

Injertos vasculares biológicos para microcirugía

Luis Padilla, Alberto Chousleb, Mauricio Di Silvio, Fernando Viniegra, Annette R. Shultze, Rodolfo Sánchez, Lorena Ornelas, Guillermo Rocha y Jorge Galicia, Facultad de Medicina, UNAM., Hospital Regional 20 de Noviembre ISSSTE.

Resumen

En este estudio se revisó el comportamiento de la arteria umbilical humana (AUH), tratada con glutaraldehído, en un calibre de 1.5 mm de diámetro, substituyendo un segmento de 20 mm de longitud de la aorta abdominal de la rata.

Se utilizaron 48 ratas Wistar machos de 250 a 300 g de peso, las cuales fueron divididas en cuatro grupos. Fueron sacrificadas a diferentes intervalos de tiempo, entre los 12 a 315 días. En el Grupo I (AUH lisa) se observó una permeabilidad del 75%. En el grupo II (AUH corrugada) se obtuvo una permeabilidad del 50%. En el grupo III (AUH lisa + glutaraldehído) se encontró una permeabilidad del 75%. Finalmente, en el grupo IV (AUH corrugada + glutaraldehído) se observó una permeabilidad del 66.6%.

Aunque la permeabilidad del Grupo III es del 75%, las dilataciones aneurismáticas y calcificaciones importantes (25% y 41.6%, respectivamente) que se presentaron no permiten recomendar este tipo de microinjertos para substituir segmentos vasculares en el ser humano.

Summary

Human umbilical arteries (HUA) were prepared as vascular micrografts for implantation in the abdominal aorta of the rat. Substitutions were made with 20 mm long micrografts with a 1.5 mm internal diameter. The present study was focused on the fate of HUA treated with glutaraldehyde.

Forty-eight male Wistar rats weighing 250-300 g were used in this study. They were divided in four groups and sacrificed at different time intervals, ranging from 12 to 315 days. In group I (smooth HUA), 75% of the micrografts were found patent at removal time. In group II (corrugated HUA), a patency rate of 50% was obtained. In group III (smooth HUA + glutaraldehyde), 75% of the implants were found to be patent. Finally, in group IV (corrugated HUA + glutaraldehyde), a 66.6% of patent micrografts was observed.

Even though the results in this study show a patency rate of 75% for group III, we do not recommend its use as a vascular substitute in humans due to high rate of aneurysm formation and calcification.

Introducción

En microcirugía vascular clínica se necesita un microsubstituto vascular arterial y venoso. El microinjerto vascular ideal es la vena autóloga tomada del dorso del pie o de la región antecubital. Sin embargo el microcirujano debe disponer en forma rápida de un microinjerto o microprótesis de 1 y 2 mm de diámetro que pueda ser cortado en longitudes variables y que ofrezca fácil manejo y buena permeabilidad.¹

En el cuadro 1 se enlistan las características que pensamos debe tener el microsubstituto vascular ideal.

Nuestro grupo viene trabajando en el laboratorio desde el año de 1978 en la búsqueda de un microsubstituto vascular que represente una alternativa a la vena autóloga.^{3 4 11 12 13 14 15}

Cuadro I

Características del Microsubstituto Ideal

- 1.- De 1 a 2 mm de diámetro interno
- 2.- Longitud de 5 a 10 cm
- 3.- Biológico o sintético
- 4.- Pared delgada
- 5.- Elástico y distensible
- 6.- De fácil manejo microquirúrgico
- 7.- Biológicamente inerte
- 8.- No carcinógeno
- 9.- Capa interna electronegativa
- 10.- Económico

Padilla 1988.

En el presente estudio, trabajamos con arteria umbilical

humana (AUH) tratada químicamente para disminuir su antigenicidad además de proponer un método original de corrugado para proporcionar al microinjerto mayores ventajas.

Material y método

En este estudio se revisó el comportamiento de la AUH de un calibre de 1.5 mm de diámetro, substituyendo un segmento de 1.5 a 2 mm de longitud de la aorta abdominal de la rata.

Se utilizaron 48 ratas Wistar macho con peso entre 250 y 300 g distribuidas en los siguientes grupos:

- Grupo I: 12 ratas con microinjerto de AUH lisa.
- Grupo II: 12 ratas con microinjerto de AUH corrugada.
- Grupo III: 12 ratas con microinjerto de AUH lisa, tratada con glutaraldehído.
- Grupo IV: 12 ratas con microinjerto de AUH corrugada, tratada con glutaraldehído.

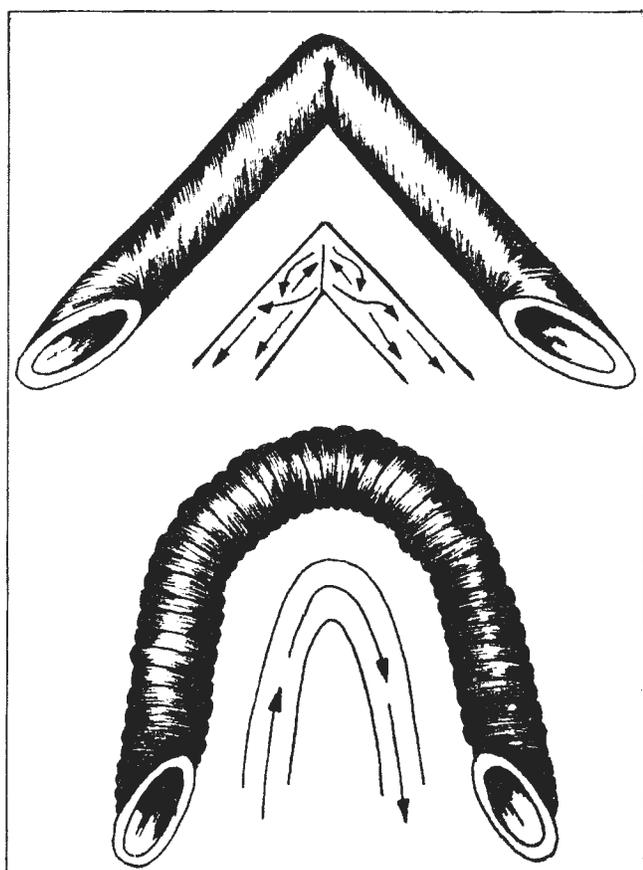


Fig. 1. Método de corrugado: Al aplicar el sistema de corrugado a la microbioprótesis se consigue evitar el acodamiento en las zonas de flexión. De esta forma el flujo sanguíneo a través del injerto es de tipo laminar sin turbulencias.

Todos los injertos fueron conservados en solución de etanol al 40% más óxido de propileno al 1%.

La idea de corrugar los microinjertos (Fig. 1) fue para evitar el acodamiento en las zonas de flexión y aumentar la distensibilidad o "compliance" (% de cambio en el radio del injerto por mmHg x 10⁻²) y con esto mejorar la permeabilidad a largo plazo (Fig. 2).

COMPORTAMIENTO DE UN INJERTO EN EL SISTEMA ARTERIAL DURANTE LA DIASTOLE

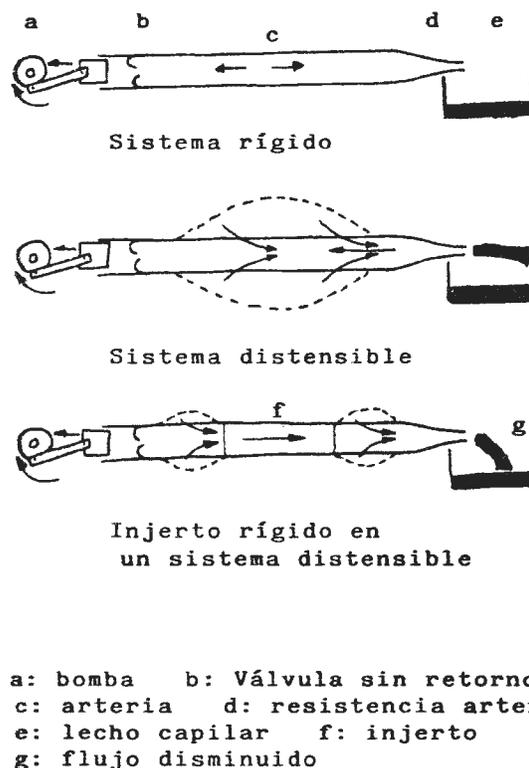


Fig. 2. A través de un sistema de tubos con un pistón se puede impulsar más flujo cuando las paredes de estos son distensibles.

Técnica de preparación de microinjertos

Durante el parto, el recolector recibe el cordón umbilical en un recipiente tipo riñón con técnica estéril. Se retira la sangre por medio de "ordeñamiento" y se coloca el cordón en un frasco que contiene solución salina, heparina y una mezcla de tres antibióticos (nistatina, netilmicina y vancomicina) y se trasladan al laboratorio a 4°C.

En el laboratorio se disecan y ferulan las arterias en segmentos de 10 cm, con varillas de vidrio de 1.5 mm de

diámetro. Las arterias de los grupos II y IV se corrugan, dejando lisas las de los grupos I y III.

Se utilizaron dos métodos para preparar los microinjertos. El primero, que incluyó a los grupos I y II, consistió en colocarlos en una solución conservadora de etanol al 40% y óxido de propileno al 1%. Por otro lado, con el fin de reducir la antigenicidad, los injertos de los grupos III y IV fueron tratados con una solución de glutaraldehído al 2.5%, con un pH de 7.4, durante 72 hrs. y a una temperatura de 4° C, para posteriormente ser colocados en la solución de etanol al 40% y óxido de propileno al 1%, como conservador.

Técnica quirúrgica

Todos los animales fueron anestesiados con éter, y con técnica limpia, aunque no estéril, se practicó una incisión media supra e infraumbilical, penetrando a cavidad abdominal por la línea blanca. Se exteriorizaron las asas intestinales hacia la izquierda, localizando y disecando la aorta abdominal, por debajo de las arterias renales. Una vez aislada la arteria, se colocó una micropinza de 30 g de presión, con mecanismo de aproximación, para reseca un segmento de 1.5 a 2 cm de aorta, el cual fue substituido por un microinjerto de AUH.

El microinjerto, previo a ser implantado, fue irrigado durante 15 min con solución salina para eliminar el etanol y el óxido de propileno. A continuación fue sumergido durante el mismo lapso de tiempo en solución con heparina (1000 U/ml). No se utilizó heparinización sistémica en los animales.

Las anastomosis vasculares proximal y distal se practicaron con técnica de puntos simples separados, utilizando nylon 9-0 con aguja BV-130-5 (Ethilon, Johnson & Johnson) y un microscopio de operaciones OPMI-1 (Carl Zeiss de México) a 10X como sistema de magnificación (Fig. 3).

Al confirmar la permeabilidad del microinjerto y aorta distal, se practicó el cierre de la pared abdominal en forma convencional. Los injertos con error técnico detectado en el postoperatorio inmediato fueron descartados del estudio.

Evaluación postoperatoria

Las ratas fueron sacrificadas a diferentes intervalos de tiempo, entre 12 y 315 días. Al extraer la pieza se analizaron con el microscopio de operaciones los detalles relacionados con trombos, aneurismas, calcificaciones y

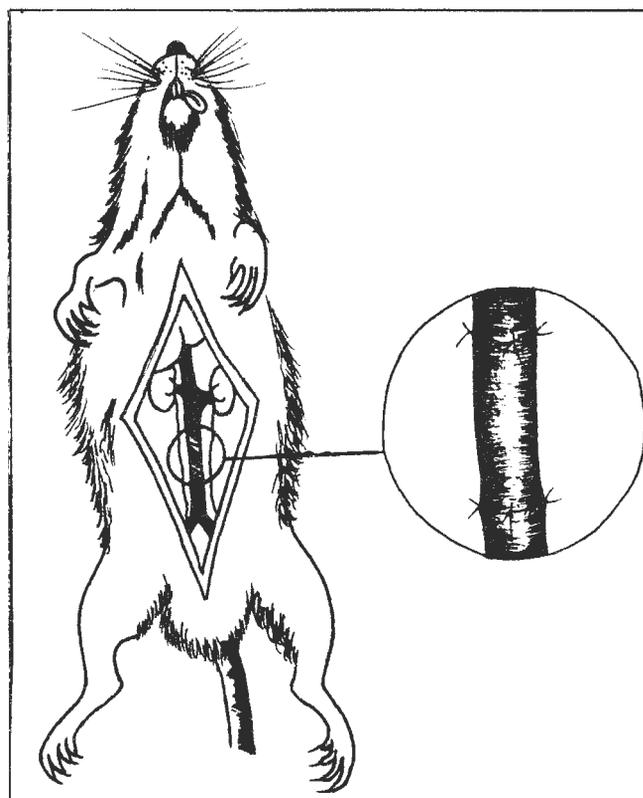


Fig. 3. Mediante una laparotomía media se visualiza la aorta, disecándola y refiriéndola, para después de reseca un segmento de aproximadamente 2 cm se le coloque un microinjerto utilizando nylon 10-0 con puntos separados.

neoendotelio, practicando a continuación una fotomicrografía y dibujo de la misma.

Resultados

„En las figuras 4 y 5, y en el cuadro 2 se muestran los resultados de permeabilidad, dilataciones aneurismáticas y calcificaciones, tomando en cuenta la presencia o no del fenómeno.

Para realizar un análisis estadístico más completo se le otorgó un valor numérico por grados a cada una de las variables en estudio como se presenta a continuación (Fig. 6).

Días de seguimiento

El período de observación en cada uno de los grupos de estudio varió de la siguiente manera:

Grupo I: 12 a 306 días (\bar{x} = 131.3d)

Grupo II: 15 a 315 días (\bar{x} = 133.5d)

Grupo III: 14 a 308 días (\bar{x} = 133.6d)

Grupo IV: 15 a 305 días (\bar{x} = 132.5d)

FIGURA 4 RESULTADOS DE PERMEABILIDAD

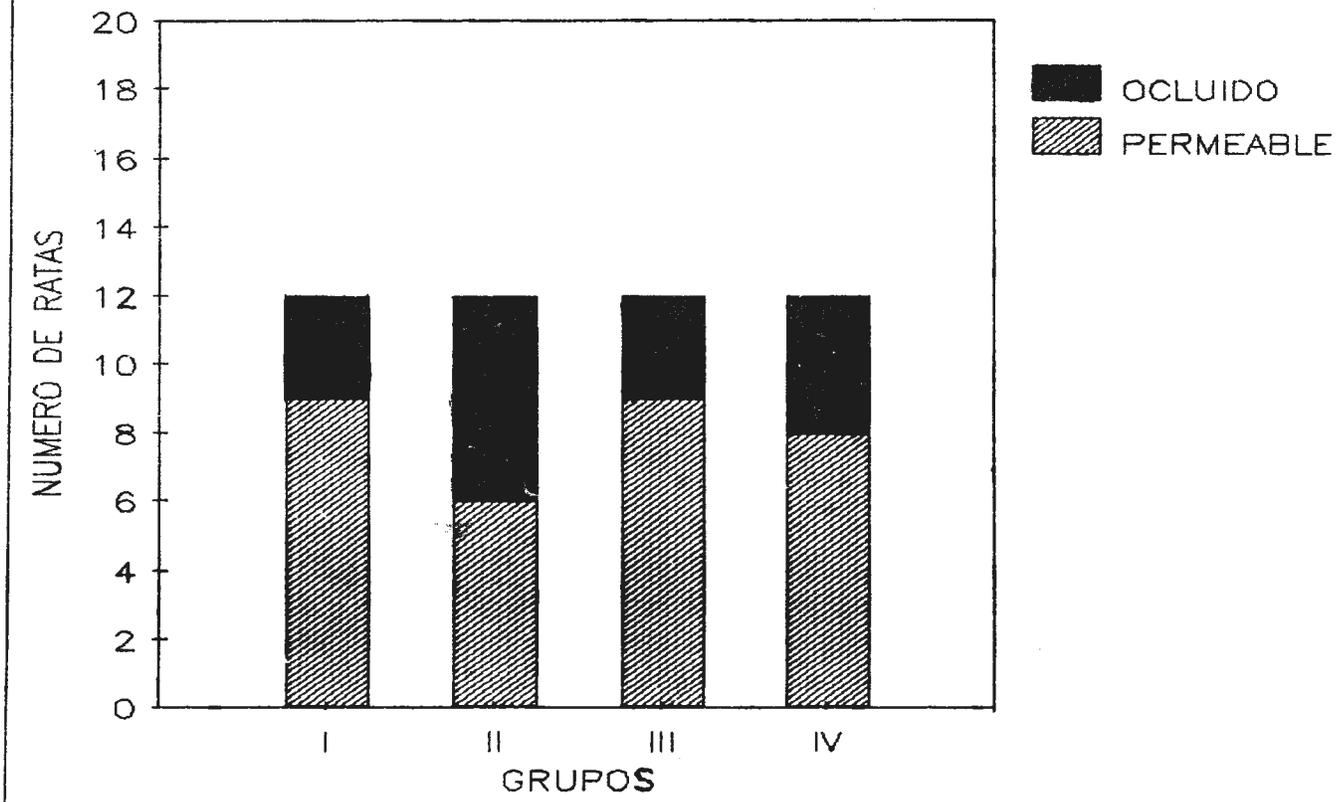


Fig. 4. Resultados comparativos de permeabilidad entre los cuatro grupos en estudio.

Se aplicó la prueba H de Kruskal-Wallis (Fig. 7) con el fin de determinar la relación existente entre cada uno de los grupos de estudio con los restantes. Para esta variable se obtuvo un valor de 0, lo cual implica que no existe diferencia significativa entre los cuatro grupos en cuanto a días de seguimiento.

Permeabilidad

Esta variable se analizó asignando valores a los diferentes grados de permeabilidad en los microinjertos (Fig. 6).

Los grupos I y III presentaron una permeabilidad del 75%, el grupo IV del 66.6%, y el grupo II del 50%, sin embargo, aplicando la prueba H de Kruskal-Wallis, se obtuvo un valor de 2.61, lo cual manifiesta que tampoco existe una diferencia significativa entre los cuatro grupos para esta variable.

Aneurismas

La mayor frecuencia de formación de aneurismas se observó en el grupo II, en 66.6% de los microinjertos. En orden decreciente se observaron aneurismas en los grupos I, III y IV con frecuencias del 50%, 25% y 25%, respectivamente.

Nuevamente, con base en los valores asignados para grados de formación de aneurismas (Fig 6), se aplicó la prueba H de Kruskal-Wallis con lo que se obtuvo un valor de 5.40, lo cual manifiesta que tampoco existe una diferencia significativa entre los cuatro grupos para esta variable.

Calcificaciones

En el grupo I se observó un 58.3% de calcificación. Los

FIGURA 5 RESULTADOS DE ANEURISMAS Y CALCIFICACIONES

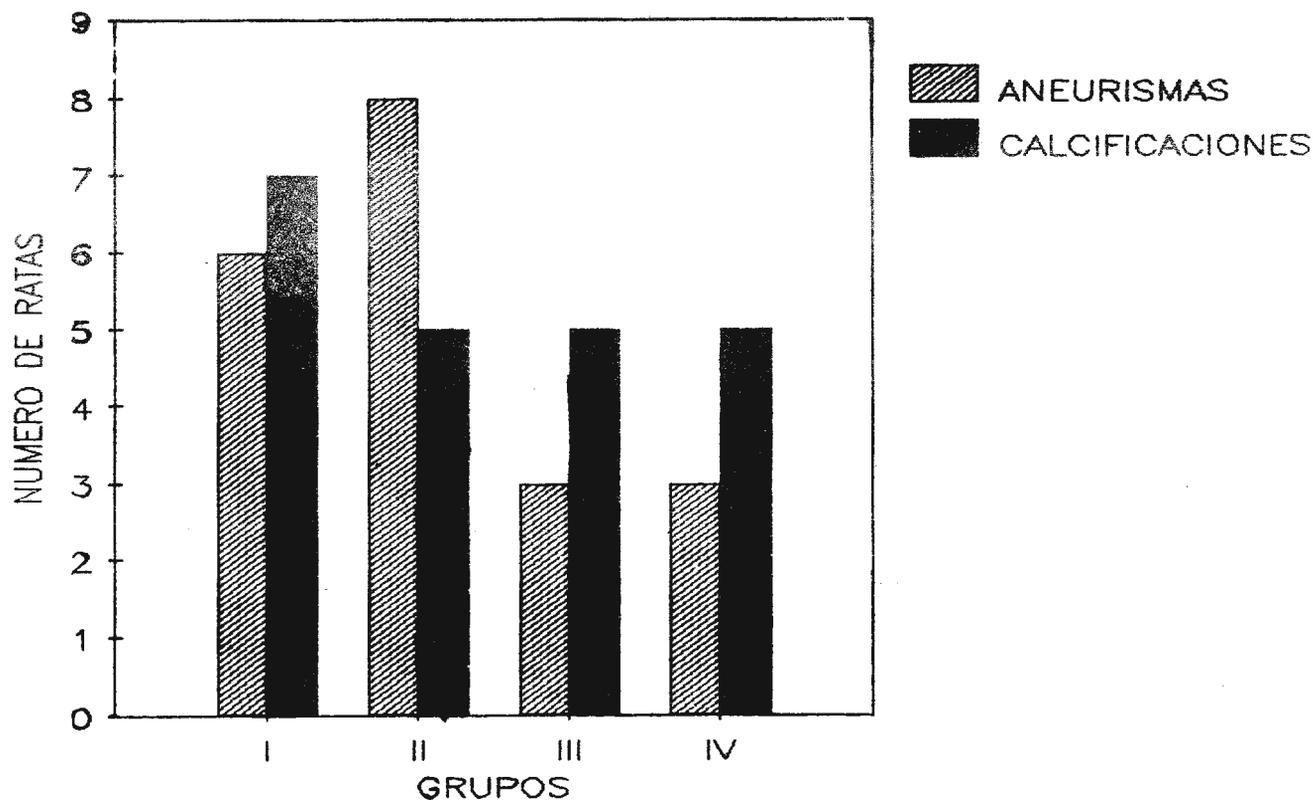


Fig. 5. Resultados comparativos de aneurismas y calcificaciones entre los cuatro grupos en estudio.

Cuadro II

Tipo de microinjerto	Número de ratas	Permeabilidad	Aneurisma	Calcificaciones	Seguimiento en días	Media en días
Grupo I AUH lisa con etanol oxido propileno	12	9/12 (75%)	6/12 (50%)	7/12 (58.3%)	12, 15, 55, 60, 90, 92 115, 120, 204, 207, 300, 306	131.3
Grupo II AUH corrugada con etanol oxido propileno	12	6/12 (50%)	8/12 (66.6%)	5/12 (41.6%)	15, 17, 59, 60, 90, 93 120, 125, 200, 208, 300, 315	133.5
Grupo III AUH lisa con glutaraldehído	12	9/12 (75%)	3/12 (25%)	5/12 (41.6%)	14, 15, 60, 62, 90, 92 123, 125, 200, 209, 306, 308	133.6
Grupo IV AUH corrugada con glutaraldehído	12	8/12 (66.6%)	3/12 (25%)	5/12 (41.6%)	15, 16, 60, 62, 92, 92, 122, 123, 200, 204, 300, 305	132.5

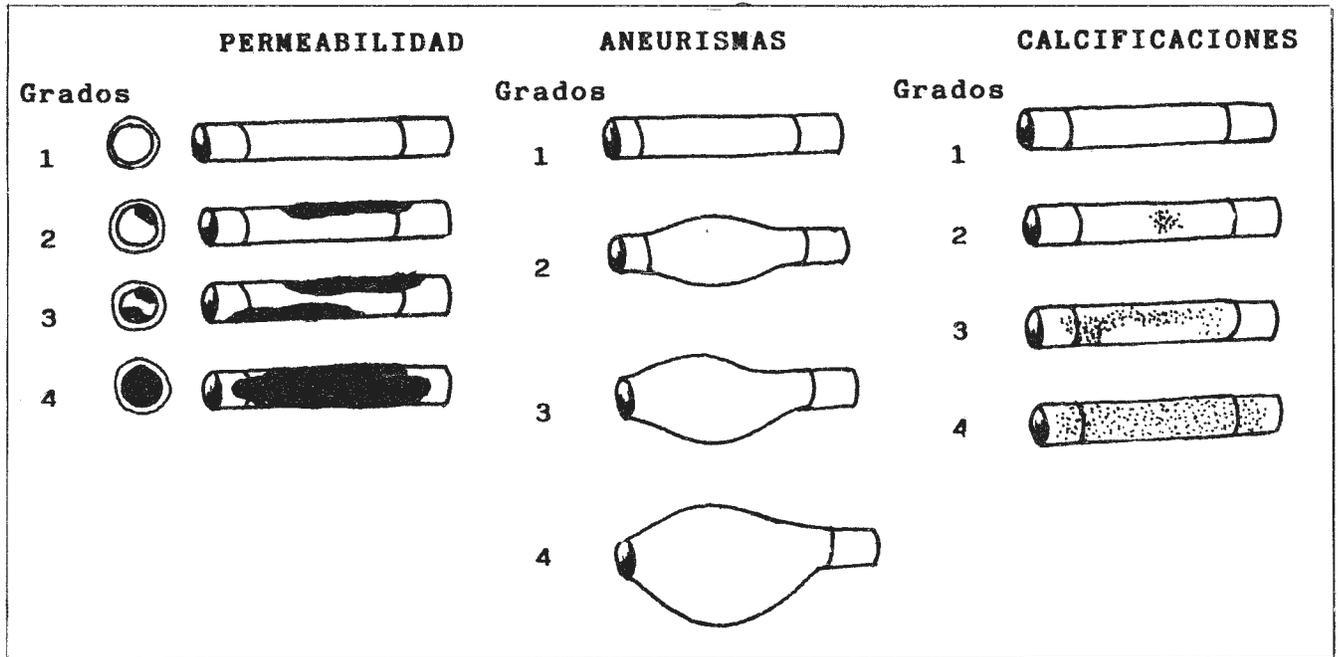


Fig. 6. Evaluación de los fenómenos encontrados en los microinjertos. Al otorgar una calificación numérica a cada uno de los diferentes fenómenos encontrados en los microinjertos se pudo realizar una evaluación más objetiva.

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{i=1}^K \frac{R_i^2}{n_i} - 3(N+1)$$

Fig. 7. Prueba H de Kruskal Wallis.

otros tres grupos se comportaron en forma similar, todos con 41.6% de frecuencia.

Con la prueba H de Kruskal-Wallis se obtuvo un valor de 0.23, nuevamente sin diferencia estadística significativa entre los grupos estudiados.

Coefficiente de correlación de Spearman

Con este modelo de regresión lineal simple se compararon los resultados obtenidos para cada una de las variables y su relación con el tiempo. Los resultados mostraron una dependencia positiva entre el tiempo y la permeabilidad, en el grupo II (a mayor tiempo, mayor número de injertos ocluidos). En relación a la aparición de calcificaciones, se obtuvo la misma correlación en los grupos I y III (a mayor tiempo, mayor número de injertos

calcificados). Por último, con respecto a los aneurismas, esta dependencia se encontró únicamente en el grupo III. Todos los resultados fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

Prueba de independencia (Chi cuadrada)

Se investigó la asociación entre los fenómenos obtenidos en los microinjertos (trombosis, calcificaciones y aneurismas) y el tipo de preparación de los mismos. En este estudio los resultados indican que el deterioro de las bioprótesis no tiene relación estadísticamente significativa con la presencia o no de glutaraldehído ($p > 0.05$).

Método de corrugado

Al extraer los microinjertos y evaluar la presencia o ausencia de corrugado, se encontró que, en el grupo II, únicamente 2 lo habían conservado (90 y 92 días). En cambio, en el grupo IV, esta cifra aumentó a 5 (15, 62, 92, 123 y 300). Además, se observó fractura del endotelio en todos los microinjertos tratados de esta manera.

Discusión

En 1978 Mehdorn y Buncke utilizaron, como microbio-prótesis, AUH tratadas con glutaraldehído, colocándos-

las en la arteria carótida del gato y obteniendo una permeabilidad del 46%, en un periodo de 10 días a 8 meses.¹⁰

El glutaraldehído estabiliza con enlaces cruzados la colágena por una unión intermolecular fuerte e irreversible, con lo que previene la degeneración del injerto y enmascara los antígenos evitando el rechazo de la bioprótesis.¹⁶

Otros autores como Perloff,⁵ Yeh¹⁷ y Chevalier² también estudiaron a la AUH como sustituto del sistema arterial de la rata (Cuadro III), donde se pueden apreciar cifras de permeabilidad aceptables como 100%, 70% y 88.9%, respectivamente.

Nuestros resultados (75% de permeabilidad) indican que la AUH es un microinjerto con buena permeabilidad, de fácil manejo, elástico y con baja antigenicidad, pero con poca resistencia de la pared músculo-colágena para evitar dilataciones aneurismáticas.

Mehdorn, Perloff, Yeh y Chevalier utilizaron para sus trabajos experimentales AUH proporcionada por la Compañía Meadox Medicals de los Estados Unidos de Norteamérica; estos microinjertos presentan una malla de poliéster como soporte externo para evitar dilataciones aneurismáticas. Los microinjertos de AUH preparados por nuestro grupo también se fijaron en glutaraldehído, sin embargo, con el fin de obviar la utilización de la malla externa, que dificulta la técnica microquirúrgica e incrementa costos, se decidió tratar de aumentar la resistencia de la pared arterial al dejarle una capa uniforme de gelatina de Wharton. A pesar de esto, en nuestro grupos de estudio obtuvimos 50%, 66.6%, 25% y 25% de formación de aneurismas, respectivamente, mientras que los autores arriba mencionados no describen este fenómeno.

Otros fenómenos experimentales indeseables, que se presentaron en nuestro estudio, fueron la gran cantidad de calcificaciones en la capa media del microinjerto, y la pérdida parcial o total del "corrugado". Además, las

fracturas observadas en el endotelio de los microinjertos tratados con el método de corrugado pudieron haber contribuido a la baja permeabilidad observada en estos dos grupos.

El fenómeno de calcificación se presenta como patología no bien conocida. Levy⁷ encontró en válvulas cardíacas y placas aterosclerosas calcificadas, un aminoácido fijador del calcio y dependiente de la vitamina K llamado ácido gamacarboxiglutámico. Ishihara⁶ confirma la participación de esta sustancia como una proteína capaz de unirse ávidamente al calcio, y menciona como factores de calcificación a la hipoxia, isquemia, insuficiencia renal, aumento de calcio postransfusión, infección, y la corta edad del paciente. En 1985, Levy^{8,9} describe dos estudios en los cuales implantó, en el tejido subcutáneo de ratas, válvulas porcinas tratadas con glutaraldehído y evitó la calcificación al suministrar etanolhidroxidifosfonato.

Chousleb y cols.⁴ describen, en 1986, una permeabilidad del 80% con microbioprótesis de cerdo tratadas con glutaraldehído y colocadas en aorta de la rata hasta por 180 días, mencionando el fenómeno de calcificación de la capa media sólo en algunos casos.

Conclusiones

El microinjerto de AUH es de sencilla preparación en el laboratorio y de fácil manejo microquirúrgico. La variedad lisa tratada con glutaraldehído (grupo III) muestra una permeabilidad del 75% que podría considerarse como buena. Sin embargo, las dilataciones aneurismáticas y calcificaciones que se presentaron no permiten recomendar este tipo de microinjertos para substituir segmentos vasculares en el ser humano.

Por otro lado, este modelo experimental puede utilizarse en la evaluación de sustancias que disminuyan la fijación de calcio en bioprótesis tratadas con glutaraldehído, de forma más fisiológica que el simple implante subcutáneo.

Cuadro III

Año	Autor	Animal	Vaso receptor	Número	Calibre	Longitud	Permeabilidad	Tiempo (días)
1978	Mehdorn Buncke	gato	carótida	76	1.5 - 2 mm	6 - 7 cm	46%	10 días-8 meses
1982	Perloff ⁵	rata	aorta	8	1.5 - 2 mm	---	100%	7-58 días
1984	Yeh ¹⁷	rata	aorta	20	1.5 - 2 mm	10 mm	70%	1 semana-12 meses
1985	Chevalier ²	rata	aorta	30	2 mm	---	88.9%	6 meses
1988	Padilla	rata	aorta	48	1.5 mm	20 mm	75%	15-305 días (media 131.3)

Referencias

1. Alpert B.S., Buncke H.J., Brownstein M. Replacement of damaged arteries and veins with vein grafts when reimplanting crushed, amputated fingers. *Plast. Reconstr. Surg.* 61: 17-22, 1978.
2. Chevalier, J.M., Raimbeau G., Mercier P. Comparative study of three implanted micrografts placed in the abdominal aorta of the rat. *J. Mal. Vasc.* 10: 17-29, 1985.
3. Chousleb, K.A., Figueroa P., Shuchleib Ch. S., Padilla S.L., Sastre O.N., Manzano S.B. Comportamiento de los parches de pericardio de bovino en el sistema arterial de la rata. *Rev. Fac. Med. UNAM.* 29: 341-346, 1986.
4. Chousleb K.A., Hernández B.M.C., Schuchleib Ch.R., Domínguez P.A., Ravaque M.D. y Jarabo G.S. Permeabilidad de bioprótesis arteriales menores de 2 mm de diámetro. *Rev. Fac. Med. UNAM.* 29: 399-404, 1986.
5. Christie B.A., Ketharanathan V., Perloff L. Minute vascular replacements. *Arch. Surg.* 117: 1290-1294, 1982.
6. Ishihara T., Ferrans V.J., Jones M., Cabin H.S., Roberts W.C. Calcific deposits developing in bovine pericardial bioprosthetic valve three days after implantation. *Circulation* 63: 718-723, 1981.
7. Levy R.J., Zenker J.A., Lian J.B. Vitamin K-dependent calcium binding proteins in aortic valve calcification. *J. Clin. Invest.* 65: 563-566, 1980.
8. Levy R.J., Wolfrum J., Schoen F.J., Hawley M.A., Lund S.A., Langer R. Inhibition of calcification of bioprosthetic heart valves by local controlled-release diphosphonate. *Science* 12: 190-192, 1985.
9. Levy R.J., Hawley M.A., Schoen F.J., Lund S.A., Liu P.Y. Inhibition by diphosphonate compounds of calcification of porcine bio-prosthetic heart valve cusps implanted subcutaneously in rats. *Circulation* 71: 349-356, 1985.
10. Medhorn M., Bumcke H.J. Human umbilical artery as a source of small-diameter vascular grafts. *Graft materials in vascular surgery Chicago Year Book M.P.* pp. 297-305, 1978.
11. Padilla S.L., Valle G.A., Sánchez C.R. Trasplante en ratas de arterias bovinas pretratadas con enzimas proteínicas. *Arch. Inst. Cardiol. Mex.* 53: 91-98, 1983.
12. Padilla S.L., Valle G.A., Ceron R.M., Sanchez C.R. Puentes aorticos en el perro con injertos bovinos. *Rev. Cirujano Gral.* 7:276-280, 1983.
13. Padilla S.L., Valle G.A. *Manual de Microcirugía.* México Ed. Salvat pp. 93-95, 1983.
14. Padilla S.L., Sastre O.N., Chousleb, K.A., Di Silvio L.M., Contreras M., Manzano S.B. Polytetrafluoroethylene microprosthesis in the venous system of the rat. *J. Reconstr. Microsurg.* 3: 159-163, 1987.
15. Padilla S.L., Valle G.A., Carrillo L.H., Di Silvio L.M., Contreras M., Viniestra R.F. Polytetrafluoroethylene microprosthesis in the arterial system of the rat. *J. Reconstr. Microsurg.* 4: 33-37, 1987.
16. Thandroyen F.T., Whitton I.N., Pirie D., Rogers M.A., Mitha A.S. Severe calcification of glutaraldehydepreserved porcine xenografts in children. *Am. J. Cardiol.* 45: 690-696, 1980.
17. Yeh H.S., Keller J.T., Brackett K.A., Franck E., Tew J.M. Human umbilical artery for microvascular grafting. Experimental study in the rat. *J. Neurosurg.* 61: 737-742, 1984.