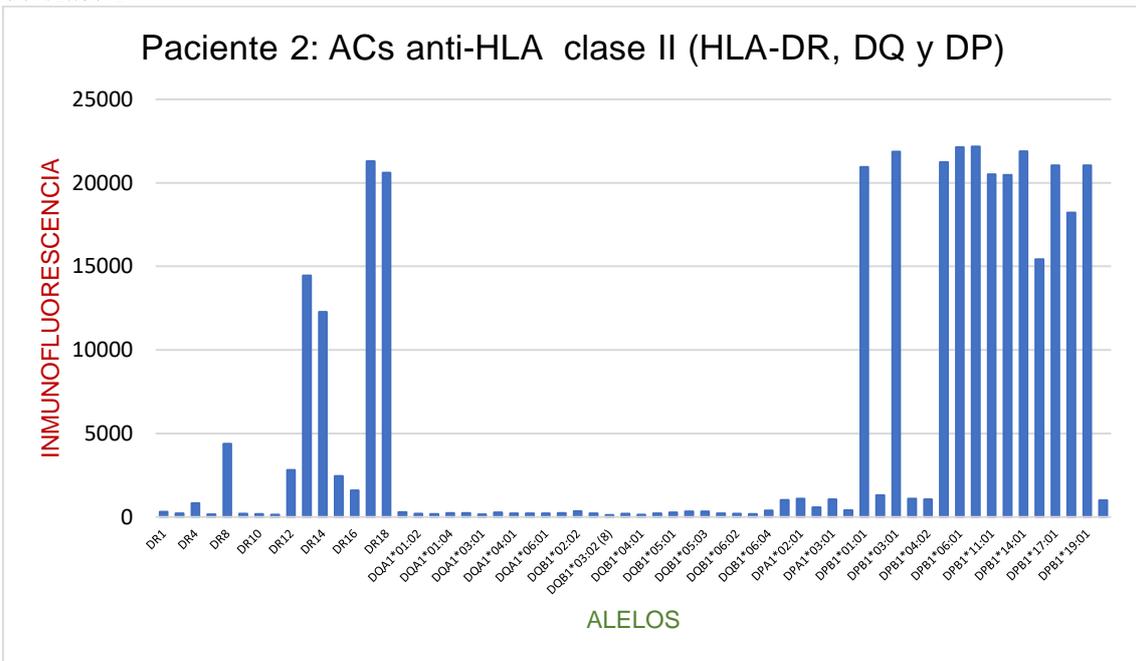


Figura 60. Análisis cuantitativo por inmunofluorescencia de los anticuerpos anti-HLA de clase II

PAC. 3	HLA A		HLA B		HLA C		HLA DR		HLA DQ		HLA DP	
	A2	A2	B51	B58	C7	C15	DR3	DR13	DQ2	DQ6	DP4	DP13
RECEPTOR	A1	A1	B8	B57	C7	C6	DR17	DR7	DQ2	DQ2	DP4	DP2
D.S.A.	Sí	Sí	Sí	Sí		No	Sí	Sí				Si
OTROS AC	Sí (18)		Sí (24)		No		Sí (5)		DQA02:01		Sí (9)	

Tabla 26. Perfiles HLA para donante y receptor, incluyendo la formación de anticuerpos clasificados por clases (tanto donante específicos como otros anticuerpos). Tiene anticuerpos frente a DPB04:02. Donante y receptor son DPB04:01

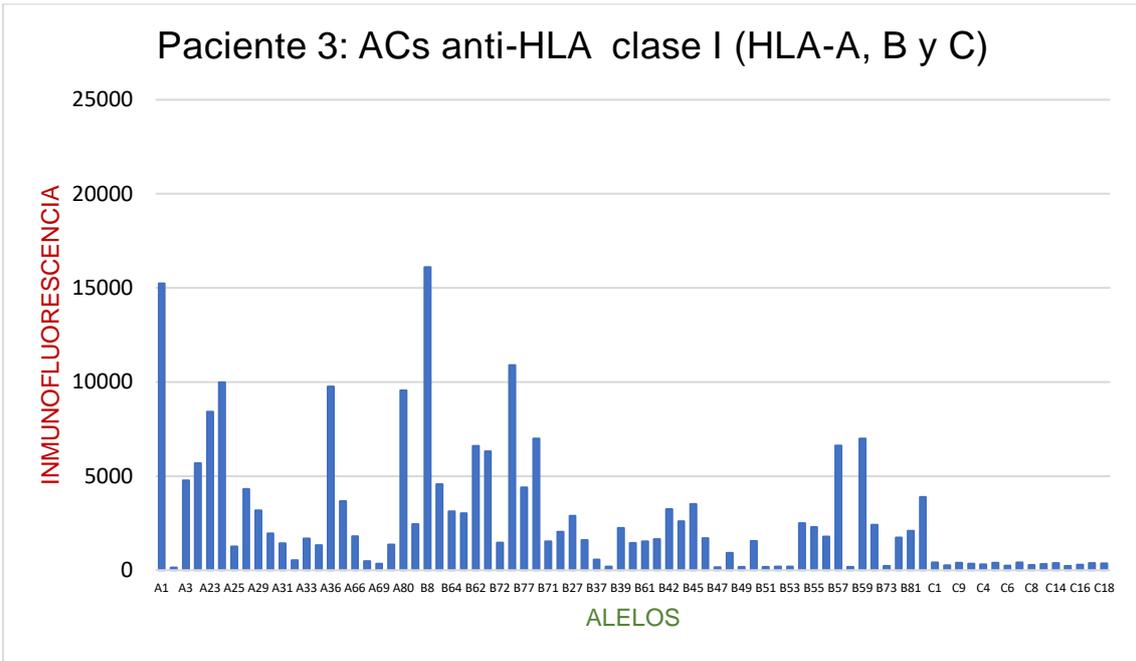


Figura 61. Análisis cuantitativo por inmunofluorescencia de los anticuerpos anti-HLA de clase I

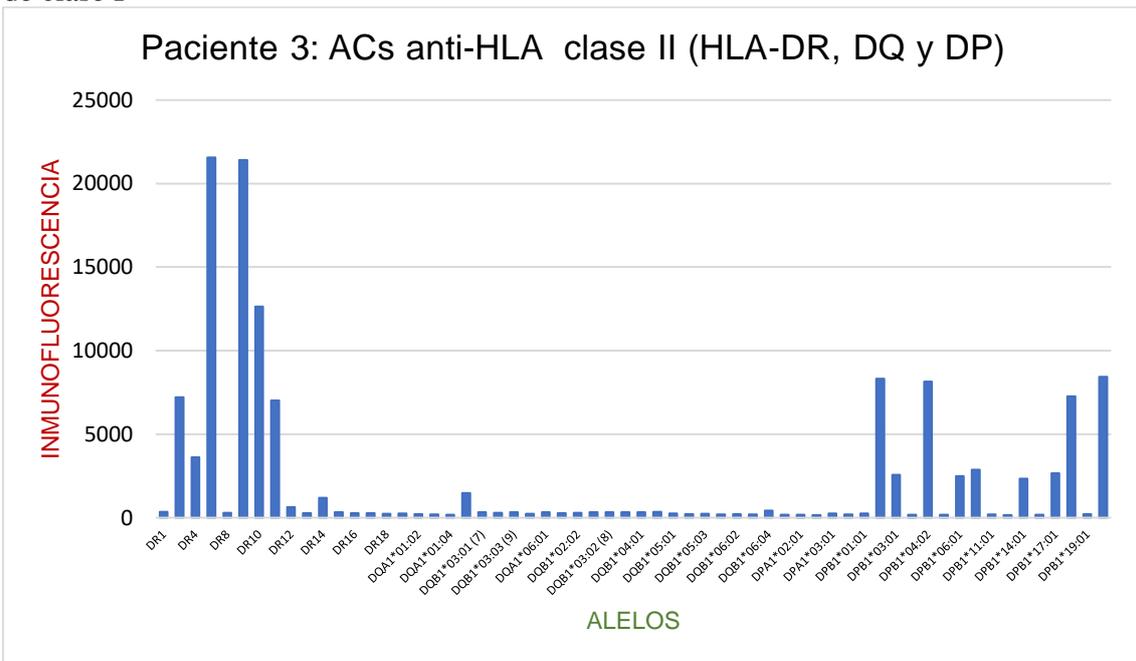


Figura 62. Análisis cuantitativo por inmunofluorescencia de los anticuerpos anti-HLA de clase II

PAC. 4	HLA A		HLA B		HLA C		HLA DR		HLA DQ		HLA DP	
RECEPTOR	A3	A11	B7	B18	C5	C7	DR17	DR15	DQ6	DQ2	DP4	DP2
DONANTE	A3	A2	B8	B44	C5	C7	DR11	DR13	DQ6	DQ7	DP4	DP17
D.S.A.		Sí	Sí	Sí			Sí	No		Sí		Sí
OTROS AC	Sí (16)		Sí (20)		No		Sí (5)		Sí (2)		Sí (14)	

Tabla 27. Perfiles HLA para donante y receptor, incluyendo la formación de anticuerpos clasificados por clases (tanto donante específicos como otros anticuerpos). Tiene anticuerpos frente a DPB04:02. Donante y receptor son DPB04:01.

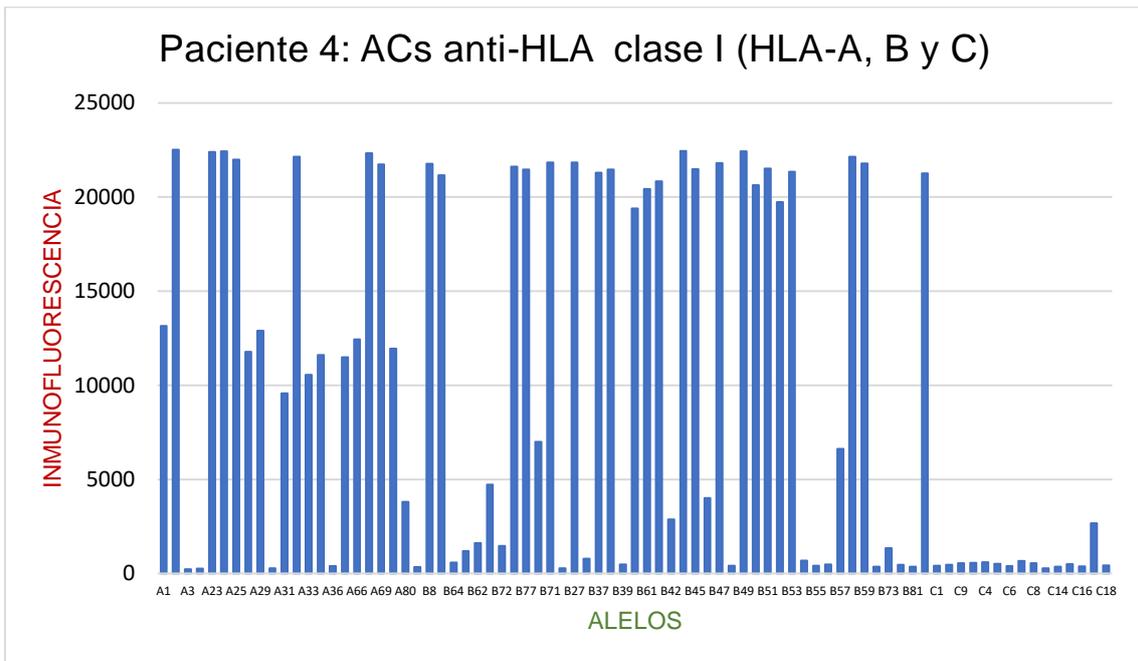


Figura 63. Análisis cuantitativo por inmunofluorescencia de los anticuerpos anti-HLA de clase I

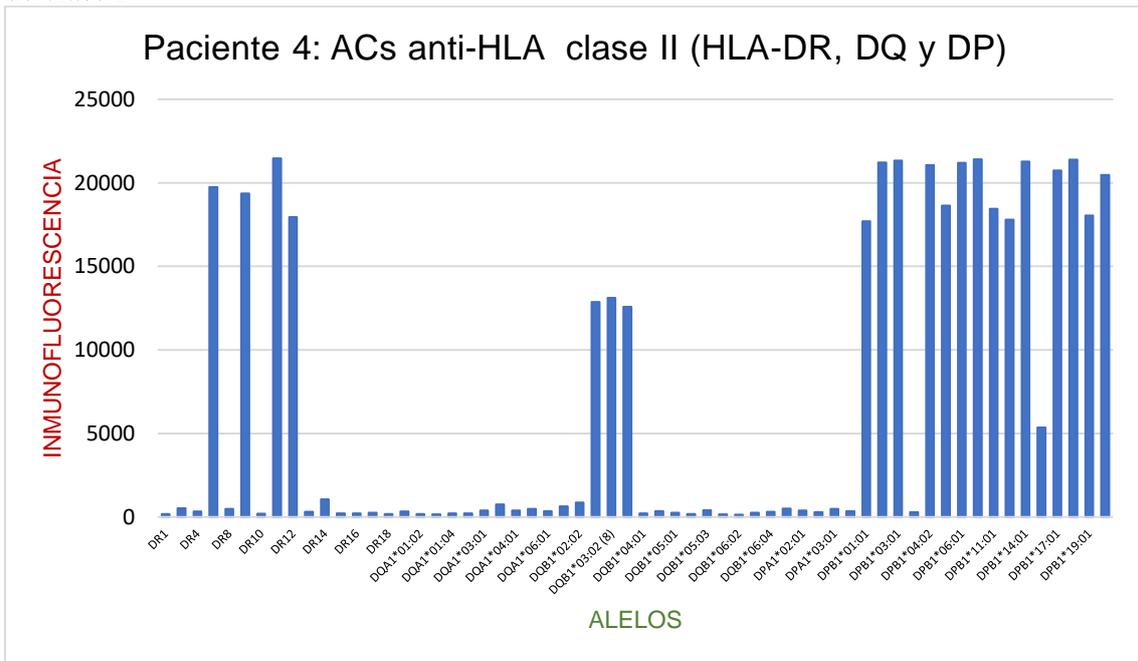


Figura 64. Análisis cuantitativo por inmunofluorescencia de los anticuerpos anti-HLA de clase II

PAC. 5	HLA A		HLA B		HLA C		HLA DR		HLA DQ		HLA DP	
RECEPTOR	A11	A30	B7	B44	C4	C7	DR4	DR4	DQ8	DQ4	DP3	DP4
DONANTE	A2	A68	B45	B51	C6	C15	DR13	DR14	DQ8	DQ7	DP3	DP10
D.S.A.	Sí	Sí	No	Sí	No	No	Sí	Sí		Sí		N.D.
OTROS AC	Sí (10)		Sí (16)		Sí (C3)		Sí (12)		DQA		Sí (10)+DPA	

Tabla 28. Perfiles HLA para donante y receptor, incluyendo la formación de anticuerpos clasificados por clases (tanto donante específicos como otros anticuerpos). Tiene anticuerpos frente a DPB04:02. Donante y receptor son DPB04:01. Además, genera anticuerpos anti DPA DSA 02:01. N.D.: No determinado.

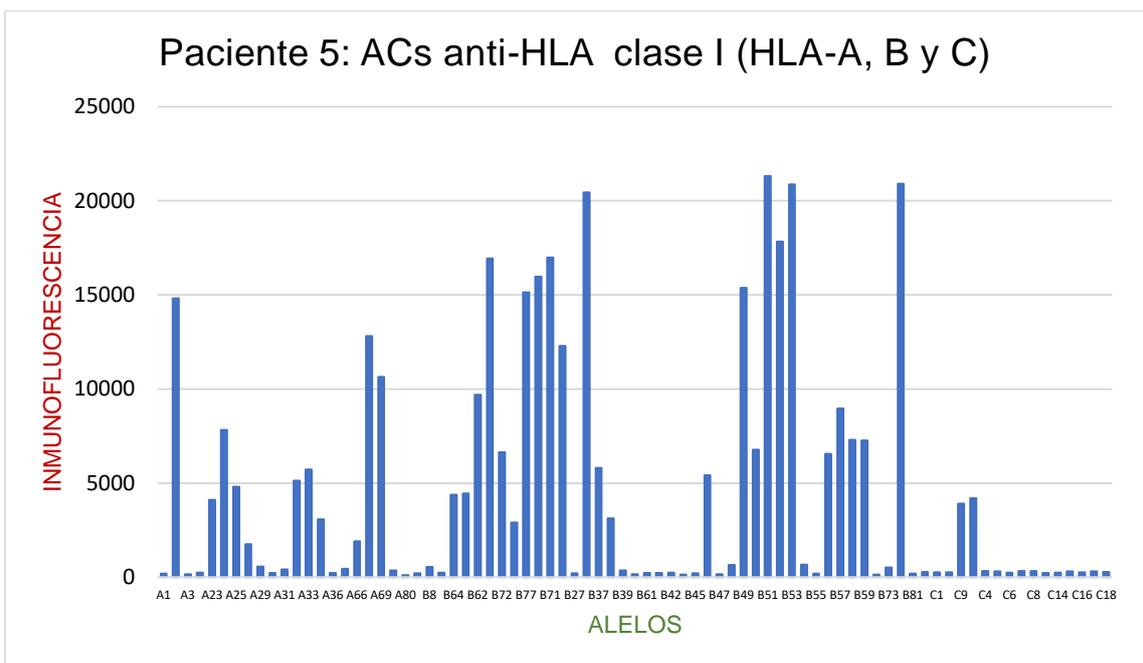


Figura 65. Análisis cuantitativo por inmunofluorescencia de los anticuerpos anti-HLA de clase I

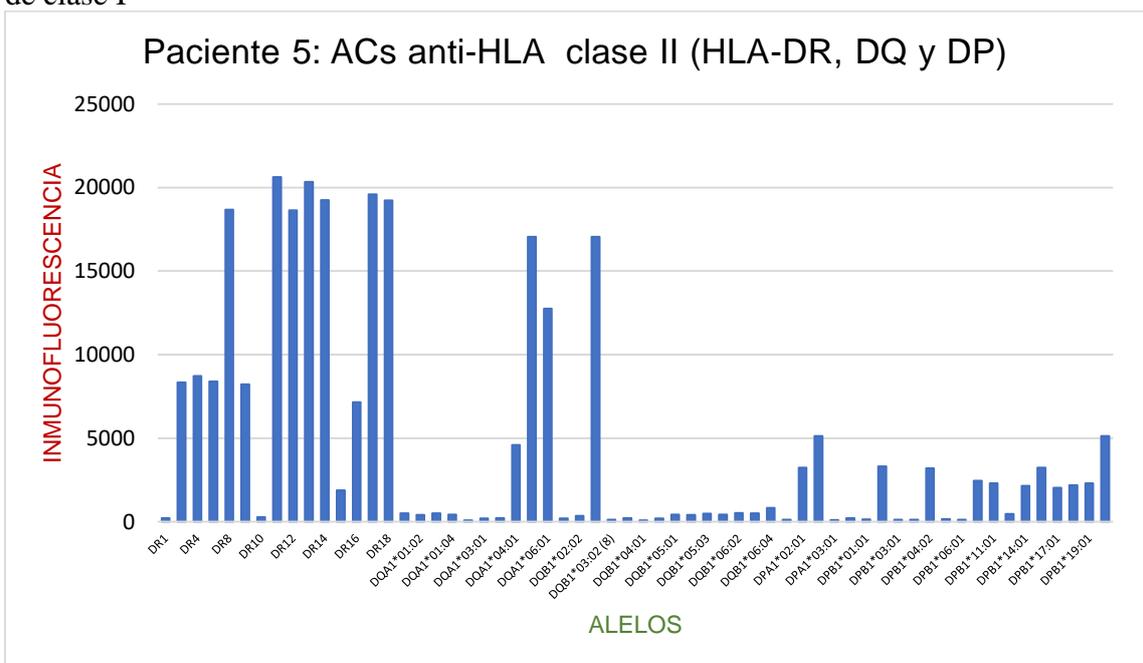


Figura 66. Análisis cuantitativo por inmunofluorescencia de los anticuerpos anti-HLA de clase II

PAC. 6	HLA A		HLA B		HLA C		HLA DR		HLA DQ		HLA DP	
	A29	A30	B8	B38	C7	C12	DR17	DR11	DQ7	DQ2	DP4	DP11
RECEPTOR	A2	A68	B45	B51	C6	C15	DR13	DR14	DQ7	DQ8	DP3	DP10
D.S.A.	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No		No	No	N.D.
OTROS AC	Sí (14)		Sí (29)		Sí (5)		No		No		No	

Tabla 29. Perfiles HLA para donante y receptor, incluyendo la formación de anticuerpos clasificados por clases (tanto donante específicos como otros anticuerpos).

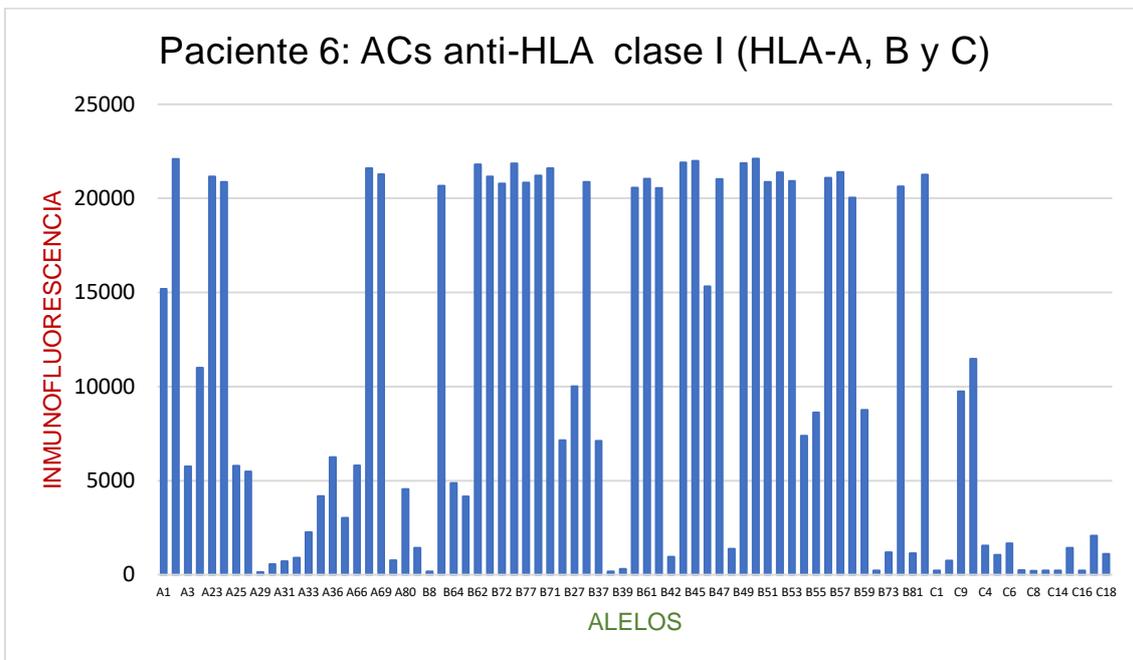


Figura 67. Análisis cuantitativo por inmunofluorescencia de los anticuerpos anti-HLA de clase I

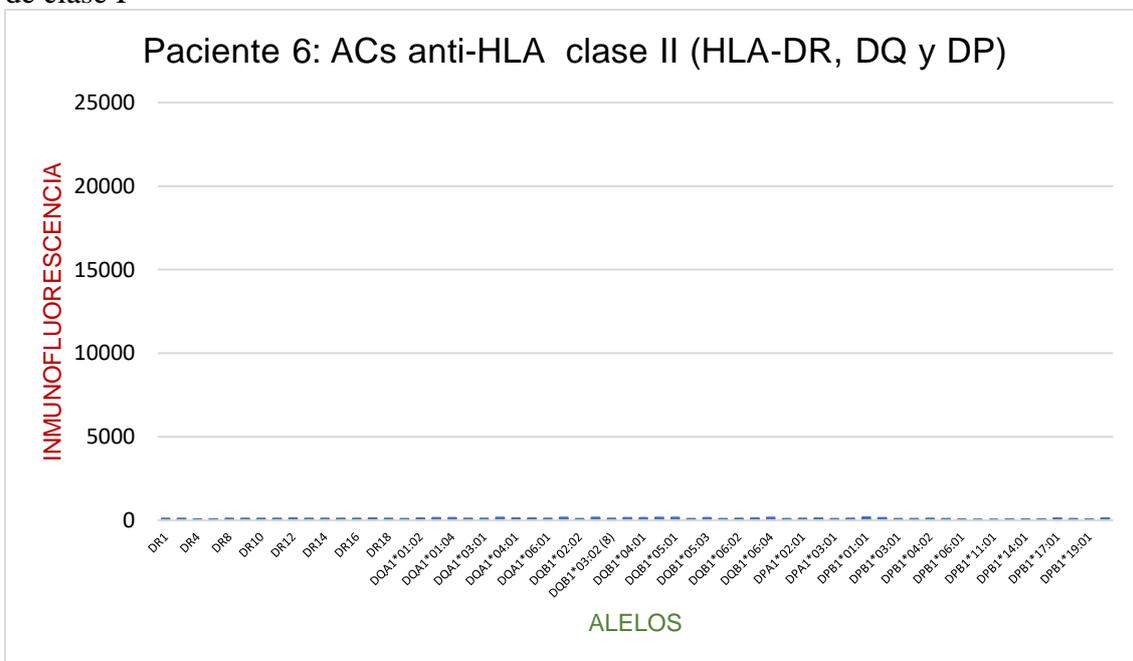


Figura 68. Análisis cuantitativo por inmunofluorescencia de los anticuerpos anti-HLA de clase II

PAC. 7	HLA A		HLA B		HLA C		HLA DR		HLA DQ		HLA DP	
RECEPTOR	A1	A1	B57	B57	C6	C6	DR7	DR13	DQ9	DQ6	DP4	DP2
DONANTE	A2	A31	B50	B51	C6	C15	DR7	DR7	DQ9	DQ2	DP4	DP4
D.S.A.	Sí	Sí	Sí	Sí		Sí				Sí		
OTROS AC	Sí (19)		Sí (32)		Sí (8)		Sí (DRB4)		Sí (1)		No	

Tabla 30. Perfiles HLA para donante y receptor, incluyendo la formación de anticuerpos clasificados por clases (tanto donante específicos como otros anticuerpos).

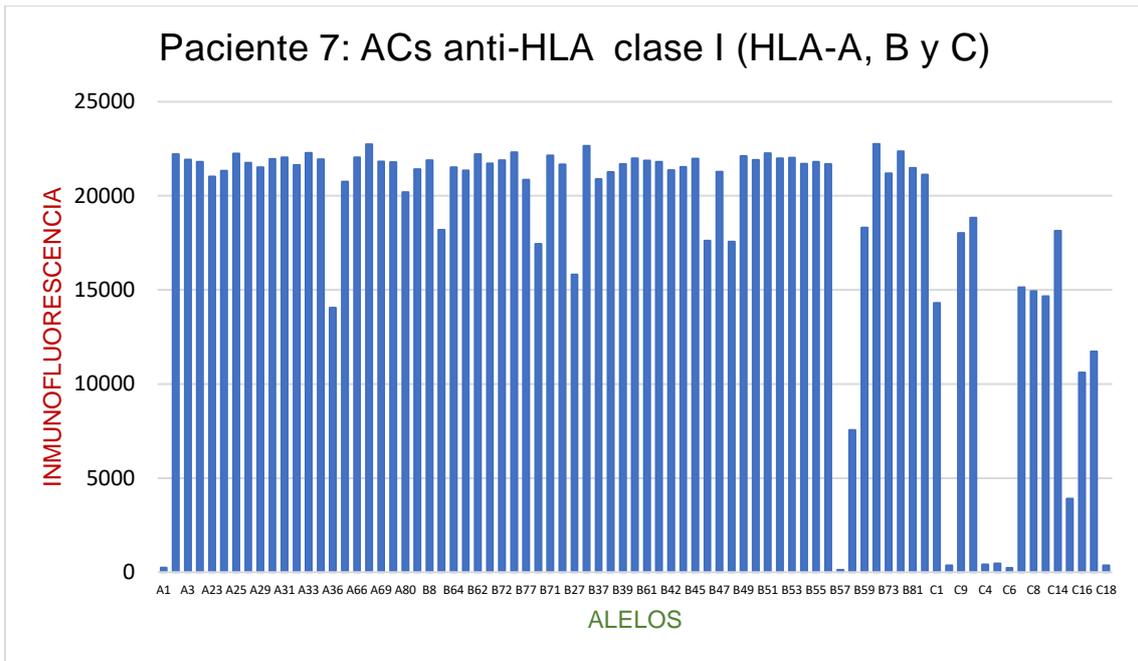


Figura 69. Análisis cuantitativo por inmunofluorescencia de los anticuerpos anti-HLA de clase I

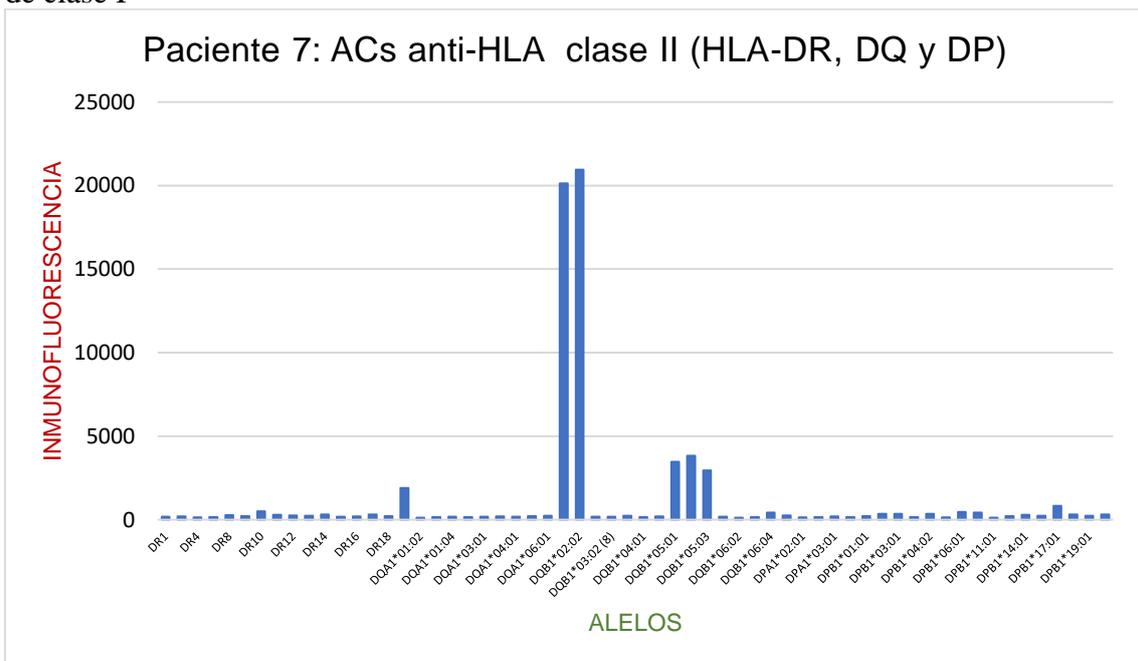


Figura 70. Análisis cuantitativo por inmunofluorescencia de los anticuerpos anti-HLA de clase II

PAC. 8	HLA A		HLA B		HLA C		HLA DR		HLA DQ		HLA DP	
RECEPTOR	A1	A33	B65	B57	C6	C8	DR4	DR15	DQ6	DQ8	DP4	DP23
DONANTE	A2	A2	B39	B50	C6	C12	DR11	DR13	DQ6	DQ7	DP4	DP2
D.S.A.	Sí	Sí	Sí	Sí		No	No	No		No	No	No
OTROS AC	Sí (5)		Sí (28)		Sí (1)		No		No		No	

Tabla 31. Perfiles HLA para donante y receptor, incluyendo la formación de anticuerpos clasificados por clases (tanto donante específicos como otros anticuerpos). Receptor: DPB04:01. Donante DPB04:02

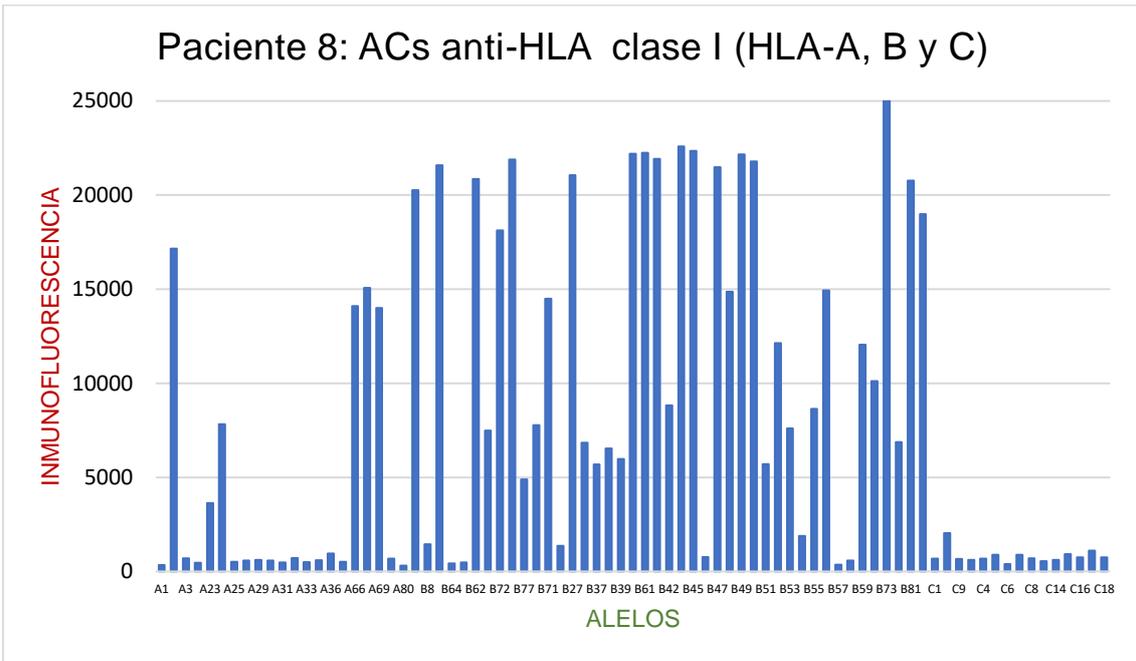


Figura 71. Análisis cuantitativo por inmunofluorescencia de los anticuerpos anti-HLA de clase I

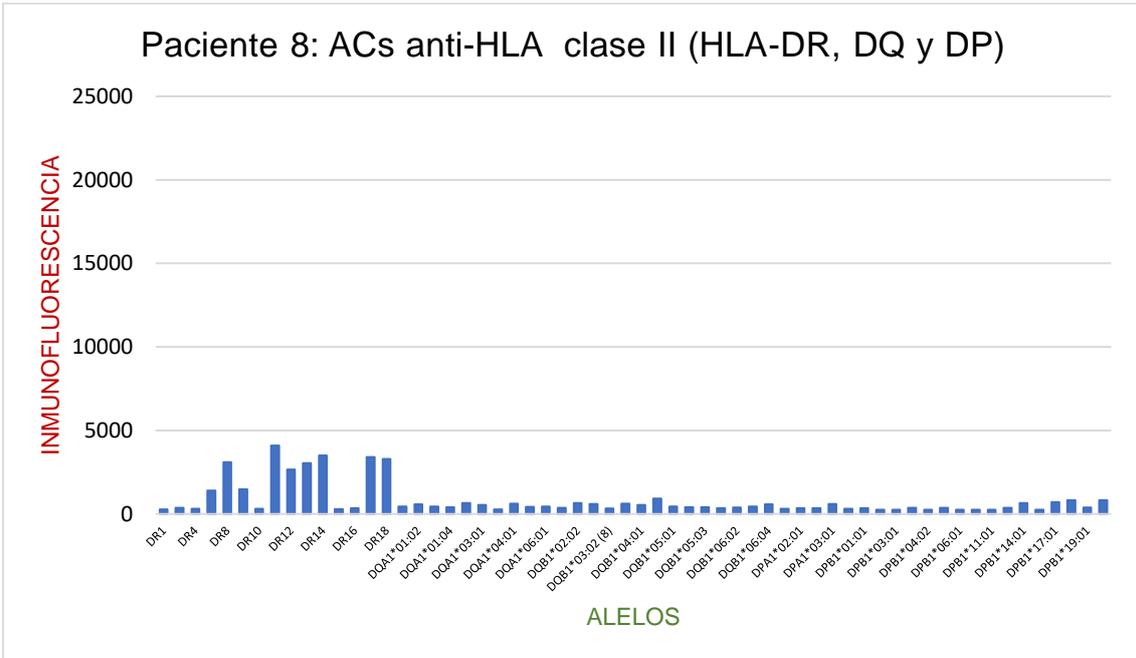


Figura 72. Análisis cuantitativo por inmunofluorescencia de los anticuerpos anti-HLA de clase II

PAC. 9	HLA A		HLA B		HLA C		HLA DR		HLA DQ		HLA DP	
	A29	A29	B60	B65	C3	C8	DR17	DR1	DQ2	DQ5	DP2	DP4
RECEPTOR	A29	A32	B44	B52	C12	C16	DR17	DR7	DQ2	DQ2	DP2	DP11
D.S.A.		Sí	Sí	Sí	No	No		Sí	Sí			Sí
OTROS AC	Sí (4)		Sí (18)		No		Sí (1)		No		Sí (13)+DPA	

Tabla 32. Perfiles HLA para donante y receptor, incluyendo la formación de anticuerpos clasificados por clases (tanto donante específicos como otros anticuerpos). Receptor: DQA01*05:01. Donante DQA01*02:01

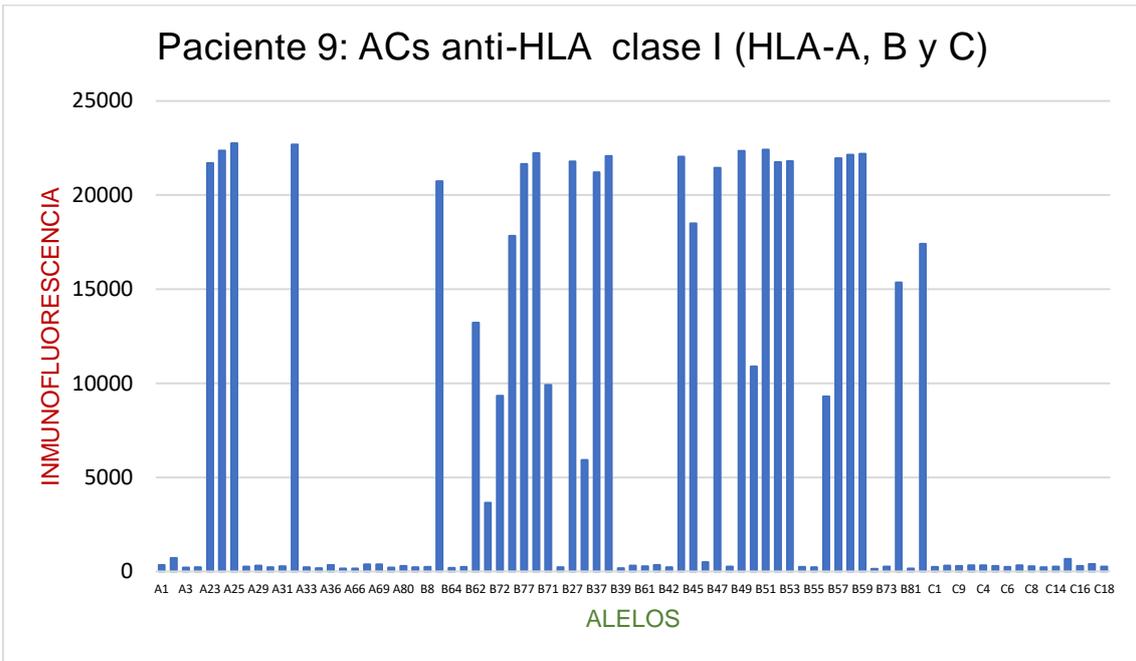


Figura 73. Análisis cuantitativo por inmunofluorescencia de los anticuerpos anti-HLA de clase I

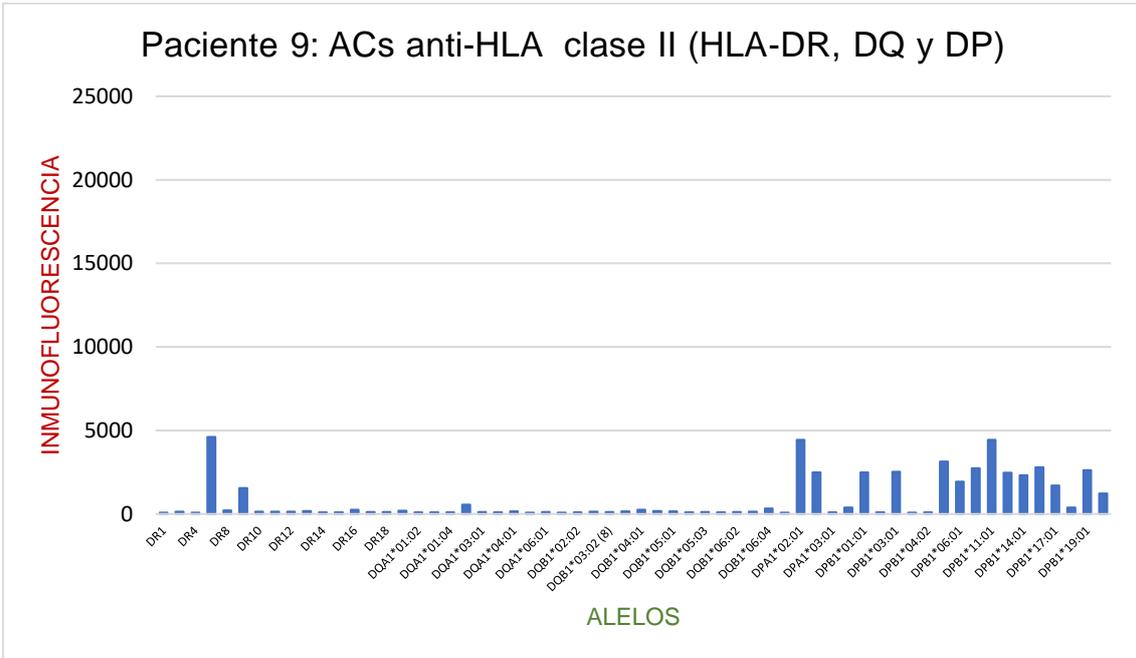


Figura 74. Análisis cuantitativo por inmunofluorescencia de los anticuerpos anti-HLA de clase II

PAC. 10	HLA A		HLA B		HLA C		HLA DR		HLA DQ		HLA DP	
	A25	A33	B65	B62	C3	C8	DR1	DR12	DQ7	DQ5	DP7	DP10
RECEPTOR	A2	A3	B35	B50	C4	C6	DR7	DR17	DQ2	DQ2	DP7	DP4
D.S.A.	Sí	Sí	No	No	No	No	No	No	No	No		No
OTROS AC	Sí (8)		Sí (9)		No		No		No		No	

Tabla 33. Perfiles HLA para donante y receptor, incluyendo la formación de anticuerpos clasificados por clases (tanto donante específicos como otros anticuerpos).

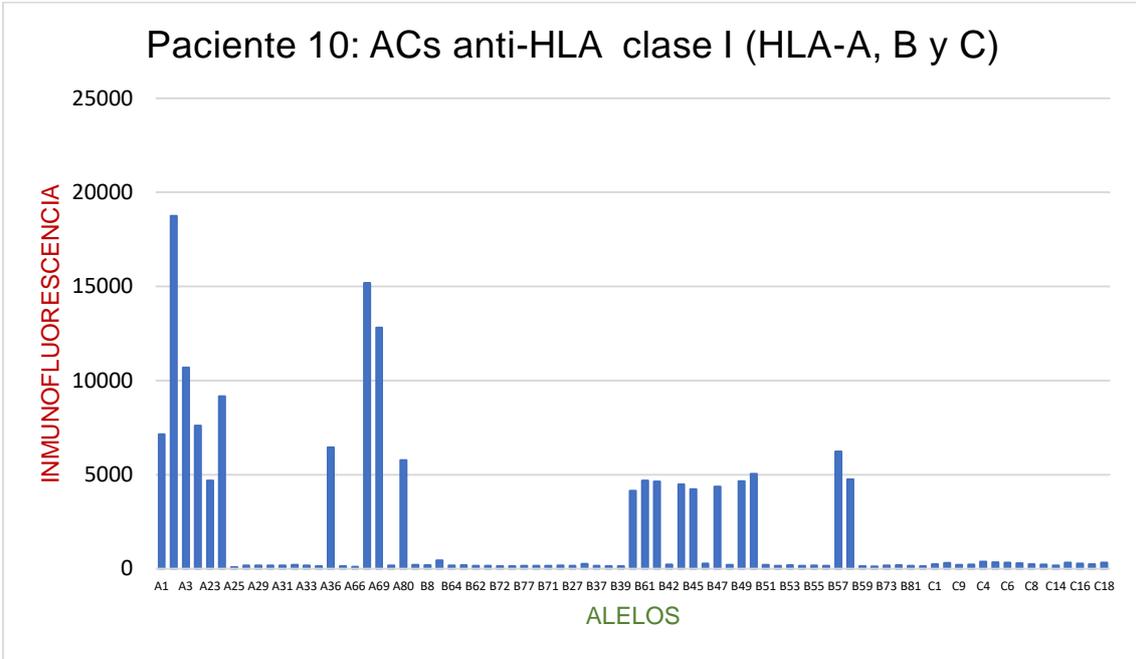


Figura 75. Análisis cuantitativo por inmunofluorescencia de los anticuerpos anti-HLA de clase I

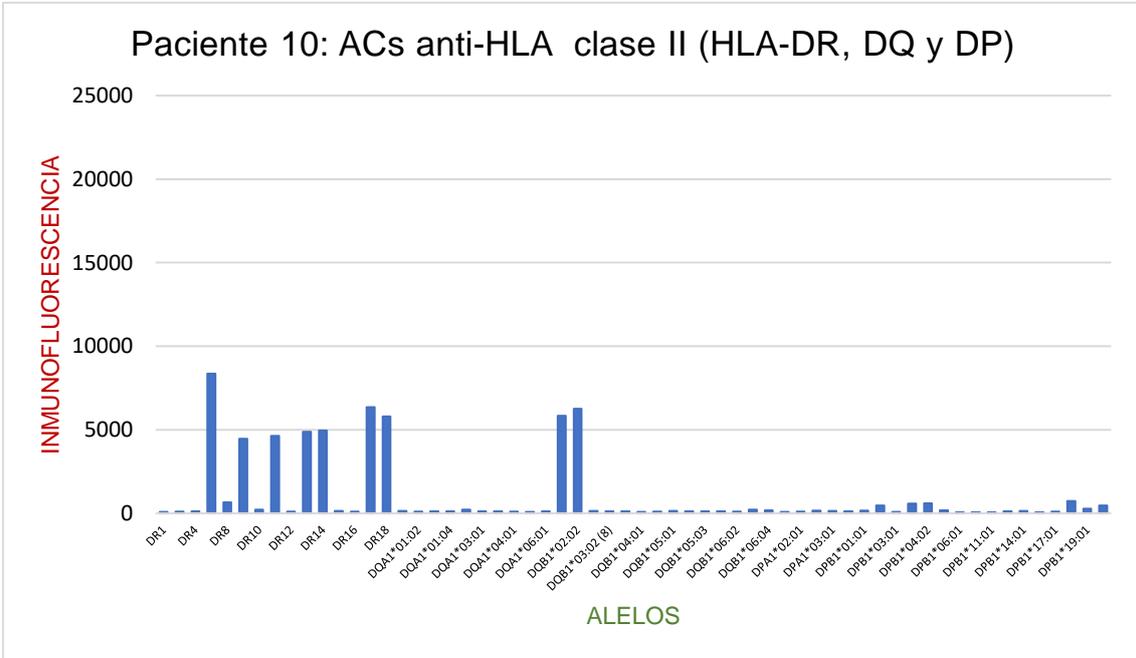


Figura 76. Análisis cuantitativo por inmunofluorescencia de los anticuerpos anti-HLA de clase II

PAC. 11	HLA A		HLA B		HLA C		HLA DR		HLA DQ		HLA DP	
RECEPTOR	A2	A2	B35	B49	C4	C7	DR11	DR4	DQ7	DQ8	DP4	DP4
DONANTE	A2	A31	B50	B51	C6	C15	DR7	DR7	DQ2	DQ9	DP4	DP4
D.S.A.		Sí	No	Sí	No	No	Sí	Sí	Sí	No		
OTROS AC	Sí (10)		Sí (5)		No		Sí (1)		No		No	

Tabla 34. Perfiles HLA para donante y receptor, incluyendo la formación de anticuerpos clasificados por clases (tanto donante específicos como otros anticuerpos).

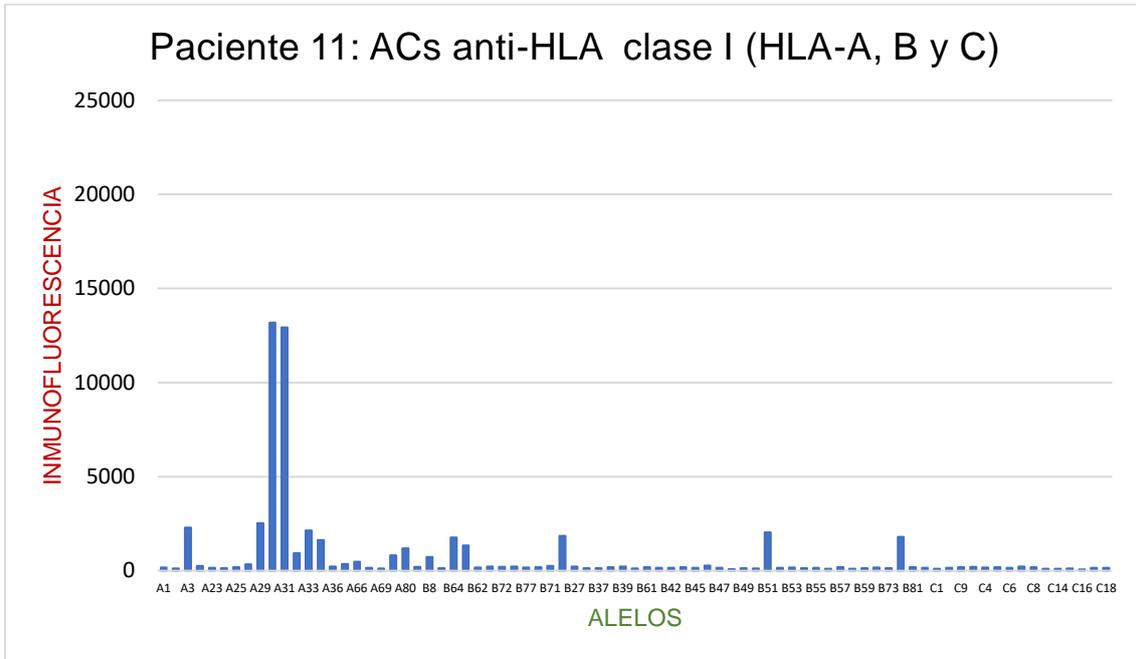


Figura 77. Análisis cuantitativo por inmunofluorescencia de los anticuerpos anti-HLA de clase I

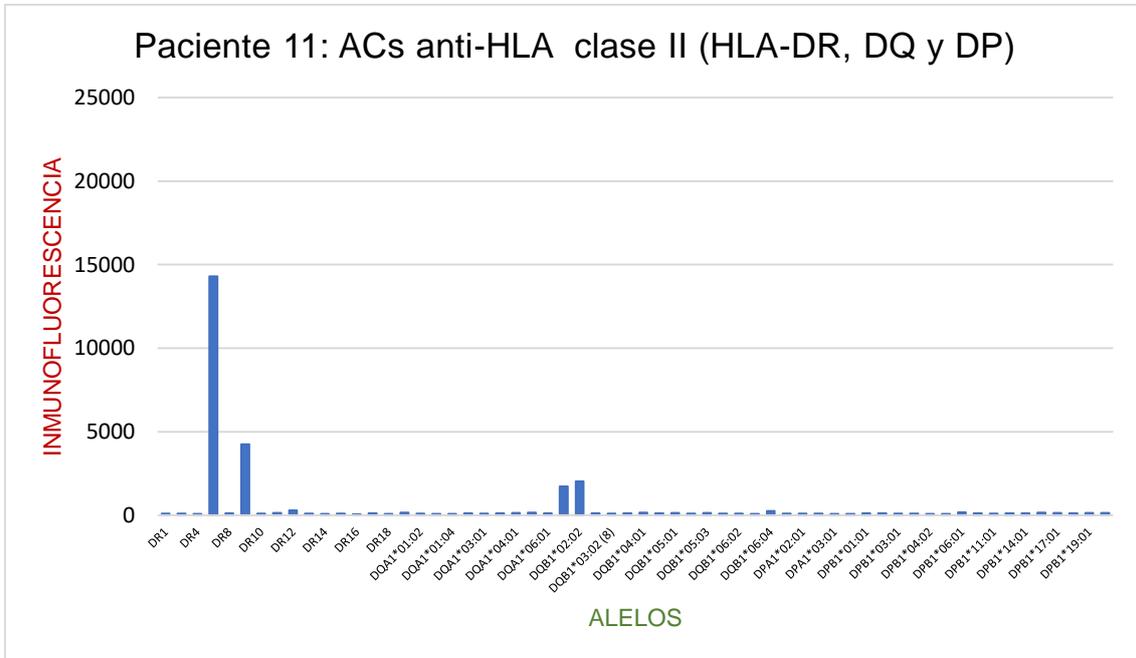


Figura 78. Análisis cuantitativo por inmunofluorescencia de los anticuerpos anti-HLA de clase II

PAC. 12	HLA A		HLA B		HLA C		HLA DR		HLA DQ		HLA DP	
RECEPTOR	A29	A68	B44	B44	C16	C16	DR4	DR7	DQ2	DQ8	DP4	DP11
DONANTE1	No se dispone de tipaje HLA de este donante											
DONANTE2	A68	A68	B39	B50	C6	C7	DR16	DR8	DQ5	DQ4	DP4	DP3
D.S.A.			Sí	Sí	No	No	Sí	Sí	No	No	Sí	Sí
OTROS AC	No		Sí (25)		No		Sí (8)		No		Sí (9)	

Tabla 35. Perfiles HLA para donante y receptor, incluyendo la formación de anticuerpos clasificados por clases (tanto donante específicos como otros anticuerpos). Receptor: DPB04:01. Donante: DPB04:02.

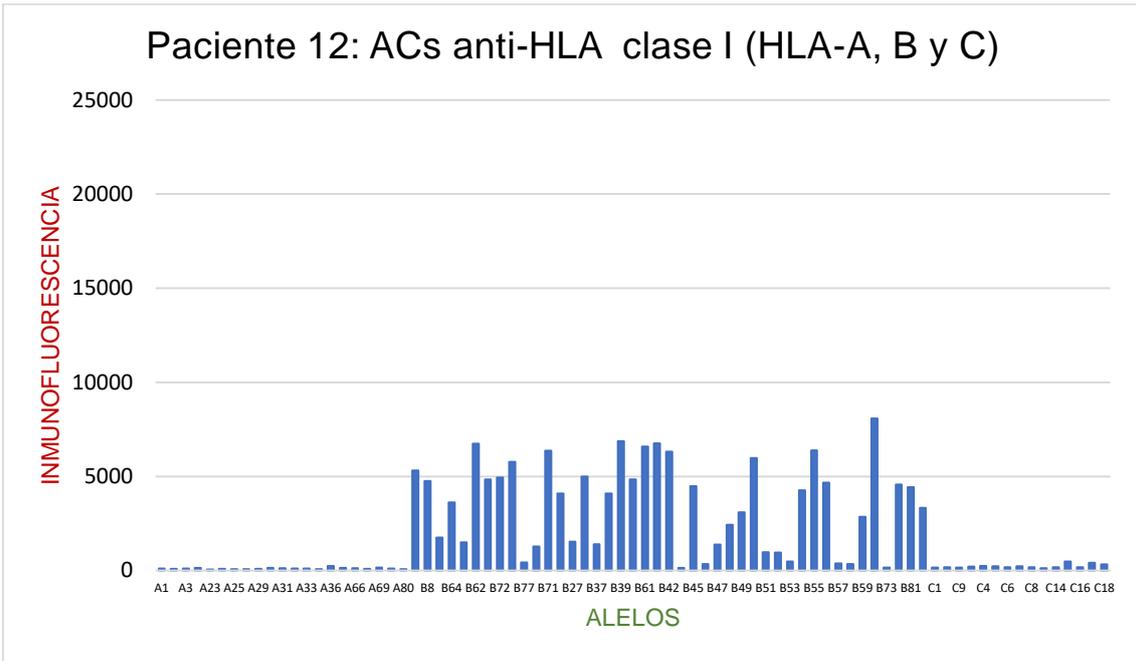


Figura 79. Análisis cuantitativo por inmunofluorescencia de los anticuerpos anti-HLA de clase I

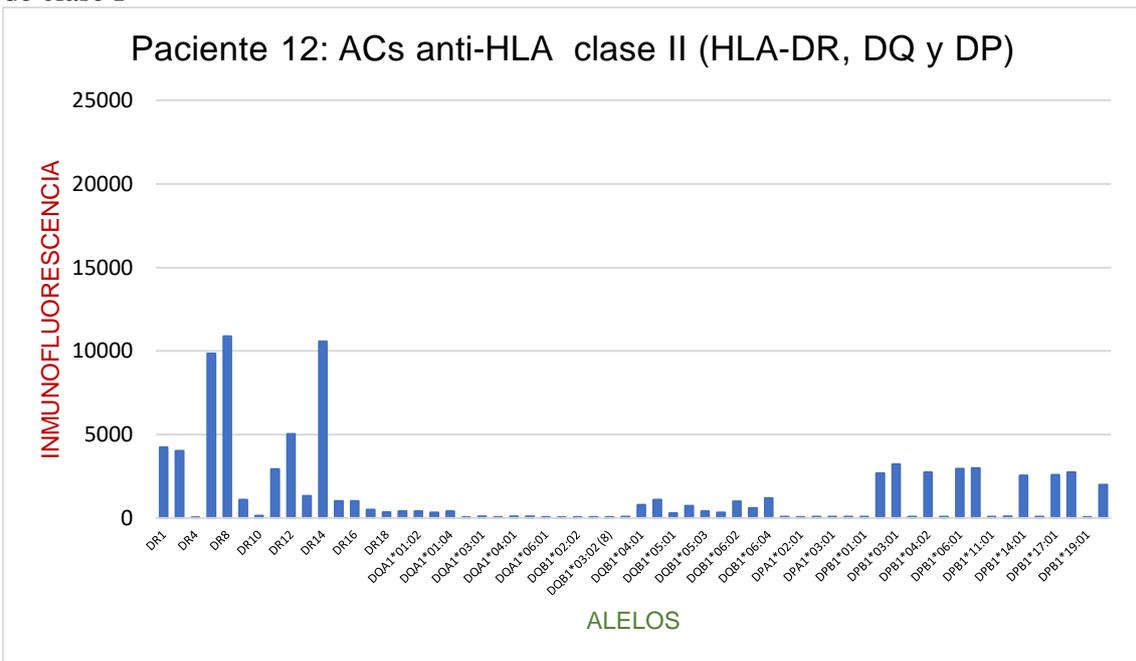


Figura 80. Análisis cuantitativo por inmunofluorescencia de los anticuerpos anti-HLA de clase II

PAC. 13	HLA A		HLA B		HLA C		HLA DR		HLA DQ		HLA DP	
	1	11	57	39	7	12	7	4	7	9	3	4
DONA. 1º	1	2	57	44	7	5	7	12	7	9	6	4
D.S.A.		Sí		Sí		No		Sí			No	
OTROS AC	Sí (4)		Sí (9)		C17		Sí (9)		No		No	
DONA. 2º	3	2	53	44	4	5	1	15	5	6	2	6
D.S.A.	Sí	Prev	Sí	Prev	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No
OTROS AC	Sí (4+14)		Sí (9+9)		Sí (7)		Sí ("todos")		Sí (DQ4)		No	

Tabla 36. Perfiles HLA para donante y receptor. El donante 2 comparte alelos con el donante previo en clase I para los que ya se generaron anticuerpos. También tenía anticuerpos previos contra estos DR aunque no se compartan con el donante 1.

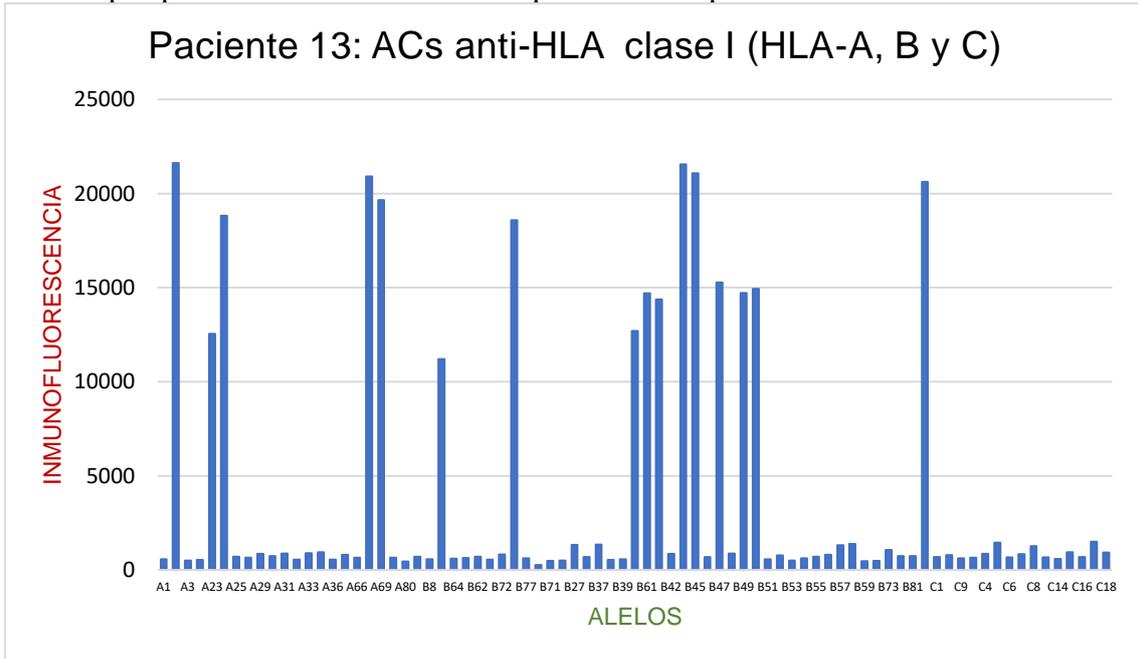


Figura 81. Análisis cuantitativo por inmunofluorescencia de los anticuerpos anti-HLA de clase I

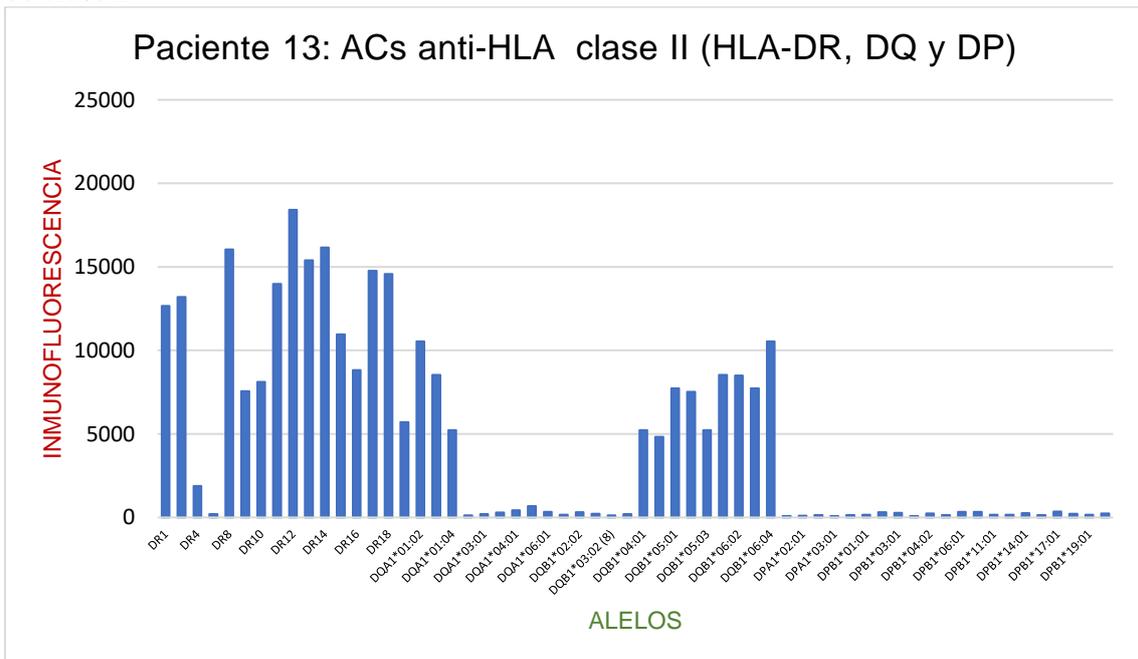


Figura 82. Análisis cuantitativo por inmunofluorescencia de los anticuerpos anti-HLA de clase II

PAC. 14	HLA A		HLA B		HLA C		HLA DR		HLA DQ		HLA DP	
	2	2	44	51	5	15	11	13	5	7	4	13
DONANTE1	1	29	44	8	7	16	1	4	5	8	4	4
DONANTE2	32	29	44	44	5	16	7	12	2	7	4	11
D.S.A.	A32	A29		B8	C7	C16	DR1,4,7,12	DQ2	No	No	No	Sí
OTROS AC	Sí (18)		Sí (18)		Sí (5)		Sí (4)		No		Sí (DP15)	

Tabla 37. Perfiles HLA para donante y receptor, incluyendo la formación de anticuerpos clasificados por clases (tanto donante específicos como otros anticuerpos). Receptor: DPB04:01. Donante 1: DPB04:01. Donante 2: DPB04:02. Los injertos se implantaron muy próximos entre sí y no hay muestras de suero intermedias.

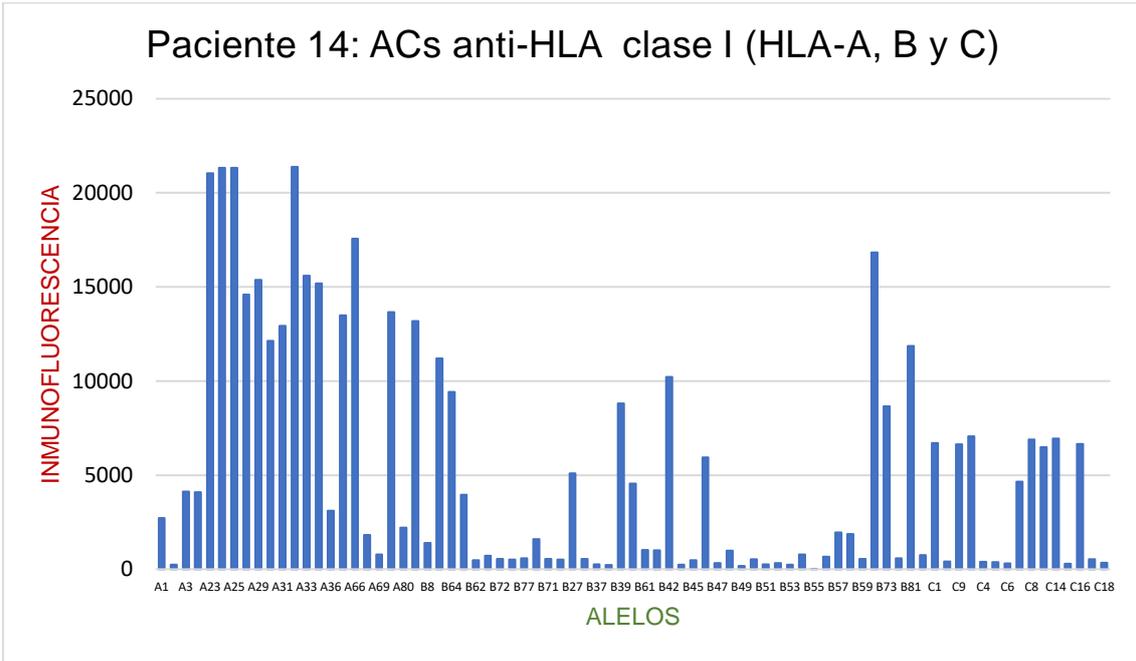


Figura 83. Análisis cuantitativo por inmunofluorescencia de los anticuerpos anti-HLA de clase I

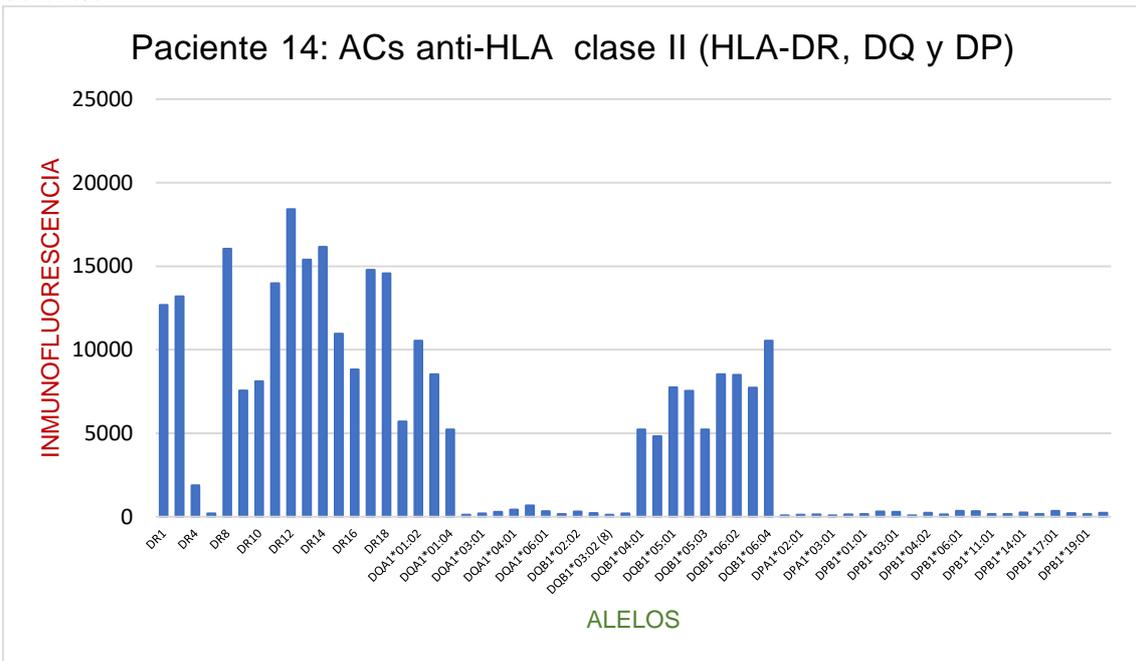


Figura 84. Análisis cuantitativo por inmunofluorescencia de los anticuerpos anti-HLA de clase II

Si desglosamos los datos de anticuerpos teniendo en cuenta el factor tiempo, todos los pacientes analizados habían generado DSA al mes del trasplante vascular. Sin embargo, no se detectó un incremento de IgG específicos en la analítica de control a la semana del procedimiento. Subsecuentes análisis seriados cada tres meses mostraron escasa variación en los perfiles inmunológicos obtenidos a los 30 días de seguimiento, aunque sí se objetivó un aumento del título de anticuerpos.

En la figura 85 se representa gráficamente el progresivo incremento de anticuerpos en los sucesivos controles, en este caso IgG anti-HLA de clase I del paciente número 13 presentado en las páginas previas. Únicamente se muestran aquellos anticuerpos que registraron un aumento objetivable por inmunofluorescencia. No se incluye el Control 1, a la semana del trasplante vascular, ya que ningún paciente registró cambios hasta el siguiente control, al mes del implante. La razón de elegir este paciente en particular es la degeneración posterior de la arteria criopreservada, que presentó un aneurisma de rápida evolución a los 7 meses (corresponde a la Degeneración Prospectiva A en el análisis de degeneraciones, a la Degeneración Criopreservada 5 del análisis histopatológico y al paciente número 13 en el estudio de anticuerpos). Posteriormente al último control se llevó a cabo el recambio del bypass.

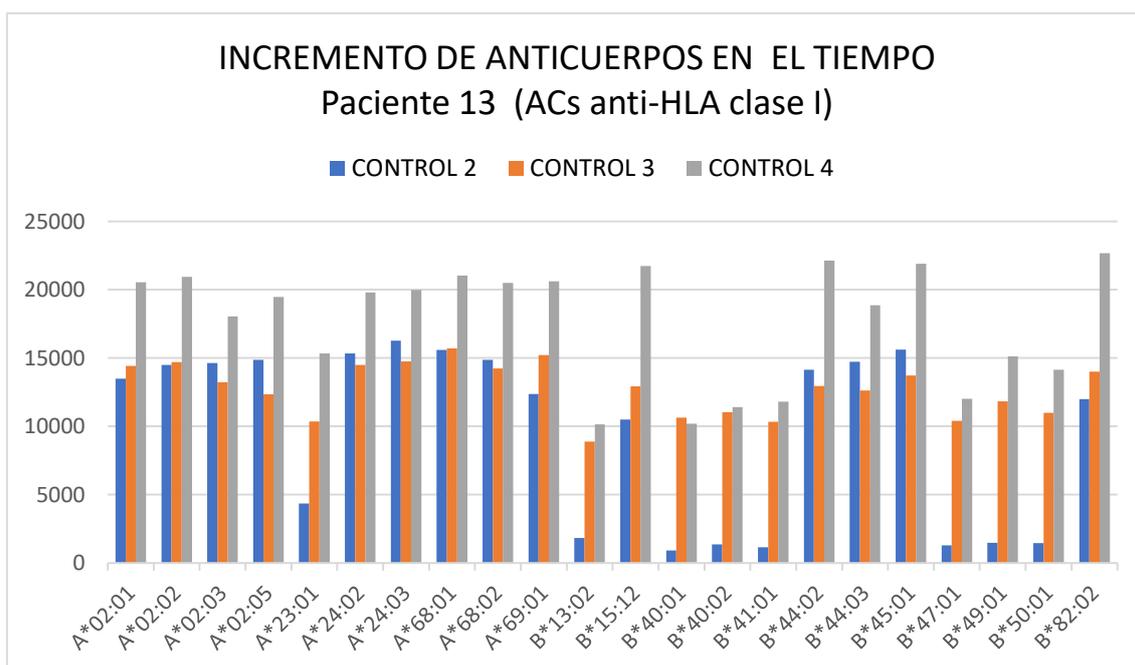


Figura 85. Evolución de los anticuerpos anti-HLA de clase I en el paciente número 13 a partir del mes post implante (controles 2, 3 y 4).

La capacidad del kit de inmunoensayo para detectar la presencia de anticuerpos mediante inmunofluorescencia, descrito en el capítulo de Material y métodos, alcanza su máximo nivel con valores en torno a 22000. A partir de esas cifras, un aumento en el número de anticuerpos IgG reactivos al panel, y por tanto de la luminiscencia generada, no se va a traducir en incrementos en los resultados detectados por el equipo. Como puede verse en la gráfica, la

gran mayoría de los anticuerpos alcanzan tales valores en el tercer control, a los 3 meses.

Si nos centramos en el grupo de anticuerpos específicos frente a antígenos HLA del donante en ese mismo paciente 13, se objetiva un incremento a partir del mes del implante en las IgG frente a antígenos no coincidentes entre donante y receptor. A pesar de la falta de dicha compatibilidad, no se formaron DSA frente al antígeno C*05:02 (figura 86 y tabla 38)

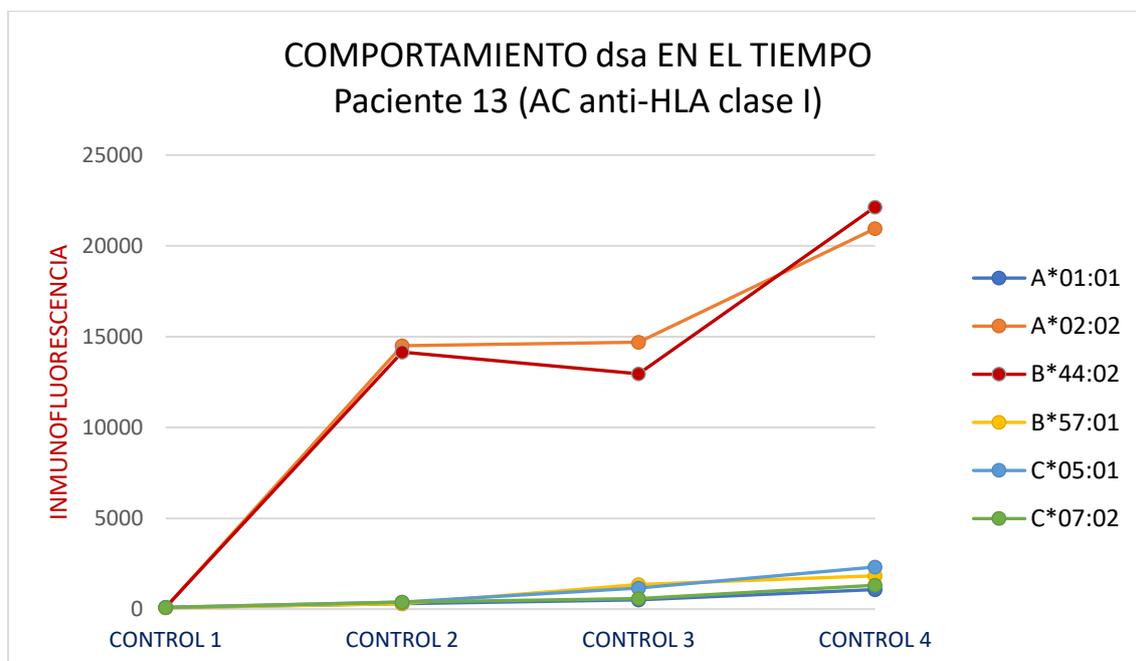


Figura 86. Evolución de los anticuerpos específicos frente a antígenos HLA de clase I del donante en el paciente número 13 (controles 1, 2, 3 y 4 postimplante).

PAC. 13	HLA A		HLA B		HLA C	
RECEPTOR	1	11	57	39	7	12
DONA. 1°	1	2	57	44	7	5
D.S.A.		Sí		Sí		No

Tabla 38. Perfil antigénico para HLA de clase I del paciente número 13 y del donante de su primera arteria criopreservada. El código de colores se corresponde con el empleado en la figura 86. Modificada de la tabla 36.

Aunque los anticuerpos anti-HLA fueron producidos principalmente frente a antígenos HLA no coincidentes del donante, dada la existencia de epítomos compartidos entre alelos también se detectaron anticuerpos frente a otras especificidades en la mayoría de los pacientes de la muestra.

Por su parte, la prueba cruzada por citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) mostró evidencia de la presencia de anticuerpos fijadores de complemento en el suero de todos los pacientes analizados y, por tanto, capaces de activar la cascada del complemento cuando se unen al antígeno correspondiente y provocar la lisis en al menos el 20% de los linfocitos expuestos, obtenidos de sangre periférica de seis donantes aleatorios de

precursores hematopoyéticos. Esto se confirmó no solo en los anticuerpos producidos frente a HLA del donante, sino también frente a células que expresan otros alelos, pero que comparten epítomos con ellas. La tabla 39 muestra el perfil HLA de los seis donantes empleados para comprobar la capacidad fijadora del complemento.

	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DR	HLA-DQ	HLA-DP
1	26,33	65,35	4,8	4,11	7,5	3,-
2	2,-	13,51	2,6	1,4	1,7	3,5
3	3,68	61,53	2,4	1,15	1,-	5,6
4	2,33	18,44	5,7	1,17	1,5	2,5
5	33,8	44,-	2,5	1,15	1,-	5,6
6	2,68	70,53	2,4	1,7	1,-	3,5

Tabla 39. Tipaje HLA para el test de citotoxicidad cruzada. Perfiles antigénicos de los 6 donantes de médula ósea cuya sangre periférica fue empleada en la prueba. Los números separados por comas representan fenotipos HLA para cada subclase. Los guiones corresponden a antígenos homocigotos.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO INMUNOLÓGICO

El estudio de las arterias criopreservadas implantadas resulta de gran interés al tratarse de verdaderos trasplantes en los que no se ha interferido con la respuesta inmune del receptor, al no encontrarse alterada por la acción de fármacos inmunosupresores. Esto nos permite observar la formación de anticuerpos en el tiempo y su acción sobre el aloinjerto de una forma que nos sería imposible en trasplantes de órgano sólido, por razones obvias.

La baja frecuencia de compatibilidad aleatoria entre donantes y receptores ya se había visto en el estudio de Konrad y colaboradores ⁹⁰. Esto implica que la posibilidad de que un aloinjerto vascular sea histocompatible con nuestro paciente es muy reducida si no se realizan estudios previos al implante. Como ya hemos comentado en el capítulo introductorio, tratar de conseguir histocompatibilidad HLA en este tipo de trasplantes no es una estrategia viable en la mayoría de los casos, por un lado debido a las limitaciones de stock, y por otro a la frecuente necesidad de disponer de una arteria criopreservada en situaciones de urgencia. Las características clínicas de nuestros pacientes y la eventual indicación de revascularización sobre segmentos comprometidos por procesos infecciosos dificultan, a su vez, el uso sistemático de fármacos inmunosupresores. En conclusión, la posibilidad de evitar o anular la reacción inmunológica generada por los trasplantes vasculares es muy limitada salvo en casos específicos, y nuestros esfuerzos deberían centrarse en protocolizar un seguimiento de estos pacientes que permita diagnosticar y tratar de la forma más eficiente posible el 5-8% de casos que van a evolucionar hacia una degeneración aneurismática del aloinjerto.

Por otro lado, 13 de los 14 pacientes fueron considerados hipersensibilizados, mostrando un "Panel Reactive Antibody" (PRA) superior al 94%. El PRA permite detectar la presencia de anticuerpos frente a antígenos HLA, estableciendo el porcentaje de células del test frente a las que el suero del paciente es capaz de reaccionar. De forma general, representa el porcentaje de la población ante la que el paciente es incompatible en virtud de dichos anticuerpos. Así, un PRA de 95% significa que el paciente posee anticuerpos frente a antígenos HLA del 95% de la población. Cuando nuevos aloinjertos fueron implantados, el valor PRA aumentó en consecuencia, incrementando el grado de sensibilización de los pacientes. Estos resultados muestran la dificultad para obtener arterias criopreservadas histocompatibles, más aún si tenemos en cuenta las habituales limitaciones de stock. Además, dados los valores PRA registrados tras el primer aloinjerto implantado, sería extremadamente improbable que no hubiera anticuerpos capaces de reconocer alelos de un segundo trasplante vascular.

Paradójicamente, si bien de escasa significación clínica al no estar el PRA relacionado con el grado de rechazo, los pacientes que registraron degeneración de su arteria criopreservada a lo largo del periodo de seguimiento del estudio (número 6 y 12), presentaban los valores de PRA más reducidos de la serie (tabla 40).

PAC	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13A	13B	14
PRA	99	99,3	99,6	95,4	95,5	76,7	99,9	99,1	99,9	99,9	99,4	94,3	98,2	98,8	99,4

Tabla 40. Panel Reactive Antibody registrado para cada paciente analizado. PAC: paciente. PRA: Panel Reactive Antibody, expresado en porcentaje. El paciente 13 recibió dos aloinjertos vasculares separados más de una semana en el tiempo, mostrándose los PRA

correspondientes. Los pacientes que presentaron degeneración aneurismática del injerto aparecen marcados en rojo.

Estos resultados muestran el problema de la sensibilización post trasplante vascular en pacientes con enfermedad renal crónica. Tanto si se debe a una revascularización de miembros inferiores, como si el aloinjerto es empleado como asa en accesos para hemodiálisis, el implante de una arteria criopreservada reduce en gran medida las posibilidades de encontrar un donante válido para un futuro trasplante de riñón. Esta problemática ya había sido descrita en la literatura a partir de casos aislados^{202,203} y una serie de 21 pacientes en un estudio multicéntrico de Benedetto y colaboradores²⁰⁴. Nuestra propia experiencia con casos similares confirma el problema de la hipersensibilización, habiendo registrado en el pasado un paciente revascularizado mediante arteria criopreservada que posteriormente no pudo trasplantarse cuando evolucionó hacia una enfermedad renal crónica terminal. Los valores de PRA postrasplante registrados en nuestro estudio confirman que un único aloinjerto vascular presenta una alta probabilidad de inducir hipersensibilización en el receptor y, por tanto, condenarlo a varias sesiones semanales de hemodiálisis de por vida, al dificultar que se pueda encontrar un donante frente a cuyo HLA no haya anticuerpos.

En estos pacientes se recomendaría evitar el aloinjerto vascular o, si esto no fuera posible, tratar de obtener el mayor grado posible de compatibilidad HLA. No se puede descartar el uso de inmunosupresores, si bien la literatura médica no ha mostrado que su empleo obtenga resultados consistentes a la hora de prevenir la aloinmunización^{88,202}.

Además, siendo de gran interés para nuestro estudio, nuestro estudio mostró que todos los pacientes estudiados generaron una respuesta inmune consistente en la formación de cantidades significativas de anticuerpos IgG frente a antígenos HLA específicos del donante en ausencia de concordancia entre los alelos del donante y el receptor. Si tomamos como ejemplo el paciente 1 ya mostrado en las gráficas previas, se observa un marcado incremento de dichos anticuerpos, que alcanza los límites superiores de medición del sistema Luminex® precisamente frente a alelos del donante (figura 87).

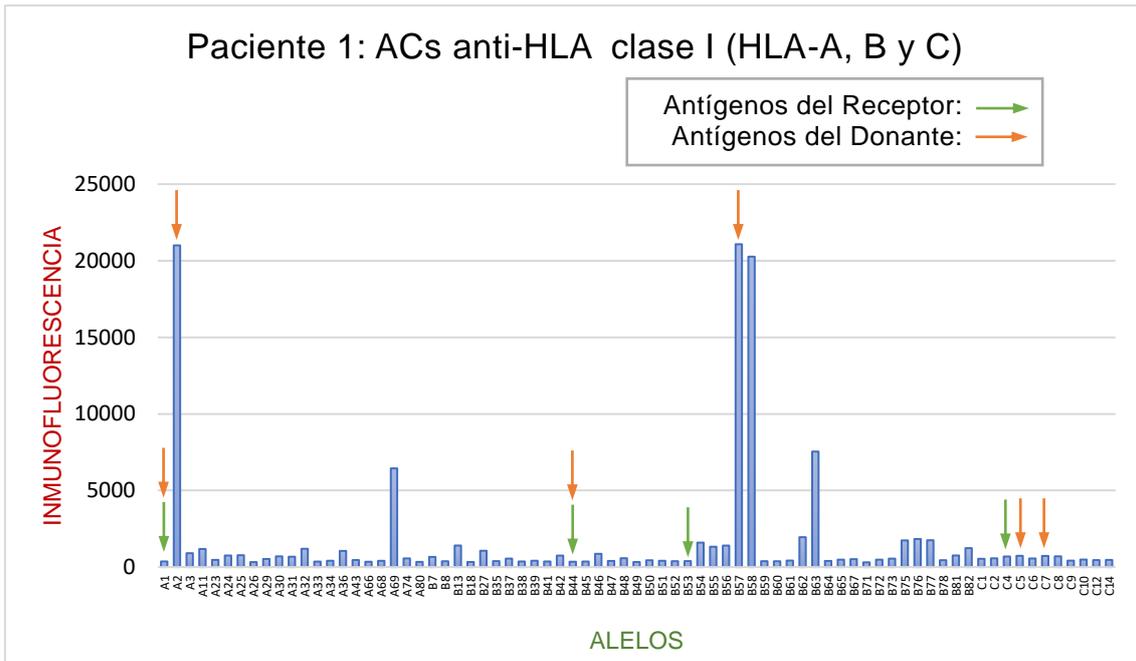


Figura 87. Representación cuantitativa mediante IMF de los anticuerpos generados frente a HLA de clase I en el paciente 1. Las flechas verdes representan los alelos correspondientes al perfil antigénico del receptor, mientras que las flechas naranjas corresponden a los alelos del donante. Modificada de la figura 57.

Cuando se produce coincidencia antigénica entre donante y receptor (lo que viene representado en la figura anterior por ambas flechas, verde y naranja, señalando un mismo alelo), el paciente no genera una respuesta inmunológica, y por tanto no se objetiva incremento de IgG. La figura 88 muestra idéntica gráfica para el mismo paciente, si bien en esta ocasión para los anticuerpos generados frente a antígenos HLA de clase II. Nuevamente, la falta de concordancia entre antígenos del donante y el receptor es el origen de los incrementos más significativos de anticuerpos.

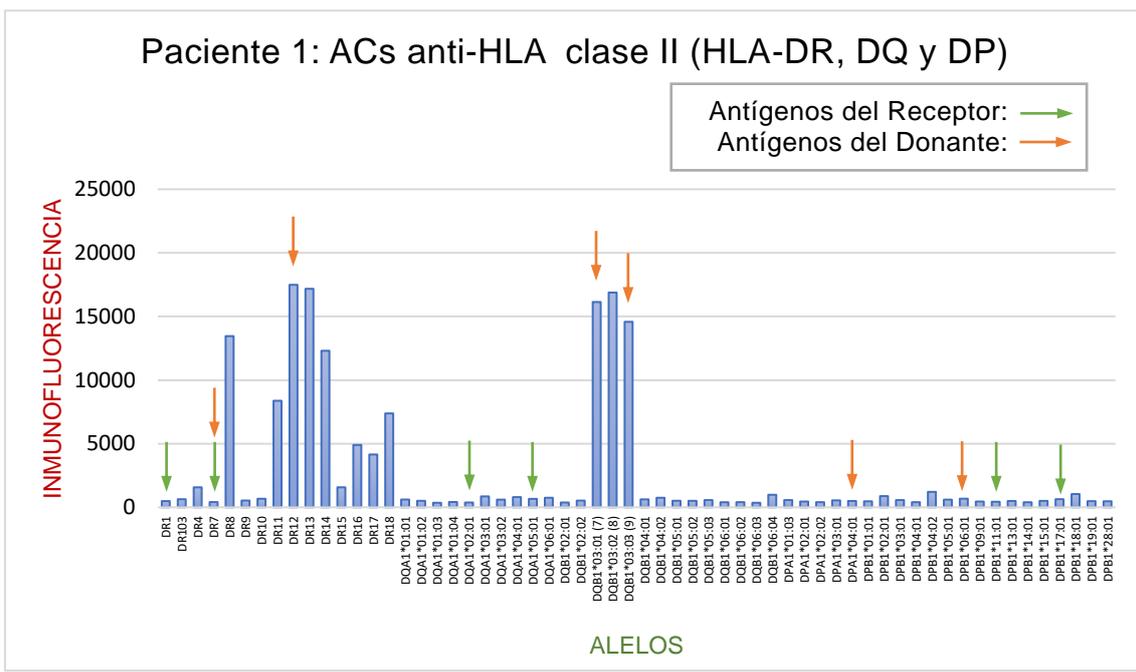


Figura 88. Representación cuantitativa mediante IMF de los anticuerpos generados frente a HLA de clase II en el paciente 1. Las flechas verdes representan los alelos correspondientes al perfil antigénico del receptor, mientras que las flechas naranjas corresponden a los alelos del donante. Modificada de la figura 58.

Si observamos detenidamente las dos figuras previas, dos son las cuestiones que requieren una explicación más detallada. Por un lado, existen incrementos significativos de anticuerpos frente a alelos que no están presentes en el HLA del donante (HLA B58, DR13, DQ8...). Por otro, hay antígenos HLA que sí se encuentran en el donante, pero frente a los que no se ha detectado la formación significativa de IgG (HLA C5, C7...).

Para contestar a la primera cuestión es necesario entender que se trata de un proceso normal que se observa, generalmente, en todos los casos de aloinjunción. La razón consiste en la existencia de epítomos o determinantes antigénicos compartidos entre alelos, como ya hemos mencionado previamente, lo que induce a la formación de anticuerpos frente a aquellos alelos que muestran el mismo epítomo, incluso si inicialmente no se encuentran presentes en el perfil antigénico del donante.

En la figura 89 se muestran un cuadro con los distintos antígenos HLA-A y algunos de sus epítomos. Como puede verse, en muchos casos las regiones de reconocimiento son compartidas, lo que dará lugar a la formación de anticuerpos capaces de reconocer distintos antígenos a partir de un mismo epítomo. En la gráfica se muestran en verde los antígenos que comparten el determinante antigénico 107W y que, por tanto, presentan esa misma región de reconocimiento. Existen regiones compartidas por multitud de antígenos, mientras que otras son exclusivas de uno, o unos pocos. En naranja se destaca el determinante antigénico 102HV, únicamente presente en el HLA A*29:01.

Antigen	127	128	129	13	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	14	140
A*01:01	102DV							109F	109FE				138MI			
A*02:01	102DV					105S	107W	109F	109FE	127K						
A*02:02	102DV					105S	107W	109F	109FE	127K						
A*02:03	102DV					105S	107W	109F	109FE	127K						
A*02:05	102DV					105S	107W	109F	109FE	127K						
A*03:01	102DV					105S		109F					138MI			
A*11:01	102DV							109F	109FE				138MI			
A*11:02	102DV							109F	109FE				138MI			
A*23:01	102DV					105S		109F	109FE	127K			138MI	142ITQ		
A*24:02	102DV					105S		109F	109FE	127K			138MI			
A*24:03	102DV					105S		109F	109FE	127K			138MI			
A*25:01	102DV							109F	109FE				138MI	142ITQ		
A*26:01	102DV							109F	109FE				138MI	142ITQ		
A*29:01	102DV	102HV				105S		109F	109FE				138MI	142ITQ		
A*29:02	102DV					105S		109F	109FE				138MI	142ITQ		
A*30:01	102DV					105S		109F	109FE				138MI	142ITQ		
A*31:01	102DV					105S		109F	109FE				138MI	142ITQ		
A*32:01	102DV												138MI	142ITQ		
A*33:01	102DV					105S		109F	109FE				138MI	142ITQ		
A*33:03	102DV					105S		109F	109FE				138MI	142ITQ		
A*34:02	102DV					105S		109F	109FE				138MI	142ITQ		
A*36:01	102DV							109F	109FE				138MI			
A*43:01	102DV							109F	109FE				138MI	142ITQ		
A*66:01	102DV							109F	109FE				138MI	142ITQ		
A*66:02	102DV							109F	109FE				138MI	142ITQ		
A*68:01	102DV					105S		109F	109FE	127K						
A*68:02	102DV							109F	109FE	127K						
A*69:01	102DV					105S	107W	109F	109FE	127K						
A*74:01	102DV												138MI	142ITQ		
A*80:01	102DV					105S		109F	109FE				138MI			

Figura 89. Epítomos: regiones de reconocimiento para antígenos HLA-A. En verde, el epítomo 107W, compartido por los antígenos HLA A*02:01, 02:02, 02:03, 02:05 y 69:01. En naranja, el epítomo 102HV, presente solamente en HLA A*29:01

En cuanto a la segunda cuestión, referida a la ausencia de anticuerpos frente a algunos antígenos a pesar de no presentar concordancia HLA entre donante y receptor, la explicación sigue un camino similar. La existencia de epítomos compartidos frente a distintos alelos provoca que antígenos del donante no presentes en el tipaje HLA del receptor sean reconocidos como propios precisamente por esa coincidencia entre determinantes antigénicos. El resultado es la ausencia de respuesta inmune frente a los mismos, no generándose IgG específicos detectables por inmunofluorescencia. Ambos mecanismos son habituales en la reacción inmunológica frente a los trasplantes, y pueden comprobarse en todos los pacientes de nuestra muestra.

Si comparamos los anticuerpos formados a lo largo de los distintos controles, nuestra investigación confirma la producción de anticuerpos anti-HLA en todos los casos un mes tras el implante, siempre y cuando no haya tenido lugar una trombosis temprana del bypass. Más aún, hemos comprobado la presencia de DSA en todos los pacientes analizados transcurrido ese mes, pero sin poder detectar IgG frente a antígenos HLA de donante de la arteria criopreservada explantada y sustituida a los pocos días del trasplante. Los datos parecen indicar que el sistema inmune requiere más de una semana de exposición para ser capaz de activar anticuerpos donante específicos frente al aloinjerto vascular. Este hallazgo también fue observado por Balzer y su equipo ⁸⁹ en un paciente con dos aloinjertos venosos en fresco implantados de forma consecutiva y que se trombosaron a los 3 y 4 días de la cirugía, respectivamente, requiriendo finalmente la amputación de la extremidad. En este caso, tampoco se observó la formación de anticuerpos específicos frente a antígenos de donante no compartidos con el receptor.

Los resultados obtenidos apoyan la idea de que una reacción aloinmune tiene lugar en todas las arterias implantadas a pesar del proceso de criopreservación, aunque no pueden verificar si está reacción se ve disminuida de alguna manera por el mismo. Entonces, ¿cómo influye el sistema inmune en la formación de los aneurismas vistos en los trasplantes vasculares criopreservados?

Si nos centramos en los resultados inmunológicos de los pacientes 6 y 12, que registraron degeneración aneurismática durante el periodo de seguimiento, y los comparamos con la respuesta generada en otros pacientes del estudio, llama la atención que no se objetivan hallazgos significativos que los diferencien del resto de la muestra, tanto por el número de antígenos frente a los que se generaron anticuerpos como por la cantidad de anticuerpos generada, medida mediante IMF. La cuantificación de IgG específicos frente al donante no reflejó valores de IMF particularmente más elevados en ambos pacientes. Además, el paciente 6 no registró la formación de anticuerpos frente a HLA de clase II. Más aún, valores de IMF especialmente elevados en otros pacientes, como en el número 7, no estaban relacionados necesariamente con la formación de aneurismas en los correspondientes aloinjertos durante el seguimiento. Estos resultados no son fáciles de interpretar y podrían estar relacionados con la diferente inmunogenicidad entre distintos antígenos o la

influencia de factores no inmunológicos como coadyuvante último del fracaso de estos trasplantes.

Resulta interesante mencionar que arterias criopreservadas del mismo donante fueron implantadas en dos receptores distintos, identificados como pacientes 5 y 6 en el estudio inmunológico, desarrollándose una degeneración aneurismática solamente en el segundo. Estos datos irían en contra de un problema durante la criogenización como causa única del fracaso del injerto, ya que ambas arterias fueron procesados de forma conjunta en el banco de tejidos de nuestro centro.

Creemos que nuestro estudio constituye la primera ocasión en que se ha estudiado la especificidad de los anticuerpos generados tras el trasplante de arterias criopreservadas en relación con la degeneración aneurismática de las mismas. Esto resulta de gran importancia para valorar el rechazo crónico de estos injertos, más aún en un contexto científico en el que la literatura médica apenas refleja datos sobre la formación de DSA en arterias criopreservadas. En nuestro caso no solo se ha determinado la presencia de DSA generados después del implante, sino que, además, se ha cuantificado su producción y las características de la misma en los meses sucesivos al implante.

La prueba cruzada por CDC mostró evidencia de la presencia de anticuerpos fijadores de complemento en el suero de todos los pacientes, demostrando la capacidad de los anticuerpos específicos generados para activar el complemento cuando se unen a sus respectivos antígenos. Dicha fijación facilitaría la lisis celular cuando están presentes en títulos suficientes y sería, por tanto, partícipe del proceso de rechazo de estos injertos. En órganos sólidos, anticuerpos preformados participan en este rechazo uniéndose a las moléculas HLA expresadas en el endotelio de los tejidos trasplantados, provocando la activación de la cascada del complemento con el resultado de trombosis e infarto del injerto, muchas veces al poco tiempo del trasplante ⁸⁴. Este mecanismo implica la activación plaquetaria, la proliferación patológica de células endoteliales y musculares lisas y el daño parenquimatoso mediado por el infiltrado humoral y/o celular tras el daño endotelial.

Sin embargo, el mecanismo de rechazo en los trasplantes vasculares no queda tan claro. Por un lado, la trombosis registrada en la microcirculación de los órganos sólidos en situación de rechazo y los correspondientes infartos jugaría un papel marginal en arterias criopreservadas como las empleadas en la cirugía de revascularización que nos ocupa. Resulta de mucho más interés el daño del endotelio como punto de partida de un proceso infiltrativo ya descrito en capítulos anteriores y que, sin embargo, no es constante en todas las muestras analizadas de aloinjertos criopreservados degenerados descritas en nuestra serie.

Por otro lado, la demostración de daño tisular por activación humoral en órganos trasplantados entre pacientes con idéntico HLA, en ausencia de DSA, haría pensar en la participación de anticuerpos no HLA en el rechazo mediado por anticuerpos ²⁰⁵. Hay que tener en cuenta, además, la diferente inmunogenicidad de los distintos antígenos HLA, lo que podría justificar las

diferentes respuestas observadas tras el trasplante vascular en nuestra serie, tanto desde el punto de vista inmunológico como clínico.

Sea cual sea el mecanismo, el presente estudio confirma la activación de una respuesta inmunológica en forma de producción de IgG detectable en todos los pacientes al mes del trasplante de arteria criopreservada, que se mantiene estable a lo largo del tiempo, y que además es específica frente a antígenos HLA del donante y que es capaz de activar la cascada del complemento. Sin embargo, se desconoce el efecto último de este rechazo crónico y cómo repercute finalmente en el injerto vascular criopreservado a la hora de provocar su degeneración aneurismática. En vista de estos resultados, y en consonancia con los hallazgos observados en la serie de pacientes con degeneraciones en múltiples arterias criopreservadas, no se puede descartar la participación de otros factores que actúen de forma coadyuvante en el fracaso de estos aloinjertos.

HALLAZGOS PRINCIPALES

(Análisis de los Resultados del Estudio Inmunológico)

1. Escasa histocompatibilidad aleatoria entre donantes y receptores. La dificultad para obtener arterias compatibles inmunológicamente y el riesgo de inmunosuprimir de forma permanente a este tipo de pacientes complican la posibilidad de controlar el rechazo del aloinjerto y la aparición de aneurismas.
2. La inmensa mayoría de los pacientes se consideran hipersensibilizados tras el primer trasplante de arteria criopreservada, con valores PRA superiores al 94% en todos los casos menos uno.
3. Todos los pacientes estudiados generaron una respuesta inmune consistente en la formación de cantidades significativas de anticuerpos IgG frente a antígenos HLA específicos del donante en ausencia de concordancia entre los alelos del donante y el receptor. Esta respuesta es detectable al mes del trasplante y se mantiene estable al tiempo.
4. Además, se observan incrementos significativos de anticuerpos frente a alelos que no están presentes en el tipaje del donante, debido a la existencia de epítomos o determinantes antigénicos compartidos entre alelos.
5. La cuantificación de IgG específicos frente al donante no reflejó valores de IMF particularmente más elevados en los dos pacientes que demostraron degeneración de su arteria criopreservada. Por otro lado, valores de IMF especialmente elevados en otros pacientes no estaban relacionados con la formación de aneurismas en los correspondientes aloinjertos durante el seguimiento.
6. La prueba de citotoxicidad cruzada mostró evidencia de la presencia de anticuerpos fijadores de complemento en el suero de todos los pacientes, demostrando la capacidad de los anticuerpos específicos generados para activar el complemento cuando se unen a sus respectivos antígenos, lo que podría favorecer la lisis celular y con ello el rechazo del injerto.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

En vista de los resultados reflejados en los capítulos previos, queda por determinar cómo encajan dichos hallazgos en el rechazo crónico de las arterias criopreservadas trasplantadas en pacientes humanos, lo que constituye el objetivo principal de nuestro estudio

La evidencia científica presentada hace pensar que el fracaso de los aloinjertos criopreservados no puede atribuirse únicamente a la incompatibilidad HLA, dado que, si bien hemos podido confirmar una reacción inmunológica en los anticuerpos formados frente al donante tras la cirugía, su acción no se traduce necesariamente en la posterior degeneración del aloinjerto. Más aún, cuando esta tiene lugar, no hemos observado un patrón inmunológico diferencial con respecto a otros aloinjertos de nuestra serie.

En esta suerte de rechazo crónico se describen una serie de mecanismos inmunológicos que actúan de forma concomitante y dan lugar a la alteración inicial de la estructura del vaso, actuando sobre todas las capas del mismo. Dos son los cambios más significativos: proliferación de la íntima y descelularización y fibrosis de la túnica media. La hiperplasia intimal difusa reduce de forma concéntrica la luz del vaso, pudiendo provocar estenosis significativas que comprometan el flujo sanguíneo. La disminución de los miocitos y la desestructuración de las fibras elásticas, con fibrosis y síntesis insuficiente de los componentes de la matriz extracelular, van a traer consigo un debilitamiento de la estructura de la pared vascular, favoreciendo su degeneración y la formación de dilataciones aneurismáticas.

Sobre este daño arterial es probable la participación de factores no inmunológicos (hipertensión, aterosclerosis, fuerzas mecánicas asociadas a la disposición del injerto, estrés físico por el proceso de congelación/descongelación...), que en su conjunto van a ser determinantes a la hora de que la arteria criopreservada llegue a fracasar, bien por hiperplasia intimal y trombosis subsiguiente, bien por degeneración aneurismática de la pared del vaso.

La hiperplasia intimal es un hallazgo relativamente frecuente en los bypasses llevados a cabo en la actividad diaria del cirujano vascular, incluso en aquellos realizados con la propia vena del paciente, si bien hemos observado características anatomopatológicas diferenciales entre la aterosclerosis y los cambios generados por el rechazo crónico. Por tanto, para obtener unos resultados validables desde el punto de vista inmunológico hemos centrado nuestro estudio en la aparición de degeneraciones aneurismáticas, que sí son características de los trasplantes vasculares, una vez que las mejoras en los métodos de criopreservación y descongelación en los aloinjertos ha reducido notablemente su aparición hasta constituir un pequeño porcentaje de los trasplantes vasculares.

Los hallazgos anatomopatológicos comunes en todos los aloinjertos degenerados analizados fueron la hipocelularidad de las capas parietales, especialmente de la túnica media, la fragmentación de las fibras elásticas y la pérdida progresiva de la íntima, que es sustituida por tejido de granulación con fibroblastos activados en el contexto de un proceso reparativo fibrosante que afecta a toda la pared. Sin embargo, llama la atención que más de la mitad de

las arterias criopreservadas degeneradas estudiadas no presentaban infiltrado inflamatorio de células mononucleares, a pesar de la situación de rechazo crónico de estos trasplantes vasculares. Tampoco son constantes la presencia de focos de calcificación y esclerosis, con histiocitos espumosos y afectando a todas las capas, en una configuración característica que las diferencia de la placa de ateroma. Finalmente, si bien la presencia de depósitos de inmunocomplejos (C3, IgG y HLA de clase I) en las tunicas íntima y media parece mucho más habitual, ésta tampoco fue observada en el 100% de las muestras analizadas.

En cuanto al comportamiento clínico de aquellos pacientes con degeneraciones en más de una arteria criopreservada cabría esperar que, dado que existe una sensibilización previa tras el primer trasplante vascular, el tiempo hasta que se materialice el efecto del rechazo crónico en forma de aneurisma en el nuevo aloinjerto se viera reducido progresivamente. Resulta sorprendente descubrir que esta teoría no se confirma con los datos obtenidos tras el seguimiento, ya que en el 75% de los casos los tiempos desde el implante hasta la segunda degeneración se incrementaron con respecto al mismo tiempo para la primera. Además, este incremento se observó en todos los casos para terceras degeneraciones, lo que estaría en contra de una causa exclusivamente inmunológica.

En este sentido, hemos confirmado a su vez en nuestra muestra que la histocompatibilidad HLA aleatoria entre donante y receptor es un evento poco frecuente, y la inmensa mayoría de los pacientes pasan a considerarse hipersensibilizados, con un PRA por encima del 94% tras el primer aloinjerto. Estos datos descartarían, en principio, que el comportamiento clínico observado en las degeneraciones múltiples pudiera deberse a la ausencia de rechazo crónico por concordancia entre los perfiles HLA, ya que sería extremadamente improbable que no hubiera anticuerpos capaces de reconocer alelos de un segundo o tercer trasplante vascular.

Llama la atención, si bien hay que tomar los hallazgos con cautela debido al tamaño muestral, que los dos pacientes que presentaron triple degeneración tenían antecedente de aneurismas de arteria nativa en distintas localizaciones, así como uno de los pacientes con dos degeneraciones (50% de todos los pacientes con degeneraciones múltiples). Además, el tiempo de evolución más corto (7 meses) se registró en el paciente con distrofia polianeurismática.

Como hemos mencionado previamente, la confirmación de una reacción inmunológica consistente en la formación de anticuerpos IgG específicos frente a antígenos del donante en ausencia de compatibilidad HLA, que se registra inicialmente al mes del trasplante, constituye uno de los principales resultados de nuestro estudio. Este dato contrasta, sin embargo, con el hecho de que no se han observado hallazgos significativos que diferencien los pacientes que presentaron degeneración aneurismática durante el seguimiento del resto de la muestra en cuanto a formación de anticuerpos, tanto por el número de DSA como por la cantidad de los mismos, medida mediante IMF. Por otro lado, valores de IMF especialmente elevados en otros pacientes no estaban relacionados con la formación de aneurismas en los correspondientes aloinjertos durante el seguimiento.

Además, la prueba cruzada por CDC mostró evidencia de la presencia de anticuerpos fijadores de complemento en el suero de todos los pacientes, demostrando la capacidad de los anticuerpos específicos generados para activar el complemento cuando se unen a sus respectivos antígenos, lo que podría favorecer la lisis celular y con ello el rechazo del injerto.

Por otro lado, los aloinjertos de arteria criopreservada han demostrado escasa tasa de permeabilidad y un elevado número de reintervenciones. Sin embargo, los datos de salvamento de la extremidad y la mortalidad a medio plazo son bastante positivos, teniendo en cuenta la evolución natural de los enfermos con isquemia crítica en ausencia de revascularización. Por lo tanto, su uso queda validado en pacientes seleccionados en los que la necesidad de revascularización mediante bypass biológico, bien por la presencia de infección local que contraindique el uso de material protésico, bien por la necesidad de revascularización infragenicular comprometida en ausencia de vena safena autóloga. La correcta elección de los candidatos a trasplante vascular resulta fundamental en este contexto, de cara a obtener los mejores resultados en cuanto a coste/ beneficio.

Dados los hallazgos obtenidos a partir del presente estudio, nos atrevemos a realizar las siguientes recomendaciones clínicas de cara a mejorar los resultados obtenidos con la revascularización mediante arterias criopreservadas:

- Se recomiendan ecografías seriadas semestrales durante toda la vida útil del bypass, de cara a localizar posibles degeneraciones, que pueden aparecer años después de la cirugía, incluso sin cambios en los controles previos.
- Evitar, siempre que sea posible, nuevos trasplantes vasculares en pacientes con degeneración aneurismática previa, dada la tendencia a presentar nuevos aneurismas en sucesivos aloinjertos.
- En caso de aparición de degeneraciones aneurismáticas, se recomienda el recambio temprano del bypass frente al seguimiento clínico, ya que su evolución suele ser hacia la trombosis del injerto o el crecimiento progresivo de la dilatación.
- Es importante la correcta selección de los pacientes candidatos a trasplante vascular como método para mejorar los resultados de estos bypasses, si bien es cierto que casi todos ellos se encuentran ante una situación de isquemia crítica con riesgo de pérdida de la extremidad y ausencia de conductos disponibles con suficientes garantías. La arteria criopreservada constituiría, por tanto, la opción de revascularización con las mayores garantías, lo que dificulta el proceso de selección.

Hemos de reconocer que el enfoque del estudio aquí presentado es tremendamente extenso y, como tal, adolece de lagunas en los distintos apartados por la amplitud de la tarea a abarcar. Como admitimos en la introducción, ésta representa su mayor debilidad, pero a la vez su mayor virtud, al ser capaz de ofrecer una perspectiva más global de los procesos que tienen lugar en la arteria criopreservada tras el trasplante, proporcionando una mejor comprensión del rechazo crónico en este tipo de aloinjertos. Esta visión tan amplia nos ha permitido obtener resultados cuyo análisis arroja hallazgos inesperados en cuanto al comportamiento de las arterias criopreservadas frente al sistema inmune del receptor, algunos de los cuales hubieran sido imposibles de lograr si el foco de nuestra investigación se hubiera centrado en un campo de estudio más reducido. Creemos, por tanto, que no solo confirma la especificidad de la reacción inmunológica post trasplante de arterias criopreservadas y su comportamiento en el tiempo, sino que además abre interesantes líneas de investigación para futuros estudios en este campo que sean capaces de confirmar y ampliar los hallazgos aquí presentados.

A la hora de obtener conclusiones definitivas y relaciones de causalidad con la suficiente potencia estadística sería necesaria una muestra mucho mayor y con un tiempo de seguimiento más largo. De la dificultad para obtener tal estudio da fe el escaso tamaño muestral de los artículos presentados hasta la fecha sobre la formación de anticuerpos donante específicos, lo sugiere la necesidad de un estudio multicéntrico bajo el mismo protocolo de trasplantes que permita incrementar la velocidad de reclutamiento y reducir los tiempos necesarios para la obtención de resultados. El objetivo último consistiría en identificar todos los factores implicados en la degeneración de las arterias criopreservadas, tanto inmunológicos como no inmunológicos así como poder predecir el comportamiento de estos aloinjertos una vez implantados para mejorar los resultados clínicos a medio y largo plazo.

CONCLUSIONES

El candidato a trasplante de aloinjerto criopreservado es un subgrupo de pacientes pluripatológicos, con múltiples factores de riesgo, y que asocian un peligro inminente para su vida o la pérdida de extremidad, presentando escasas posibilidades de revascularización mediante otras técnicas o tipos de injerto.

Se registraron resultados subóptimos en cuanto a permeabilidad primaria, primaria asistida y secundaria, con una alta tasa de reintervenciones. Sin embargo, tanto la mortalidad como el salvamento de la extremidad a medio y largo plazo son favorables, más aún si tenemos en cuenta la evolución natural de estos pacientes con el tratamiento conservador.

La degeneración aneurismática de los aloinjertos arteriales criopreservados es una complicación relativamente frecuente y probablemente infradiagnosticada en las series publicadas, dada su capacidad para iniciarse años después del trasplante vascular. Los injertos presentaron dilataciones multifocales o aisladas, con un tiempo de evolución hasta la aparición de las degeneraciones aneurismáticas que varía de unos pocos meses a años (rango 7-68 meses en nuestra muestra).

En contra de lo esperado por la hipersensibilización de estos pacientes tras un primer trasplante vascular, subsiguientes aloinjertos vasculares no reducen necesariamente el tiempo de latencia hasta una nueva degeneración del bypass. Los tiempos de evolución para una nueva degeneración aumentaron con la segunda criopreservada en un 75% de los casos. Incluso en los dos pacientes con tres degeneraciones en otros tantos injertos, los tiempos registrados hasta un tercer fracaso se vieron incrementados.

Al menos en ciertos casos, se sospecha de factores etiopatogénicos concomitantes en la formación de estos aneurismas, capaces de afectar tanto a vasos propios como a trasplantes arteriales. Hemos observado que los dos pacientes que presentaron triple degeneración tenían antecedente de aneurismas de arteria nativa en distintas localizaciones, así como uno de los pacientes con dos degeneraciones (50% de todos los pacientes con degeneraciones múltiples). Además, el tiempo de evolución más corto (7 meses) se registró en el paciente con distrofia polianeurismática.

El estudio anatomopatológico arrojó hallazgos comunes en todos los aloinjertos degenerados analizados, como la hipocelularidad de las capas parietales, especialmente de la túnica media, la fragmentación de las fibras elásticas y la pérdida progresiva de la íntima, que es sustituida por tejido de granulación con fibroblastos activados en el contexto de un proceso reparativo fibrosante que afecta a toda la pared. Por otro lado, y a pesar de la situación de rechazo crónico de estos trasplantes vasculares, más de la mitad de las arterias criopreservadas degeneradas no presentaban infiltrado inflamatorio de células mononucleares, como tampoco fueron constante la presencia de

característicos focos de calcificación y esclerosis, con histiocitos espumosos y afectando a todas las capas, ni la presencia de depósitos de inmunocomplejos (C3, IgG y HLA de clase I) en las tunicas íntima y media.

Se objetiva una escasa histocompatibilidad aleatoria entre donantes y receptores. Además, la inmensa mayoría de los pacientes se consideran hipersensibilizados tras el primer trasplante de arteria criopreservada, con valores PRA superiores al 94% en todos los casos menos uno.

Todos los pacientes estudiados generaron una respuesta inmune consistente en la formación de cantidades significativas de anticuerpos IgG frente a antígenos HLA específicos del donante en ausencia de concordancia entre los alelos del donante y el receptor. También se observan incrementos significativos de anticuerpos frente a alelos que no están presentes en el perfil del donante, debido a la existencia de epítomos o determinantes antigénicos compartidos entre alelos. La respuesta es detectable al mes del trasplante, y se mantiene en el tiempo.

La cuantificación de IgG específicos frente al donante no reflejó valores de IMF particularmente más elevados en los dos pacientes que demostraron degeneración de su arteria criopreservada. Por otro lado, valores de IMF especialmente elevados en otros pacientes no estaban relacionados con la formación de aneurismas en los correspondientes aloinjertos durante el seguimiento. Por tanto, no se encontraron marcadores inmunológicos capaces de predecir el desarrollo de aneurismas y su posterior evolución.

La prueba de citotoxicidad cruzada mostró evidencia de la presencia de anticuerpos fijadores de complemento en el suero de todos los pacientes, demostrando la capacidad de los anticuerpos específicos generados para activar el complemento cuando se unen a sus respectivos antígenos, lo que podría favorecer la lisis celular y con ello el rechazo del injerto.

En conclusión, si bien hemos podido confirmar una reacción inmuno específica en los anticuerpos formados frente al donante tras la cirugía, su acción no se traduce necesariamente en la posterior degeneración del aloinjerto. Más aún, cuando esta tiene lugar, no hemos observado un patrón inmunológico diferencial con respecto a otros aloinjertos de nuestra serie, lo que hace pensar que en el proceso de degeneración podrían participar tanto factores inmunológicos como no inmunológicos

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AC: Anticuerpos

AIT: Accidente Isquémico Transitorio.

Angio TC: Angio Tomografía Computarizada

C3: Componente 3 del complemento

C4: Componente 4 del complemento

CAV: Cardiac Allograft Vasculopathy o vasculopatía del trasplante cardiaco

CDC: Citotoxicidad Dependiente del Complemento.

CLH: Criopreservación Libre de Hielo

DMSO: Dimetilsulfóxido

DSA: Donor Specific Antibodies o anticuerpos donante específicos.

DSS: Dodecil Sulfato Sódico

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

EDRF: Factor de relajación derivado del endotelio

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

ePTFE: Politetrafluoroetileno expandido

FDA: Food and Drug Administration de los Estados Unidos

HE: Tinción Hematoxilina-Eosina

HLA: Human Leukocyte Antigen o antígeno leucocitario humano

HTA: Hipertensión Arterial

HUCA: Hospital Universitario Central de Asturias

IFN- γ : Interferón gamma

IgG: Inmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

IL-4: Interleucina 4

IQR: Rango Intercuartílico

MFI: Mean Fluorescence Intensity

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

MM: Mismatch o discordancia

MMII: Miembros inferiores

NK: Linfocitos tipo Natural Killer

NO: Óxido nítrico

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PGI₂: Prostaciclina

PRA: Panel Reactive Antibody

PRH: Prótesis vasculares con Recubrimiento Heparínico

SHR: Spontaneously Hypertensive Rats

SVS: Society for Vascular Surgery

TEA: Tromboendarterectomía

TEPA: Tromboembolismo Pulmonar Agudo

TG: Medio TRIS-glucosa

Th1: Linfocitos T colaboradores (T helper) tipo 1

Th2: Linfocitos T colaboradores (T helper) tipo 2

t-PA: Activador tisular del plasminógeno

VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial

VSI: Vena Safena Interna

Wifl: Clasificación Wound, Ischemia and foot Infection

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Harrison LH. Historical Aspects in the Development of Venous Autografts. *Ann Surg.* 1976;183(2):101–6.
2. Manteuffel Z von. Demonstration eines Präparates von Aneurysma arteriovenosum ossificans der Arteria femoralis profunda . *Chirurgengcongress- Verhandlungen I.* 1895;167.
3. Eckstein H-H. Langenbeck's Archives and the early development of vascular surgery in Germany. *Langenbeck's Archives Surg Deutsche Gesellschaft Für Chir.* 2010;395 Suppl 1(S1):33–6.
4. Carrel A. The transplantation of organs: a preliminary communication. 1905 [classical article]. *Yale J Biology Medicine.* 2001;74(4):239–41.
5. Goyanes J. Sustitución plástica de las arterias por las venas, arterioplastia venosa, aplicada, como nuevo método, al tratamiento de los aneurismas. *El Siglo Médico.* 1906;561–4.
6. Williams GM. Bertram M. Bernheim: a southern vascular surgeon. *J Vasc Surg.* 1992;16(3):311–8.
7. Moure P. Etude des greffes vasculaires et particulièrement de leurs applications chirurgicales au rétablissement de la continuité des vaisseaux et des conduits musculo-membraneux. Tesis Doctoral Verlag nicht ermittelbar. 1914;
8. Jeger E. Zur technik der blutgefassnaht. *Beitr Klin Chir.* 1915;97:553–8.
9. Debakey ME, Simeone FA. Battle Injuries of the Arteries in World War II : An Analysis of 2,471 Cases. *Ann Surg.* 1946;123(4):534–79.
10. Gross RE, Bill AH, Peirce EC. Methods for preservation and transplantation of arterial grafts; observations on arterial grafts in dogs; report of transplantation of preserved arterial grafts in nine human cases. *Surg Gynecol Obstetrics.* 1949;88(6):689–701.
11. Swan H, Maaske C, Johnson M, Grover R. Arterial homografts. II. Resection of thoracic aortic aneurysm using a stored human arterial transplant. *M Archives Surg.* 1950;61(4):732–7.
12. Dubost C, Allary M, Oeconomos N. Resection of an aneurysm of the abdominal aorta: reestablishment of the continuity by a preserved human arterial graft, with result after five months. *M Archives Surg.* 1952;64(3):405–8.

13. Dubost C. The first successful resection of an aneurysm of the abdominal aorta followed by re-establishment of continuity using a preserved human arterial graft. *Ann Vasc Surg.* 1986;1(1):147–9.
14. Bakey MED, Creech O, Cooley DA, Halpert B. Structural changes in human aortic homografts. *M Archives Surg.* 1954;69(4):472.
15. Szilagyi DE, McDonald RT, Smith RF, Whitcomb JG. Biologic fate of human arterial homografts. *M Archives Surg.* 1957 Oct 1;75(4):506–27; discussion 527-9.
16. Callow AD. Arterial homografts. *Eur J Vasc Endovasc.* 1996;12(3):272–81.
17. Hess F. History of (micro) vascular surgery and the development of small-caliber blood vessel prostheses (with some notes on patency rates and re-endothelialization). *Microsurg.* 1985;6(2):59–69.
18. Xue L, Greisler HP. Biomaterials in the development and future of vascular grafts. *J Vasc Surg.* 2003;37(2):472–80.
19. JS Y. Dr. Ben Eisman and the accidental discovery of the Gore-Tex graft. In: Eskandari MK, editor. *Contemporary vascular surgery.* Shelton, Connecticut: PMPH-USA; 2011. p. 1–7.
20. Kashyap VS, Ahn SS, Quinones-Baldrich WJ, Choi B-U, Dorey F, Reil TD, et al. Infrapopliteal-lower extremity revascularization with prosthetic conduit: a 20-year experience. *Vasc Endovasc Surg.* 2002;36(4):255–62.
21. Albers M, Battistella VM, Romiti M, Rodrigues AAE, Pereira CAB. Meta-analysis of polytetrafluoroethylene bypass grafts to infrapopliteal arteries. *J Vasc Surg.* 2003;37(6):1263–9.
22. Dorigo W, Pulli R, Castelli P, Dorrucchi V, Ferilli F, Blasis GD, et al. A multicenter comparison between autologous saphenous vein and heparin-bonded expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) graft in the treatment of critical limb ischemia in diabetics. *J Vasc Surg.* 2011;54(5):1332–8.
23. Samson RH, Morales R, Showalter DP, Lepore MR, Nair DG. Heparin-bonded expanded polytetrafluoroethylene femoropopliteal bypass grafts outperform expanded polytetrafluoroethylene grafts without heparin in a long-term comparison. *J Vasc Surg.* 2016;64(3):638–47.
24. Voury-Pons A, Massiot N, Giauffret E, Behets C, Duprey A, Hassen-Khodja R, et al. Comparison of cryopreserved arterial allografts versus heparin-bonded vascular grafts in infragenicular bypass for chronic limb threatening ischemia. *Ann Vasc Surg.* 2019;
25. Chew DKW, Owens CD, Belkin M, Donaldson MC, Whittemore AD, Mannick JA, et al. Bypass in the absence of ipsilateral greater saphenous vein: Safety and superiority of the contralateral greater saphenous vein. *J Vasc Surg.* 2002;35(6):1085–92.

26. Arvela E, Söderström M, Albäck A, Aho P-S, Venermo M, Lepäntalo M. Arm vein conduit vs prosthetic graft in infrainguinal revascularization for critical leg ischemia. *J Vasc Surg.* 2010;52(3):616–23.
27. Albertini JN, Barral X, Branchereau A, Favre JP, Guidicelli H, Magne JL, et al. Long-term results of arterial allograft below-knee bypass grafts for limb salvage: A retrospective multicenter study. *J Vasc Surg.* 2000;31(3):426–35.
28. Szilagyi DE, Rodriguez FJ, Smith RF, Elliott JP. Late fate of arterial allografts. Observations 6 to 15 years after implantation. *Archives Surg Chic Ill 1960.* 1970;101(6):721–33.
29. Vogt PR. Arterial allografts in treating aortic graft infections: something old, something new. *Semin Vasc Surg.* 2011;24(4):227–33.
30. Werkmeister JA, Edwards GA, Ramshaw JAM. Collagen-Based Vascular Prostheses. In: Wise DL, Gresser JD, Trantolo DJ, Cattaneo MV, Lewandrowski K-U, Yaszemski MJ, editors. *Biomaterials Engineering and Devices: Human Applications Volume 1 Fundamentals and Vascular and Carrier Applications.* Humana Press; 2000. p. 121–36.
31. Schröder A, Imig H, Peiper U, Neidel J, Petereit A. Results of a bovine collagen vascular graft (Solcograft-P) in infra-inguinal positions. *Eur J Vascular Surg.* 1988;2(5):315–21.
32. Neufang A, Espinola-Klein C, Dorweiler B, Reinstadler J, Pitton M, Savvidis S, et al. Sequential Femorodistal Composite Bypass with Second Generation Glutaraldehyde Stabilized Human Umbilical Vein (HUV). *Eur J Vasc Endovasc.* 2005;30(2):176–83.
33. Hasson JE, Newton WD, Waltman AC, Fallon JT, Brewster DC, Darling RC, et al. Mural degeneration in the glutaraldehydetanned umbilical vein graft: Incidence and implications. *J Vasc Surg.* 1986;4(3):243–50.
34. Hawkins JA, Hillman ND, Lambert LM, Jones J, Russo GBD, Profaizer T, et al. Immunogenicity of decellularized cryopreserved allografts in pediatric cardiac surgery: comparison with standard cryopreserved allografts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003;126(1):247–52.
35. Weinberg CB, Bell E. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Sci New York N Y.* 1986;231(4736):397–400.
36. Carrabba M, Madeddu P. Current Strategies for the Manufacture of Small Size Tissue Engineering Vascular Grafts. *Frontiers Bioeng Biotechnology.* 2018;6:41.
37. Maina RM, Barahona MJ, Finotti M, Lysy T, Geibel P, D’Amico F, et al. Generating vascular conduits: from tissue engineering to three-dimensional bioprinting. *Innovative Surg Sci.* 2018;3(3):203–13.
38. Pistolese GR, Ippoliti A, Tuccimei I, Lorido A. Conservative treatment of aortic graft infection. *Eur J Vasc Endovasc.* 1997;14:47–52.

39. O'Hara PJ, Hertzner NR, Beven EG, Krajewski LP. Surgical management of infected abdominal aortic grafts: Review of a 25-year experience. *J Vasc Surg.* 1986;3(5):725–31.
40. Moore WS, Swanson RJ, Campagna G, Bean B. The use of fresh tissue arterial substitutes in infected fields. *J Surg Res.* 1975;18(3):229–33.
41. Harlander-Locke MP, Harmon LK, Lawrence PF, Oderich GS, McCready RA, Morasch MD, et al. The use of cryopreserved aortoiliac allograft for aortic reconstruction in the United States. *J Vasc Surg.* 2014;59(3):669-674.e1.
42. Masabni K, Weaver MR, Kandagatla P, Shepard AD, Huang J, Adas ZA, et al. Cryopreserved Allograft in the Management of Native and Prosthetic Aortic Infections. *Ann Vasc Surg.* 2018;56(J Vasc Surg 49 2009):1–10.
43. Bell PRF, DePalma RG, Eastcott HHG, Eclöf B, Jamieson CW. The definition of critical ischemia of a limb. Working Party of the International Vascular Symposium. *Brit J Surg.* 1982;(69:S1).
44. Constans J, Bura-Rivière A, Visona A, Brodmann M, Abraham P, Olinic D-M, et al. Urgent need to clarify the definition of chronic critical limb ischemia – a position paper from the European Society for Vascular Medicine. *Vasa.* 2019;48(3):223–7.
45. Ziza V, Canaud L, Gandet T, Molinari N, Alonso W, Chastan R, et al. Outcomes of cold-stored venous allograft for below-knee bypasses in patients with critical limb ischemia. *J Vasc Surg.* 2015;62(4):974–83.
46. Chang CK, Scali ST, Feezor RJ, Beck AW, Waterman AL, Huber TS, et al. Defining utility and predicting outcome of cadaveric lower extremity bypass grafts in patients with critical limb ischemia. *J Vasc Surg.* 2014;60(6):1554–64.
47. Furlough CL, Jain AK, Ho KJ, Rodriguez HE, Tomita TM, Eskandari MK. Peripheral artery reconstructions using cryopreserved arterial allografts in infected fields. *J Vasc Surg.* 2019;70(2):562–8.
48. Guevara-Noriega KA, Lucar-Lopez GA, Pomar JL. Cryopreserved Allografts for Treatment of Chronic Limb-Threatening Ischemia in Patients Without Autologous Saphenous Veins. *Ann Vasc Surg.* 2019;60:379–87.
49. Masmajan S, Deslarzes-Dubuis C, Petitprez S, Longchamp A, Haller C, Saucy F, et al. Ten Year Experience of Using Cryopreserved Arterial Allografts for Distal Bypass in Critical Limb Ischaemia. *European J Vasc Endovascular Surg Official J European Soc Vasc Surg.* 2019;(57):823–31.
50. O'Banion LA, Wu B, Eichler CM, Reilly LM, Conte MS, Hiramoto JS. Cryopreserved saphenous vein as a last-ditch conduit for limb salvage. *J Vasc Surg.* 2017;66(3):844–9.

51. Lejay A, Delay C, Girsowicz E, Chenesseau B, Bonnin E, Ghariani M-Z, et al. Cryopreserved Cadaveric Arterial Allograft for Arterial Reconstruction in Patients with Prosthetic Infection. *Eur J Vasc Endovasc.* 2017;54(5):636–44.
52. Heo S-H, Kim Y-W, Woo S-Y, Park Y-J, Kim D-K, Chung D-R. Recent Results of In Situ Abdominal Aortic Reconstruction with Cryopreserved Arterial Allograft. *Eur J Vasc Endovasc.* 2017;53(2):158–67.
53. Bossi M, Tozzi M, Franchin M, Ferraro S, Rivolta N, Ferrario M, et al. Cryopreserved Human Allografts for the Reconstruction of Aortic and Peripheral Prosthetic Graft Infection. *Ann Vasc Dis.* 2017;10(4):oa.17-00068.
54. Lowampa EM, Holemans Ch, Stiennon L, Damme HV, Defraigne JO. Late Fate of Cryopreserved Arterial Allografts. *Eur J Vasc Endovasc.* 2016;52(5):696–702.
55. Diamant MR, Figoli LH, González SG, Puñal A, Etcheverry S. Use of cryopreserved arterial homografts in peripheral vascular surgery. *RACCV.* 2016;5(1):12–9.
56. Touma J, Cochenec F, Parisot J, Legendre AF, Becquemin J-P, Desgranges P. In situ reconstruction in native and prosthetic aortic infections using cryopreserved arterial allografts. *European J Vasc Endovascular Surg Official J European Soc Vasc Surg.* 2014;48(3):292–9.
57. Zehr BP, Niblick CJ, Downey H, Ladowski JS. Limb salvage with CryoVein cadaver saphenous vein allografts used for peripheral arterial bypass: role of blood compatibility. *Ann Vasc Surg.* 2011;25(2):177–81.
58. Randon C, Jacobs B, Ryck FD, Beele H, Vermassen F. Fifteen years of infrapopliteal arterial reconstructions with cryopreserved venous allografts for limb salvage. *J Vasc Surg.* 2010;51(4):869–77.
59. Matia I, Adamec M, Janousek L, Lipár K, Marada T, Klein D, et al. [Clinical experience with cold-preservation of venous and arterial allografts. long-term outcomes]. *Rozhledy V Chir Měsíčník Československé Chir Společnosti.* 2010;89(1):45–54.
60. Bisdas T, Bredt M, Pichlmaier M, Aper T, Wilhelmi M, Bisdas S, et al. Eight-year experience with cryopreserved arterial homografts for the in situ reconstruction of abdominal aortic infections. *J Vasc Surg.* 2010;52(2):323–30.
61. Bannazadeh M, Sarac TP, Bena J, Srivastava S, Ouriel K, Clair D. Reoperative lower extremity revascularization with cadaver vein for limb salvage. *Ann Vasc Surg.* 2008;23(1):24–31.
62. Ruddle AC, George S, Armitage WJ, MacGowan A, McCulloch S, Brookes ST, et al. Venous allografts prepared from stripped long saphenous vein. Is there a need for antibiotic sterilisation? *Eur J Vasc Endovasc.* 1998;15(5):444–8.

63. Matia I, Janoušek L, Marada T, Adamec M. Cold-stored Venous Allografts in the Treatment of Critical Limb Ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc.* 2007;34(4):424–31.
64. Albers M, Romiti M, Pereira CAB, Antonini M, Wulkan M. Meta-Analysis of Allograft Bypass Grafting to Infrapopliteal Arteries. *Eur J Vasc Endovasc.* 2004;28(5):462–72.
65. Gómez-Caro A, Martínez E, Rodríguez A, Sanchez D, Martorell J, Gimferrer JM, et al. Cryopreserved Arterial Allograft Reconstruction After Excision of Thoracic Malignancies. *Ann Thorac Surg.* 2008;86(6):1753–61.
66. FAO. Basic principles of cryopreservation. In *Cryoconservation of animal genetic resources. FAO Animal Production and Health Guidelines Nuber 12 Rome.* 2012;85–159.
67. Han B, Bischof JC. Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing. *Cryobiology.* 2004;48(1):8–21.
68. Pegg DE. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biology Clifton N J.* 2007;368:39–57.
69. Müller-Schweinitzer E. Cryopreservation of isolated blood vessels. *Folia Haematol Leipzig Ger 1928.* 1988;115(3):405–9.
70. Rigol M, Heras M, Martínez A, Zurbano MJ, Agustí E, Roig E, et al. Changes in the cooling rate and medium improve the vascular function in cryopreserved porcine femoral arteries. *J Vasc Surg.* 2000;31(5):1018–25.
71. Wang C-C, Lopez-Valdes S, Lin T-L, Yap A, Yong C-C, Li W-F, et al. Outcomes of long storage times for cryopreserved vascular grafts in outflow reconstruction in living donor liver transplantation. *Liver Transplant Official Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc.* 2014;20(2):173–81.
72. Mirabet V, Carda C, Solves P, Novella-Maestre E, Carbonell-Uberos F, Caffarena JM, et al. Long-term storage in liquid nitrogen does not affect cell viability in cardiac valve allografts. *Cryobiology.* 2008;57(2):113–21.
73. Müller-Schweinitzer E. Cryopreservation of vascular tissues. *Organogenesis.* 2009;5(3):97–104.
74. Pasquinelli G, Foroni L, Buzzi M, Tazzari PL, Vaselli C, Mirelli M, et al. Smooth muscle cell injury after cryopreservation of human thoracic aortas. *Cryobiology.* 2006;52(2):309–16.
75. Buján J, Pascual G, García-Honduvilla N, Gimeno MJ, Jurado F, Martín AC-S, et al. Rapid Thawing Increases the Fragility of the Cryopreserved Arterial Wall. *Eur J Vasc Endovasc.* 2000;20(1):13–20.

76. Novotny R, Slizova D, Hlubocky J, Krs O, Spatenka J, Burkert J, et al. Cryopreserved human aortic root allografts arterial wall: Structural changes occurring during thawing. *Plos One*. 2017;12(4):e0175007.
77. Wassenaar C, Wijsmuller EG, Herwerden LAV, Aghai Z, Tricht CLV, Bos E. Cracks in cryopreserved aortic allografts and rapid thawing. *Ann Thorac Surg*. 1995;60(2 Suppl):S165-7.
78. Song YC, Khirabadi BS, Lightfoot F, Brockbank KG, Taylor MJ. Vitreous cryopreservation maintains the function of vascular grafts. *Nat Biotechnol*. 2000;18(3):296–9.
79. Thakrar RR, Patel VP, Hamilton G, Fuller BJ, Seifalian AM. Vitreous cryopreservation maintains the viscoelastic property of human vascular grafts. *Faseb J*. 2006;20(7):874–81.
80. Song YC, Hagen PO, Lightfoot FG, Taylor MJ, Smith AC, Brockbank KG. In vivo evaluation of the effects of a new ice-free cryopreservation process on autologous vascular grafts. *J Investigative Surg Official J Acad Surg Res*. 2000;13(5):279–88.
81. Huber AJT, Brockbank KGM, Riemann I, Schleicher M, Schenke-Layland K, Fritze O, et al. Preclinical evaluation of ice-free cryopreserved arteries: structural integrity and hemocompatibility. *Cells Tissues Organs*. 2012;196(3):262–70.
82. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *New Engl J Medicine*. 1969;280(14):735–9.
83. McKenna RM, Takemoto SK, Terasaki PI. Anti-HLA antibodies after solid organ transplantation. *Transplantation*. 2000;69(3):319–26.
84. Cai J, Terasaki PI. Humoral theory of transplantation: mechanism, prevention, and treatment. *Hum Immunol*. 2005;66(4):334–42.
85. Shaddy RE, Hunter DD, Osborn KA, Lambert LM, Minich LL, Hawkins JA, et al. Prospective analysis of HLA immunogenicity of cryopreserved valved allografts used in pediatric heart surgery. *Circulation*. 1996;94(5):1063–7.
86. Mirelli M, Nanni-Costa A, Scolari MP, Iannelli S, Buscaroli A, Ridolfi L, et al. Mismatch-specific anti-HLA antibody production following aorta transplants. *Transpl Int Official J European Soc Organ Transplant*. 1998;11 Suppl 1(s1):S444-7.
87. Mirelli M, Stella A, Faggioli G, Scolari M, Iannelli S, Freyrie A, et al. Immune Response Following Fresh Arterial Homograft Replacement for Aortoiliac Graft Infection. *Eur J Vasc Endovasc*. 1999;18(5):424–9.
88. Mirelli M, Buzzi M, Pasquinelli G, Tazzari PL, Testi G, Ricchi E, et al. Fresh and Cryopreserved Arterial Homografts: Immunological and Clinical Results. *Transplant P*. 2005;37(6):2688–91.

89. Balzer KM, Luther B, Sandmann W, Wassmuth R. Donor-specific sensitization by cadaveric venous allografts used for arterial reconstruction in peripheral arterial occlusive vascular disease. *Tissue Antigens*. 2004;64(1):13–7.
90. Konrad H, Wahle A, Altermann W, Schlaf G. Strong Humoral Anti-HLA Immune Response Upon Arbitrarily Chosen Allogeneic Arterial Vessel Grafts. *J Clin Cell Immunol*. 2017;8(5):1–10.
91. Saito A, Motomura N, Kakimi K, Ono M, Takai D, Sumida S, et al. Cryopreservation does not alter the allogenicity and development of vasculopathy in post-transplant rat aortas. *Cryobiology*. 2006;52(2):251–60.
92. Moriyama S, Utoh J, Sun L, Okamoto K, Kunitomo R, Hirose K, et al. Clinical controversy concerning the use of cryopreserved allografts in cardiovascular surgery. *Transplant P*. 2000;32(2):336–8.
93. Deaton DW, Stephens JK, Karp RB, Gamliel H, Rocco F, Perelman MJ, et al. Evaluation of cryopreserved allograft venous conduits in dogs. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1992;103(1):153–62.
94. Giglia JS, Ollerenshaw JD, Dawson PE, Black KS, Abbott WM. Cryopreservation prevents arterial allograft dilation. *Ann Vasc Surg*. 2002;16(6):762–7.
95. Rodríguez M, Pascual G, Pérez-Köhler B, Cifuentes A, Garcia-Honduvilla N, Bellón JM, et al. Immune response to the long-term grafting of cryopreserved small-diameter arterial allografts. *Histol Histopathol*. 2012;27(7):873–84.
96. Feingold B, Wearden PD, Morell VO, Galvis D, Galambos C. Expression of A and B blood group antigens on cryopreserved homografts. *Ann Thorac Surg*. 2009;87(1):211–4.
97. Mehra MR, Kobashigawa J, Starling R, Russell S, Uber PA, Parameshwar J, et al. Listing Criteria for Heart Transplantation: International Society for Heart and Lung Transplantation Guidelines for the Care of Cardiac Transplant Candidates—2006. *J Hear Lung Transplant*. 2006;25(9):1024–42.
98. Schiava ND, Mathevet J-L, Boudjelit T, Arsicot M, Feugier P, Lermusiaux P, et al. Cryopreserved Arterial Allografts and ABO and Rhesus Compatibility. *Ann Vasc Surg*. 2016;33:173–80.
99. Bisdas T, Pichlmaier M, Wilhelmi M, Bisdas S, Haverich A, Teebken OE. Effects of the ABO-mismatch between donor and recipient of cryopreserved arterial homografts. *Int Angiology J Int Union Angiology*. 2011;30(3):247–55.
100. Matia I, Fellmer P, Splith K, Varga M, Adamec M, Kämmerer I, et al. Immunosuppressive protocol with delayed use of low-dose tacrolimus after aortic transplantation suppresses donor-specific anti-MHC class I and class II antibody production in rats. *Ann Transpl*. 2014;19:225–32.

101. Splith K, Fellmer P, Matia I, Varga M, Oliverius M, Kuhn S, et al. Antibody-Mediated Rejection of Arterialised Venous Allografts Is Inhibited by Immunosuppression in Rats. *Plos One*. 2014;9(3):e91212.
102. Spunda R, Hruby J, Mericka P, Mlcek M, Pecha O, Splith K, et al. Immunosuppressive protocols with tacrolimus after cryopreserved aortal allotransplantation in rats. *Plos One*. 2018;13(8):e0201984.
103. Varga M, Matia I, Lodererova A, Adamec M. Tacrolimus inhibits intimal hyperplasia in arterialised veins in rats. *Bratislavské Lekárske Listy*. 2012;113(1):5–9.
104. Gama AD da, Sarmiento C, Vieira T, Carmo GX do, Lisboa. F the SMH and F de M da U de LC de C do I do C and U de TR do H da CV. The use of arterial allografts for vascular reconstruction in patients receiving immunosuppression for organ transplantation. *J Vasc Surg*. 1994;20(2):271–8.
105. Mackay IR, Rosen FS, Klein J, Sato A. The HLA System. *New Engl J Medicine*. 2000;343:702–9.
106. Neefjes J, Jongmsma MLM, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(12):823–36.
107. Howell WM, Carter V, Clark B. The HLA system: immunobiology, HLA typing, antibody screening and crossmatching techniques. *J Clin Pathol*. 2010;63(5):387.
108. Regueiro JR, López C, González S, Naves EM. *Inmunología. Biología y Patología del Sistema Inmune (4ª Ed.)*. Editorial Médica Panamericana. Madrid. 2011;
109. Rees L, Kim JJ. HLA sensitisation: can it be prevented? *Pediatr Nephrol*. 2015;30(4):577–87.
110. Molina J, Navas A, Agüera ML, Benot AR. Avances en inmunología del trasplante renal. *Nefrología*. 2018;10(2):11–9.
111. Lionaki S, Panagiotellis K, Iniotaki A, Boletis JN. Incidence and Clinical Significance of De Novo Donor Specific Antibodies after Kidney Transplantation. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:1–9.
112. Wiebe C, Nickerson P. Posttransplant monitoring of de novo human leukocyte antigen donor-specific antibodies in kidney transplantation. *Curr Opin Organ Tran*. 2013;18(4):470–7.
113. Baldwin W, Valujskikh A, Fairchild R. Mechanisms of antibody-mediated acute and chronic rejection of kidney allografts. *Curr Opin Organ Tran*. 2016;21(1):7–14.
114. Mehra NK, Baranwal AK. Clinical and immunological relevance of antibodies in solid organ transplantation. *Int J Immunogenet*. 2016;43(6):351–68.

115. Loupy A, Lefaucheur C. Antibody-Mediated Rejection of Solid-Organ Allografts. *New Engl J Med*. 2018;379(12):1150–60.
116. Pasquinelli G, Pistillo MP, Ricci F, Buzzi M, Tazzari PL, Foroni L, et al. The “in situ” expression of Human Leukocyte Antigen Class I antigens is not altered by cryopreservation in human arterial allografts. *Cell Tissue Bank*. 2007;8(3):195–203.
117. Lee MS, Finch W, Weisz G, Kirtane AJ. Cardiac allograft vasculopathy. *Rev Cardiovasc Med*. 2011;12(3):143–52.
118. Häyry P, Mennander A, Tiisala S, Halttunen J, Yilmaz S, Paavonen T. Rat aortic allografts: an experimental model for chronic transplant arteriosclerosis. *Transplant P*. 1991;23(1 Pt 1):611–2.
119. Soleimani B, Shi VC. Experimental models of graft arteriosclerosis. *Methods Mol Biology Clifton N J*. 2006;333:401–24.
120. Plissonnier D, Nochy D, Poncet P, Mandet C, Hinglais N, Bariety J, et al. Sequential immunological targeting of chronic experimental arterial allograft. *Transplantation*. 1995;60(5):414–24.
121. Plissonnier D, Amichot G, Lecagneux J, Duriez M, Gentric D, Michel JB. Additive and synergistic effects of a low-molecular-weight, heparin-like molecule and low doses of cyclosporin in preventing arterial graft rejection in rats. *Arteriosclerosis Thrombosis J Vasc Biology*. 1993;13(1):112–9.
122. Bieber CP, Stinson EB, Shumway NE, Payne R, Kosek J. Cardiac Transplantation in Man. *Circulation*. 1970;41(5):753–72.
123. Hayry P, Isoniemi H, Yilmaz S, Mennander A, Lemstrom K, Raisanen-Sokolowski A, et al. Chronic Allograft Rejection. *Immunol Rev*. 1993;134(1):33–81.
124. Motomura N, Imakita M, Yutani C, Takamoto S, Kitoh Y, Tusji T, et al. Histologic Modification by Cryopreservation in Rat Aortic Allografts. *Ann Thorac Surg*. 1995 Aug 1;60 (2 Suppl)(2 Suppl):S168-71.
125. Motomura N, Imakita M, Yutani C, Kitoh Y, Kawashima Y, Oka T. Histological change in cryopreserved rat allograft. *J Cardiovasc Surg*. 1995 Feb 1;36(1)(1):53–60.
126. Allaire E, Guettier C, Bruneval P, Plissonnier D, Michel J-B. Cell-free arterial grafts: Morphologic characteristics of aortic isografts, allografts, and xenografts in rats. *J Vasc Surg*. 1994;19(3):446–56.
127. Nataf P, Guettier C, Bourbon A, Nappi F, Lima L, Dorent R, et al. Influence of arterial allograft preparation techniques on chronic vascular rejection: a histological study. *Transplant P*. 1996;28(5):2890–2.
128. Werb Z, Banda MJ, Jones PA. Degradation of connective tissue matrices by macrophages. I. Proteolysis of elastin, glycoproteins, and collagen by proteinases isolated from macrophages. *J Exp Medicine*. 1980;152(5):1340–57.

129. Yanagi H, Sasaguri Y, Sugama K, Morimatsu M, Nagase H. Production of tissue collagenase (matrix metalloproteinase 1) by human aortic smooth muscle cells in response to platelet-derived growth factor. *Atherosclerosis*. 1991;91(3):207–16.
130. Sperti G, Leeuwen RT van, Quax PH, Maseri A, Kluft C. Cultured rat aortic vascular smooth muscle cells digest naturally produced extracellular matrix. Involvement of plasminogen-dependent and plasminogen-independent pathways. *Circ Res*. 1992;71(2):385–92.
131. Mennander A, Tiisala S, Halttunen J, Yilmaz S, Paavonen T, Häyry P. Chronic rejection in rat aortic allografts. An experimental model for transplant arteriosclerosis. *Arteriosclerosis Thrombosis J Vasc Biology*. 1991;11(3):671–80.
132. Schmitz-Rixen T, Megerman J, Colvin RB, Williams AM, Abbott WM. Immunosuppressive treatment of aortic allografts. *J Vasc Surg*. 1988;7(1):82–92.
133. Pober JS, Collins T, Gimbrone MA, Libby P, Reiss CS. Inducible expression of class II major histocompatibility complex antigens and the immunogenicity of vascular endothelium. *Transplantation*. 1986;41(2):141–6.
134. Michiels C. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol*. 2003;196(3):430–43.
135. Hirschberg H, Evensen SA, Henriksen T, Thorsby E. The human mixed lymphocyte-endothelium culture interaction. *Transplantation*. 1975;19(6):495–504.
136. Moraes JR, Stastny P. A New Antigen System Expressed in Human Endothelial Cells. *J Clin Invest*. 1977;60(2):449–54.
137. Claas FH, Paul LC, Es LA van, Rood JJ van. Antibodies against donor antigens on endothelial cells and monocytes in eluates of rejected kidney allografts. *Tissue Antigens*. 1980;15(1):19–24.
138. Neves JP, Gulbenkian S, Ramos T, Martins AP, Caldas MC, Mascarenhas R, et al. Mechanisms underlying degeneration of cryopreserved vascular homografts. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1997;113(6):1014–21.
139. Lupinetti FM, Tsai TT, Kneebone JM, Bove EL. Effect of cryopreservation on the presence of endothelial cells on human valve allografts. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1993;106(5):912–7.
140. Yankah AC, Wottge H-U, Muller-Hermelink HK, Feller AC, Lange P, Wessel U, et al. Transplantation of Aortic and Pulmonary Allografts, Enhanced Viability of Endothelial Cells by Cryopreservation, Importance of Histocompatibility. *J Cardiac Surg*. 1987;2(1S):209–20.
141. Salomon RN, Hughes CC, Schoen FJ, Payne DD, Pober JS, Libby P. Human coronary transplantation-associated arteriosclerosis. Evidence for a chronic immune reaction to activated graft endothelial cells. *Am J Pathology*. 1991;138(4):791–8.

142. Foegh ML. Chronic rejection--graft arteriosclerosis. *Transplant P.* 1990;22(1):119–22.
143. Munro JM, Cotran RS. The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation. *Laboratory Investigation J Technical Methods Pathology.* 1988;58(3):249–61.
144. Rahmani M, Cruz RP, Granville DJ, McManus BM. Allograft Vasculopathy Versus Atherosclerosis. *Circ Res.* 2006;99(8):801–15.
145. Torres HJ, Merello L, Ramos SA, Aninat MA, Becerra LE, Mora AD, et al. Prevalence of cardiac allograft vasculopathy assessed with coronary angiography versus coronary vascular ultrasound and virtual histology. *Transplant P.* 2011;43(6):2318–21.
146. Ramzy D, Rao V, Brahm J, Miriuka S, Delgado D, Ross HJ. Cardiac allograft vasculopathy: a review. *Can J Surg J Can De Chir.* 2005;48(4):319–27.
147. Klabunde R. *Cardiovascular physiology concepts.* Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
148. Fukuda D, Aikawa M. Intimal Smooth Muscle Cells. *Circulation.* 2010;122(20):2005–8.
149. Libby P, Tanaka H. The pathogenesis of coronary arteriosclerosis (“chronic rejection”) in transplanted hearts. *Clin Transplant.* 1994;8(3 Pt 2):313–8.
150. Libby P, Salomon RN, Payne DD, Schoen FJ, Pober JS. Functions of vascular wall cells related to development of transplantation-associated coronary arteriosclerosis. *Transplant P.* 1989;21(4):3677–84.
151. Hillebrands J-L, Klatter FA, Hurk BMH van den, Popa ER, Nieuwenhuis P, Rozing J. Origin of neointimal endothelium and α -actin–positive smooth muscle cells in transplant arteriosclerosis. *J Clin Invest.* 2001;107(11):1411–22.
152. Li J, Han X, Jiang J, Zhong R, Williams GM, Pickering JG, et al. Vascular Smooth Muscle Cells of Recipient Origin Mediate Intimal Expansion after Aortic Allograft Transplantation in Mice. *Am J Pathology.* 2001;158(6):1943–7.
153. George J, Afek A, Abashidze A, Shmilovich H, Deutsch V, Kopolovich J, et al. Transfer of Endothelial Progenitor and Bone Marrow Cells Influences Atherosclerotic Plaque Size and Composition in Apolipoprotein E Knockout Mice. *Arteriosclerosis Thrombosis Vasc Biology.* 2005;25(12):2636–41.
154. Shimizu K, Sugiyama S, Aikawa M, Fukumoto Y, Rabkin E, Libby P, et al. Host bone-marrow cells are a source of donor intimal smooth-muscle-like cells in murine aortic transplant arteriopathy. *Nat Med.* 2001;7(6):738–41.
155. Atkinson C, Horsley J, Rhind-Tutt S, Charman S, Phillpotts CJ, Wallwork J, et al. Neointimal smooth muscle cells in human cardiac allograft coronary artery vasculopathy are of donor origin. *J Hear Lung Transplant.* 2004;23(4):427–35.

156. Hruban RH, Long PP, Perlman EJ, Hutchins GM, Baumgartner WA, Baughman KL, et al. Fluorescence in situ hybridization for the Y-chromosome can be used to detect cells of recipient origin in allografted hearts following cardiac transplantation. *Am J Pathology*. 1993;142(4):975–80.
157. Hu Y, Davison F, Ludewig B, Erdel M, Mayr M, Url M, et al. Smooth Muscle Cells in Transplant Atherosclerotic Lesions Are Originated From Recipients, but Not Bone Marrow Progenitor Cells. *Circulation*. 2002;106(14):1834–9.
158. Scheidt W von, Erdmann E. Dilated angiopathy: a specific subtype of allograft coronary artery disease. *J Hear Lung Transplant Official Publ Int Soc Hear Transplant*. 1991;10(5 Pt 1):698–703.
159. Spes CH, Mudra H, Schnaack SD, Rieber J, Reichle F, Krüger TM, et al. 936-87 Serial Dobutamine Stress Echocardiography for Detection of Cardiac Allograft Vasculopathy. *J Am Coll Cardiol*. 1995;25(2):157A.
160. Christie JD, Edwards LB, Aurora P, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-sixth Official Adult Lung and Heart-Lung Transplantation Report—2009. *J Hear Lung Transplant*. 2009;28(10):1031–49.
161. Coma-Canella I, Maceira A, Dorronsoro ID, Calabuig J, Martínez A. Cambios de diámetro de las arterias coronarias en receptores de trasplante cardíaco con vasos angiográficamente normales durante cinco años. *Revista Española De Cardiol*. 1999;52(7):485–92.
162. Isik FF, McDonald TO, Ferguson M, Yamanaka E, Gordon D. Transplant arteriosclerosis in a rat aortic model. *Am J Pathology*. 1992;141(5):1139–49.
163. Plissonnier D, Levy BI, Salzmann JL, Nochy D, Watelet J, Michel JB. Allograft-induced arterial wall injury and response in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Arteriosclerosis Thrombosis J Vasc Biology*. 1991;11(6):1690–9.
164. Chong AS, Alegre M-L, Miller ML, Fairchild RL. Lessons and limits of mouse models. *Csh Perspect Med*. 2013;3(12):a015495.
165. Reichenbach DK, Li Q, Hoffman RA, Williams AL, Shlomchik WD, Rothstein DM, et al. Allograft outcomes in outbred mice. *Am J Transplant Official J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2013;13(3):580–8.
166. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis Official J Am Hear Assoc Inc*. 1986;6(2):131–8.
167. Mitchell RN, Libby P. Vascular Remodeling in Transplant Vasculopathy. *Circ Res*. 2007;100(7):967–78.

168. Schneider M, Stamm C, Brockbank KGM, Stock UA, Seifert M. The choice of cryopreservation method affects immune compatibility of human cardiovascular matrices. *Sci Rep-uk*. 2017;7(1):17027.
169. O'Brien MF, Stafford EG, Gardner MA, Pohlner PG, Tesar PJ, Cochrane AD, et al. Allograft aortic valve replacement: long-term follow-up. *Ann Thorac Surg*. 1995;60(2 Suppl):S65-70.
170. Flesch BK, Entenmann H, Milde K, Bretzel RG, Federlin K. Islet transplantation in experimental diabetes of the rat. XIII. Cryopreservation reduces MHC class II but not class I antigens of rat pancreatic islets. *Hormone Metabolic Res Hormon- Und Stoffwechselforschung Hormones Et Métabolisme*. 1991;23(1):1-6.
171. Moriyama S, Utoh J, Sun L-B, Tagami H, Okamoto K, Kunitomo R, et al. Antigenicity of Cryopreserved Arterial Allografts: Comparison with Fresh and Glutaraldehyde Treated Grafts. *Asaio J*. 2001;47(3):202-5.
172. Brockbank KGM, Donovan TJ, Ruby ST, Carpenter JF, Hagen P-O, Woodley MA. Functional analysis of cryopreserved veins Preliminary report. *J Vasc Surg*. 1990;11(1):94-102.
173. Khatib H el, Lupinetti FM. Antigenicity of fresh and cryopreserved rat valve allografts. *Transplantation*. 1990;49(4):765-7.
174. Solanes N, Rigol M, Khabiri E, Castellà M, Ramírez J, Roqué M, et al. Effects of cryopreservation on the immunogenicity of porcine arterial allografts in early stages of transplant vasculopathy. *Cryobiology*. 2005;51(2):130-41.
175. Solanes N, Rigol M, Castellà M, Khabiri E, Ramírez J, Segalés J, et al. Cryopreservation alters antigenicity of allografts in a porcine model of transplant vasculopathy. *Transplant P*. 2004;36(10):3288-94.
176. Fahner PJ, Idu MM, Gulik TM van, Legemate DA. Systematic review of preservation methods and clinical outcome of infrainguinal vascular allografts. *J Vasc Surg*. 2006;44(3):518-24.
177. Brockbank KG, McNally RT, Walsh KA. Cryopreserved vein transplantation. *J Cardiac Surg*. 1992;7(2):170-6.
178. Martin RS, Edwards WH, Mulherin JL, Edwards WH, Jenkins JM, Hoff SJ. Cryopreserved saphenous vein allografts for below-knee lower extremity revascularization. *Ann Surg*. 1994;219(6):664-70; discussion 670-2.
179. Carpenter JP, Tomaszewski JE. Immunosuppression for human saphenous vein allograft bypass surgery: a prospective randomized trial. *J Vasc Surg*. 1997;26(1):32-42.
180. Farber A, Major K, Wagner WH, Cohen JL, Cossman DV, Lauterbach SR, et al. Cryopreserved saphenous vein allografts in infrainguinal revascularization: analysis of 240 grafts. *J Vasc Surg*. 2003;38(1):15-21.

181. Branchereau A, Albertini J, Magnan P, Barral X, Favre J, Guidicelli H. Arterial allografts as a conduit for surgical reconstruction. *Crit Ischemia*. 2000;10:71–5.
182. Dortland RW van R, Leeuwen MS van, Steijling JJ, Theodorides T, Vroonhoven TJ van. Long-term results with vein homograft in femoro-distal arterial reconstructions. *Eur J Vascular Surg*. 1991;5(5):557–64.
183. Rebane E, Tikko H, Tunder E, Lepner U, Helberg A, Pulges A, et al. Venous allografts for infrainguinal vascular bypass. *Cardiovasc Surg Lond Engl*. 1997;5(1):21–5.
184. Leersnijder DD, Willocx P, Marck EV, Vanmaele R. Venous homografts in infrainguinal procedures: an eight years experience. *J Cardiovasc Surg*. 1992;33(6):633–40.
185. Simeon J, Serrano M, Miralles A, Riera S, Hernandez E, Cairols M, et al. Homoinjertos arteriales criopreservados: experiencia clínica durante tres años. *Angiología*. 1998;50(5):215–22.
186. Arnaud F. Endothelial and Smooth Muscle Changes of the Thoracic and Abdominal Aorta with Various Types of Cryopreservation. *J Surg Res*. 2000;89(2):147–54.
187. Anidjar S, Dobrin PB, Eichorst M, Graham GP, Chejfec G. Correlation of inflammatory infiltrate with the enlargement of experimental aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 1992;16(2):139–47.
188. Anidjar S, Salzman JL, Gentric D, Lagneau P, Camilleri JP, Michel JB. Elastase-induced experimental aneurysms in rats. *Circulation*. 1990;82(3):973–81.
189. Janoff A. Elastases and emphysema. Current assessment of the protease-antiprotease hypothesis. *Am Rev Respir Dis*. 1985;132(2):417–33.
190. Association WM. World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical principles for medical research involving human subjects. *B World Health Organ*. 2001;79(4):373–4.
191. Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales. Publicada en «BOE» núm. 294, de 6 de diciembre de 2018, páginas 119788 a 119857. Sección: I. Disposiciones generales. n.d.
192. Hospital Universitario Central de Asturias (Gerencia Área IV de Salud. SESPA). Memoria anual 2018. Oviedo. Disponible online en: <http://www.hca.es/huca/web/listado5/listado5.asp>. n.d.
193. Rutherford RB, Baker JD, Ernst C, Johnston KW, Porter JM, Ahn S, et al. Recommended standards for reports dealing with lower extremity ischemia: Revised version. *J Vasc Surg*. 1997;26(3):517–38.

194. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FGR, et al. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg.* 2007;45(1):S5–67.
195. Davies MG. Critical limb ischemia: epidemiology. *Methodist DeBakey Cardiovasc J.* 2012;8(4):10–4.
196. Farber A, Eberhardt RT. The Current State of Critical Limb Ischemia: A Systematic Review. *Jama Surg.* 2016;151(11):1070.
197. Becker F, Robert-Ebadi H, Ricco J-B, Setacci C, Cao P, Donato G de, et al. Chapter I: Definitions, epidemiology, clinical presentation and prognosis. *European J Vasc Endovascular Surg Official J European Soc Vasc Surg.* 2011;42 Suppl 2:S4-12.
198. Zhan LX, Branco BC, Armstrong DG, Mills JL. The Society for Vascular Surgery lower extremity threatened limb classification system based on Wound, Ischemia, and foot Infection (WIFI) correlates with risk of major amputation and time to wound healing. *J Vasc Surg.* 2015;61(4):939–44.
199. Aracil-Sanus E, Vila-Col R, de Benito L, Miralles-Hernández M. Guía básica del seguimiento no invasivo de la cirugía arterial. *Angiología* 2001;53(2): 89-110. n.d.;
200. Dunlop P, Sayers RD, Naylor AR, Bell PRF, London NJM. The effect of a surveillance programme on the patency of synthetic infrainguinal bypass grafts. *Eur J Vasc Endovasc.* 1996;11(4):441–5.
201. Lalak NJ, Hanel KC, Hunt J, Morgan A. Duplex scan surveillance of infrainguinal prosthetic bypass grafts. *J Vasc Surg.* 1994;20(4):637–41.
202. Boulland LML, Naper C, Skauby MH. Presensitization revisited: pitfalls of vascular allografts in transplant candidates. *Clin Kidney J.* 2014;7(1):65–7.
203. Garrouste C, Rosset E, Quainon F, Aniort J, Heng AE. Alloimmunization After Cryopreserved Arterial Allografts in a Patient on a Kidney Transplantation Waiting List. *Transplantation.* 2017;101(7):e225–7.
204. Benedetto B, Lipkowitz G, Madden R, Kurbanov A, Hull D, Miller M, et al. Use of cryopreserved cadaveric vein allograft for hemodialysis access precludes kidney transplantation because of allosensitization. *J Vasc Surg.* 2001;34(1):139–42.
205. Matsuda Y, Sarwal MM. Unraveling the Role of Allo-Antibodies and Transplant Injury. *Front Immunol.* 2016;7:432.

