

Estudio sobre conservación y esterilización de válvulas y arterias cadavéricas para su utilización como prótesis en cirugía cardiovascular (homoinjertos frescos)

OSCAR SCHWINT¹, HORACIO VOGELFANG²

Hospital de Pediatría S.A.M.I.C. Prof. Dr. Juan P. Garrahan, Buenos Aires

* Para optar a Miembro Titular de la Sociedad Argentina de Cardiología

¹ Servicio de Patología

² Servicio de Cirugía Cardiovascular

Trabajo recibido para su publicación: 7/94. Aceptado: 9/94

Dirección para separatas: Dr. Oscar Schwint, Vidt 2069, 4º "A". (1425) Buenos Aires, Argentina

Introducción

La utilización de homoinjertos valvulares es una práctica de rutina en cirugía cardiovascular y se ha demostrado que es posible preservar tejidos arteriales y valvulares viables y estériles utilizando un medio nutriente con antibióticos y, de ese modo, crear bancos de homoinjertos.

Objetivos

Preservar tejidos arteriales y valvulares cadavéricos provenientes de autopsias de rutina viables y estériles durante un período de 4 semanas.

Material y método

Se utilizaron arterias aortas y pulmonares junto con sus válvulas extraídas de autopsias humanas de rutina y de animales de experimentación (30 ratas, 2 perros y 2 cerdos). Los corazones, junto con sus arterias y válvulas, se recolectaron en forma limpia pero sin condiciones de esterilidad. Se sumergieron en solución fisiológica y se conservaron a 4 grados centígrados por un período de entre 4 y 26 horas, hasta su disección. Se disecaron en condiciones de esterilidad en cámara de flujo laminar y se tomaron muestras de sangre para determinaciones serológicas. Los homoinjertos se dividieron en trozos que se sumergieron en medio nutriente con antibióticos (fórmula original del Brompton's Hospital con adición de anfotericina B). Las muestras se conservaron a temperatura ambiente durante 24 horas y luego se colocaron en refrigerador a 4 grados centígrados. Los trozos fueron cultivados y examinados histológicamente a las 24 horas (muestra a temperatura ambiente) y luego semanalmente. Se efectuaron cultivos para bacterias Gram positivas, negativas, anaeróbicas, TBC y hongos. La viabilidad fue estudiada por un método semicuantitativo, comparando cada muestra con un testigo inicial.

Resultados

Se cultivaron 30 muestras murinas, 56 caninas o porcinas y 72 humanas. Se estudiaron histológicamente 24 de las muestras murinas y todas las restantes. Los cultivos fueron negativos en 93% (14/15) de los casos humanos; 83% (25/30) del material murino y 75% (6/8) de las muestras porcinas o caninas. La viabilidad fue entre el 75 y 85% a la cuarta semana para todos los grupos.

Conclusiones

Se demuestra que es posible esterilizar y conservar viables válvulas y arterias cadavéricas en un medio nutriente con antibióticos a 4 grados centígrados por un período de 4 semanas. Con una merma del 8% por contaminación y una viabilidad superior al 70% es posible crear un banco de homoinjertos frescos. Rev Arg Cardiol 1994; 62 (6): 627-634.

Palabras clave Homoinjertos frescos - Válvulas cardíacas - Experimental

Los homoinjertos valvulares frescos o criopreservados son las prótesis cardíacas de elección dado su buen funcionamiento, su rendimiento superior o similar al de las prótesis biológicas o mecánicas, la falta de requerimiento de anticoagulación y la menor incidencia de infecciones; todo lo cual permite una mejor calidad de vida para el paciente. (1-13) Actualmente se las considera de elección en múltiples centros de cirugía cardiovascular pediátrica para la resolución de cardiopatías congénitas complejas, que requieren tubos valvulados. (14-20)

Se ha demostrado que es posible preservar tejidos arteriales y valvulares, viables y estériles, utilizando una solución de medio de cultivo y antibióticos. (23-26)

Esta metodología se utiliza en diversos centros, desde 1972, para constituir bancos de tejidos para prótesis en diversos tipos de cirugía cardiovascular.

Siguiendo los procedimientos que se realizan en el Departamento de Homoinjertos del Royal Brompton National Heart and Lung Hospital de Londres, en 1992 se efectuaron, en el Hospital Garrahan, experimentos con tejidos animales, con resultados satisfactorios, aunque en una muestra reducida. (27)

Paralelamente, el equipo de cirugía cardiovascular del mismo hospital comenzó una experiencia clínicoquirúrgica, implantando más de 14 homoinjertos enviados por el citado Departamento de Homoinjertos de Londres.

Dados los buenos resultados preliminares, se diseñó un protocolo clínicoquirúrgico para evaluar los resultados de las prótesis extranjeras implantadas y comparar la muestra con la experiencia internacional. Además se confeccionó el presente protocolo para desarrollar la tecnología necesaria para producir homoinjertos frescos provenientes de material cadavérico de autopsias de rutina y de animales de experimentación, con la finalidad de demostrar la posibilidad de reproducir las experiencias en nuestro hospital.

OBJETIVOS

Los objetivos del presente estudio son esterilizar y preservar viables, durante un período de 4 semanas, tejidos arteriales y valvulares cadavéricos provenientes de autopsias de rutina.

MATERIAL Y METODO

Se utilizaron arterias aortas y pulmonares junto con sus válvulas sigmoideas, extraídas de las autopsias de rutina del servicio de Patología del Hospital Garrahan (salvo un caso procesado fuera del hospital); válvulas y arterias porcinas y caninas gentilmente cedidas por los equipos de trasplante hepático y pulmonar experimentales y arterias murinas gentilmente cedidas por el Dr. Héctor

Chemes del Laboratorio de Patología Endocrina del Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE) de Buenos Aires.

1. Recolección del material

1a. Material humano

Previo autorización de los familiares para la autopsia, se efectuó la extracción de los corazones con sus arterias según la técnica de evisceración del Servicio de Patología de nuestro hospital, sin tomar recaudos especiales con respecto a la asepsia de los materiales utilizados. Una vez retirado el block toracoabdominal, se procedió a desprender el corazón previa disección roma de las zonas de adherencia. Los corazones fueron sumergidos en solución fisiológica estéril en frasco limpio (no estéril) y se conservaron durante períodos variables (no mayores de 24 horas) en heladera a 4 grados centígrados.

En todos los casos los cadáveres fueron conservados en heladera hasta el momento de la autopsia, que se efectuó entre 6 y 8 horas *post mortem*.

1b. Material porcino-canino

Los corazones de cerdo se recolectaron en el quirófano de cirugía experimental del hospital, retirándose tan sólo el corazón con sus grandes vasos a través de la incisión abdominal.

Los corazones de perro, junto con los pulmones, fueron remitidos al Servicio de Patología en bolsa de plástico sin líquido.

Luego se procedió de similar manera que con el material humano.

1c. Material murino

Las ratas eran de la cepa Wistar y fueron estudiadas en dos grupos.

El primer grupo, constituido por 20 ratas, fue eviscerado en el bioterio del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, sin prestar especial atención a la esterilidad de la piel, y algunas muestras se contaminaron microscópicamente con pelos. La técnica de evisceración fue la incisión toracoabdominal y la evisceración del corazón. Los corazones se colocaron en frascos limpios, no estériles, con solución fisiológica y en heladera a 4 grados centígrados.

Otro grupo de 10 ratas fue procesado modificando la técnica de evisceración. Previa desinfección de la piel con alcohol al 96%, se disecaron ampliamente los planos de piel toracoabdominales para luego, con otro instrumental, efectuar la evisceración del corazón con particular precaución de evitar tocar zonas de piel contaminadas. Una vez evisceradas, se procedió como en el grupo anterior.

2. Procesamiento del material

El procesamiento del material se efectuó en forma

similar para los tres grupos experimentales (humanos, porcinos/caninos y murinos).

Los frascos conteniendo los corazones fueron transferidos a la cámara de flujo laminar, la cual estuvo funcionando previamente con luz ultravioleta por un período no menor de 30 minutos; también se transfirieron los frascos con medio de cultivo y los envases para fraccionar el mismo. El o los operadores utilizaron, a partir de este momento, gorro, barbijo, guantes y camisolín estériles. Se utilizaron pinzas y tijeras estériles para el procesamiento del material.

En los corazones humanos, porcinos y caninos se procedió a diseccionar la arteria aorta con su válvula incluyendo la valva anterior de la mitral y, posteriormente, se abrió el tracto de salida del ventrículo derecho para separar la válvula y arteria pulmonar. Una vez extraídas las arterias, se procedió a diseccionar la adventicia y los tejidos periarteriales, así como los bordes musculares remanentes.

De cada una de las arterias se tomaron muestras de aproximadamente 1 x 0,5 cm (entre 4 y 14 trozos, según la cantidad de arteria disponible) para los estudios bacteriológicos e histopatológicos.

En el caso de las ratas hubo que modificar la técnica debido a lo pequeño del corazón y grandes vasos de estos animales; por lo tanto, se tomaron un total de 34 muestras en el primer grupo y de 20 muestras en el segundo grupo.

Estas muestras se sumergieron en una alícuota de 20-30 ml de cultivo con antibióticos, en frascos estériles. Las arterias y válvulas humanas, porcinas y caninas fueron sumergidas en frascos estériles con 250 ml de medio de cultivo con antibióticos.

Todas las muestras permanecieron durante 24 horas a temperatura ambiente para luego ser trans-

feridas a heladera a 4 grados centígrados durante el resto del estudio.

Se enviaron muestras para cultivo bacteriológico (bacterias Gram positivas, negativas y TBC) y micológico efectuadas según los procedimientos de rutina del Servicio de Bacteriología del Hospital Garrahan. El primer cultivo se efectuó una vez cumplidas las 24 horas a temperatura ambiente y antes del enfriamiento del material y luego se lo repitió semanalmente, por un lapso máximo de entre 4 y 6 semanas. En 6 casos de autopsias humanas se envió suero y/o sangre para estudios serológicos para HIV, hepatitis, toxoplasmosis y enfermedad de Chagas.

Los estudios histológicos se efectuaron fijando las arterias y válvulas en formaldehído al 10% con pH 7, inclusión en parafina y cortes histológicos teñidos con hematoxilina eosina, PAS y técnicas para tejido elástico. (25-27)

Cada uno de los casos se analizó independientemente para determinar la cantidad de núcleos presentes por varios campos de gran aumento y las características de las fibras elásticas y del intersticio; luego se efectuó un estudio comparativo entre las muestras de cada caso.

Se utilizaron como controles de viabilidad celular cortes histológicos de aortas y pulmonares animales y humanas fijadas en formol buffer ph7 inmediatamente después de la muerte o extraídas en cirugía. Se consideró que la morfología de estas arterias representaba un testigo con viabilidad 100%. Luego se compararon semicuantitativamente las muestras problema con éstas, se determinó la cantidad de núcleos, de células musculares en varios campos de gran aumento, de fibras elásticas y de tejido colágeno en cada una.

Se consideró la pérdida de núcleos como expre-

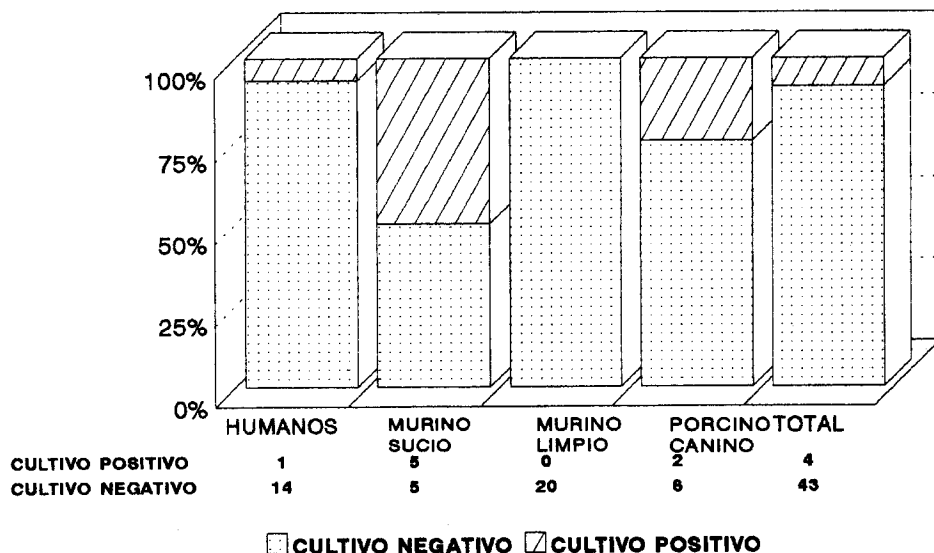


Fig. 1. Resultados de los cultivos en los distintos grupos estudiados. Se separa el grupo murino de acuerdo al procedimiento de evisceración (limpio o sucio). -: negativos. +: positivos.

sión de disminución de la viabilidad tisular.

El medio de cultivo con antibióticos fue preparado por el Servicio de Microbiología según técnica habitual, con una modificación en la composición antibiótica según estudios previos efectuados por los autores. (25, 26)

RESULTADOS

Se presentan separados según la procedencia ya que encontramos particularidades inherentes a cada grupo.

Material murino

Del primer grupo de 20 ratas se pudieron obtener 34 muestras (entre 1 y 3 por caso) y se efectuaron una total de 10 cultivos bacteriológicos, entre las 24 horas y las 3 semanas. Dos cultivos de 24 horas fueron negativos bacteriológicamente (no hubo desarrollo de microorganismos). Cuatro cultivos fueron efectuados la primera semana: tres negativos y uno positivo para *Aspergillus*; dos de los cultivos negativos correspondían a muestras negativas bacteriológicamente a las 24 horas. En la segunda y tercera semanas se efectuaron 4 cultivos, todos ellos positivos para *Aspergillus*. En este punto se decidió que el material había sido contaminado durante la evisceración y no se envió más material para cultivo (Figura 1).

Las 24 muestras restantes se utilizaron para determinación de viabilidad celular histológica entre las 24 horas y las seis semanas de mantenimiento. Se distribuyeron de la siguiente forma: 2 muestras a las 24 horas; 2 muestras la primera semana; 2 muestras la segunda; 6 muestras a la tercera; 4 muestras en cada semana de la cuarta a la sexta.

Los porcentajes de viabilidad fueron entre el 99%, a las 24 horas, y el 75%, a la sexta semana, disminuyendo el porcentaje de células viables en función del tiempo (Figura 2A).

Como la viabilidad celular ya había sido estudiada adecuadamente, se utilizó el segundo grupo de 10 ratas para demostrar la hipótesis de que la contaminación de la muestra se produjo en el manipuleo de la evisceración.

Se obtuvieron 20 muestras (2 por cada animal), obteniéndose cultivos bacteriológicos persistentemente negativos en todos los casos (Figura 1).

Material porcino y canino

De los ocho homoinjertos porcinos o caninos se obtuvieron 56 muestras para cultivo e histología, analizadas entre las 24 horas y las 6 semanas.

Los estudios bacteriológicos de 6 animales fueron negativos a las 24 horas y persistieron negativos en los cultivos seriados durante las seis semanas subsiguientes. En 2 casos, las muestras de 24 horas fueron positivas para *Aspergillus* y persistieron posi-

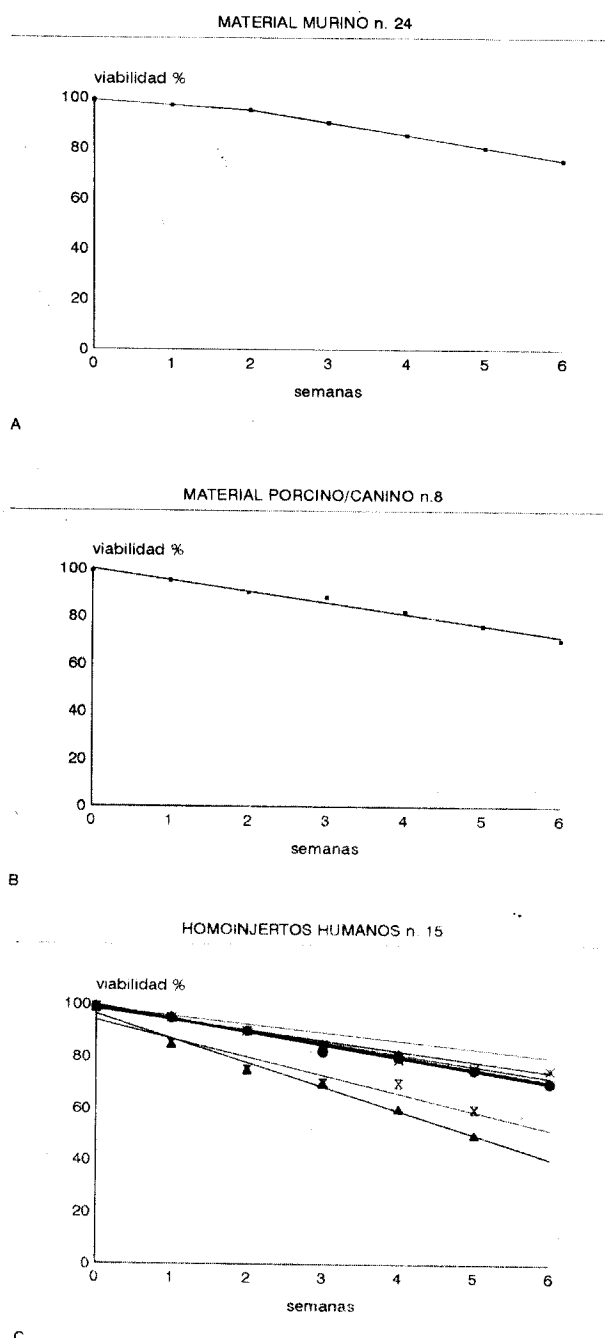


Fig. 2. Porcentajes de viabilidad tisular en función del tiempo para los distintos grupos estudiados.

vas durante los siguientes estudios (Figura 1).

Se estudió histológicamente, para determinar viabilidad, una muestra de cada uno de los 8 casos a las 24 horas y luego de cada uno por semana, a lo largo de las seis semanas. Los resultados fueron similares a los obtenidos en el material murino. La viabilidad fue del 99% a las 24 horas, para decaer progresivamente, en función del tiempo, hasta el 70%

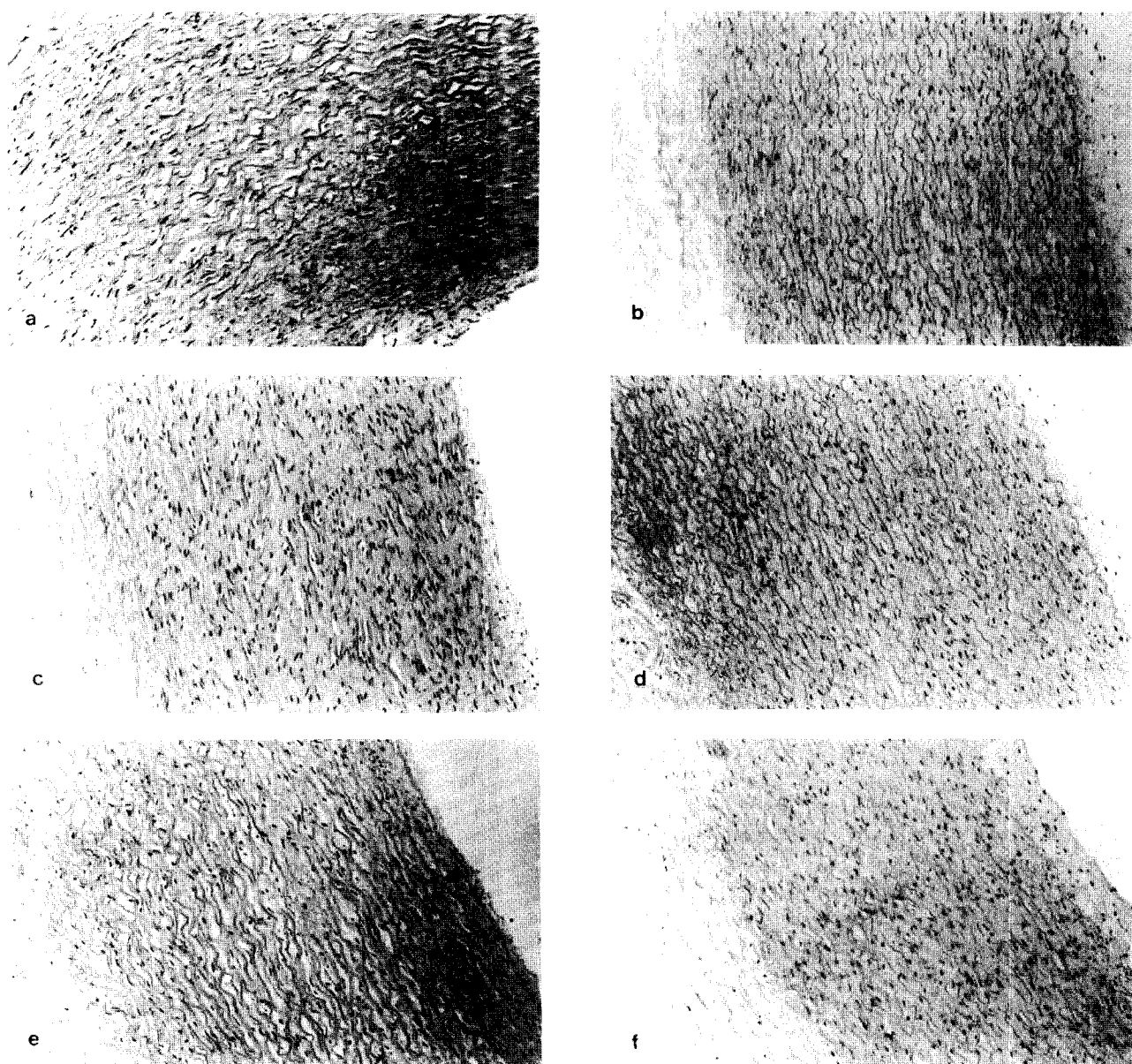


Fig. 3. Aorta humana. a: luego de 24 horas de preservación en medio nutriente con antibióticos. Se observa integridad de la estructura histológica, del endotelio, fibras elásticas y núcleos de las células musculares lisas. b: de 7 días de conservación. Estructura similar con edema del endotelio y picnosis aislada de núcleos en la pared arterial. c: de 14 días de conservación. Se observa pérdida de células endoteliales. d: de 21 días de conservación. Escasos núcleos picnóticos endoteliales, preservación de la estructura arterial. e: de 28 días de conservación. Pérdida de endotelio vascular; menor porcentaje de células en la pared. f: de 42 días de conservación. Disminución de la cantidad de núcleos presentes en la pared arterial. (H y E \times 100)

a las seis semanas (Figura 2B).

Microscópicamente, las arterias y sus válvulas, a las cuatro semanas, tenían una apariencia totalmente normal.

Material humano

Se pudieron procesar un total de 8 autopsias, obteniéndose 15 homoinjertos; 12 incluyeron válvulas y arterias; 2 estuvieron constituidos por arteria

pulmonar y aorta y 1 correspondiente a vena safena externa.

En 6 casos (12 homoinjertos) se obtuvo sangre para determinación de serología. En los primeros tres casos el material fue inadecuado para su procesamiento en el sector de serología del hospital. En los siguientes tres, se modificó la técnica de obtención procediendo a remitir para serología una mezcla de sangre y solución fisiológica sobrenadante del corazón.

Los tres pacientes tenían estudios serológicos realizados en vida para HIV, HBV, toxoplasmosis, Chagas y CMV; los resultados *post mortem* fueron completamente negativos en un caso, positivos para toxoplasmosis en otro y para CMV en el tercero, coincidiendo con la serología previa.

Los títulos obtenidos en las muestras *post mortem* fueron aproximadamente un tercio de la titulación *pre mortem* (debido a la dilución de las muestras) pero se consideraron útiles como muestreo para descartar las enfermedades propuestas.

En los 15 homoinjertos estudiados, se efectuaron un total de 72 cultivos bacteriológicos y micológicos, entre el primer día y las cuatro a seis semanas. En este grupo sólo un caso presentó cultivo positivo a las 24 horas para *Aspergillus*, siendo los restantes negativos para bacterias, hongos y TBC. Ninguno de los cultivos inicialmente negativos se positivizó en los cultivos seriados, y el que inicialmente fue positivo continuó siéndolo (Figura 1).

Se efectuaron 72 estudios histológicos, entre las 24 horas y las seis semanas, y en 13 casos se observó que la viabilidad alcanzaba el 95% en la primera semana, el 90% entre la segunda y cuarta semanas, para decrecer al 85-70% a las seis semanas. En dos casos la viabilidad cayó abruptamente en la primera semana y subsiguientes, hasta una viabilidad del 50% a las cuatro semanas; correspondían a la autopsia de un adulto de 80 años (Figura 2C).

En todos los casos, las arterias fueron microscópicamente normales entre las 4 y 6 semanas de conservación (Figura 3 a-f).

En resumen, de todos los casos estudiados en conjunto, se obtuvieron cultivos positivos iniciales en 4 casos (dos porcinos, uno murino y uno humano) que persistieron siendo positivos durante el transcurso del estudio, representando el 8% de los casos procesados. Si nos limitamos a los humanos, tan sólo el 6,5% se contaminaron (1/15) (Figura 1).

El único contaminante, en todos los casos, fue el *Aspergillus*, hongo ambiental ubicuo; se podría disminuir su incidencia contando con materiales de trabajo más seleccionados y también con el incremento en la experiencia de los operadores.

La viabilidad global fue decreciendo paulatinamente durante el tiempo, hasta el 85-70% a las seis semanas (Figura 2).

DISCUSION

De acuerdo con los datos de la literatura, una viabilidad superior al 70%, a las 4 a 6 semanas, es completamente adecuada para que los homoinjertos sean utilizados en la práctica quirúrgica asistencial. Los resultados comunicados en series de pacientes operados con homoinjertos de calidad similar, y con un seguimiento de hasta 20 años, son promisorios te-

niendo en cuenta el bajo índice de fallas valvulares, de reoperaciones por este motivo y la baja incidencia de complicaciones mayores relacionadas con éstas prótesis, en comparación con otras. (1-18)

Un punto importante en esta investigación fue la exclusión de enfermedades infectocontagiosas relativamente comunes, y de potencial morbimortalidad para el receptor, por medio de los estudios serológicos, tal como ha sido demostrado en otros centros. (27-29) Este procedimiento asegura un control de calidad indispensable para la utilización de estas bioprótesis, ya que los corazones pueden provenir de cualquier institución, aunque no se conozcan los antecedentes infectológicos del donante.

En el presente estudio se efectuaron cultivos seriados en cada caso, para demostrar que, una vez esterilizadas las prótesis y tomando los recaudos necesarios, es improbable su contaminación. De esta manera se pueden aceptar los procedimientos de rutina utilizados en otros bancos de homoinjertos, que sólo efectúan cultivos microbiológicos luego de las 24 horas de incubación en medio nutriente con antibióticos, dando por estériles los homoinjertos si estos resultados son negativos a los 10 días.

La experiencia de los autores en este estudio experimental demuestra que el medio nutriente con antibióticos es capaz de esterilizar tejidos valvulares y arteriales, siempre y cuando la contaminación inicial de los tejidos no sea masiva (como ocurrió en el caso del material murino). Sin embargo, se piensa que las condiciones habituales de trabajo en una morgue son adecuadas para que los tejidos puedan ser esterilizados por esta tecnología.

Algunos bancos de homoinjertos limitan la edad de los donantes a menores de 65 años. (29) En nuestro estudio se incluyeron las arterias aorta y pulmonar de un sujeto de 80 años, observándose un acelerado decremento de la viabilidad celular comparado con el resto de los casos humanos cuya edad media fue de 1 año.

La técnica de disección es perfectamente reproducible, si bien requiere entrenamiento. El almacenamiento se puede efectuar en doble frasco estéril, sin complicaciones de contaminación.

Si consideramos una merma por contaminación del 6,5% en los casos humanos, creemos que la tecnología es suficientemente adecuada como para ser implementada en nuestro hospital.

CONCLUSIONES

1. Este estudio demuestra que es posible esterilizar y conservar viables válvulas y arterias cadavéricas, ya sean animales o humanas, en medio de cultivo con antibióticos, en heladera a 4 grados centígrados y por un período de cuatro semanas.

2. Es posible determinar la ausencia de enferme-

dades infectocontagiosas peligrosas (HIV, hepatitis, Chagas, toxoplasmosis, sífilis) por medio de la serología efectuada directamente sobre el corazón enviado para confeccionar el homoinjerto, tal como se efectúa en otros bancos de homoinjertos.

3. Los homoinjertos, en estas condiciones de viabilidad y esterilidad, son prótesis potencialmente implantables en cirugía cardiovascular.

4. El cultivo de 24 horas es suficiente para predecir si el material (arterias y válvulas) ha sido esterilizado por el medio de cultivo con antibióticos.

5. Las condiciones de operación en la extracción del corazón y arterias son importantes para evitar inóculos masivos en el material que no alcanzan a ser esterilizados por el medio de cultivo (como ocurrió con el primer grupo de ratas). Sin embargo, para el material humano las condiciones habituales de trabajo de una morgue parecen adecuadas para que el medio de cultivo con antibióticos sea eficiente en la esterilización.

6. Las técnicas de disección y almacenamiento son factibles en nuestro hospital.

SUMMARY

STUDY ON THE PRESERVATION OF POST MORTEM VALVULAR AND ARTERIAL TISSUE VIABLE AND STERILE TO BE USED AS PROSTHESIS IN CARDIOVASCULAR SURGERY (FRESH HOMOGRAFT)

Background

Homograft valves are widely used in routine cardiovascular surgery. It has been demonstrated that it is possible to preserve valvular and arterial tissues viable and sterile by using a nutrient medium with antibiotics; thus allowing the development of homograft banks. The objective of this study was to preserve valve and arterial tissues from routine postmortem, viable and sterile during a 4-week period.

Methods

Hearts and arteries were obtained from 7 human routine postmortems, 30 rats, 6 dogs and 2 pigs. In all cases, autopsies were performed in a socially clean but non-sterile environment. Hearts were maintained in physiological solution for 4 to 26 hours after removal. Dissection of the heart valves and arteries was performed under laminar flow and aseptic conditions. Blood samples were taken for serological screening. Homografts were divided into pieces and immersed in nutrient medium with antibiotics (Brompton's Hospital formula plus amphotericin B). Samples were kept at room temperature for 24 hours and then stored at 4°C. Samples were cultured and histologically assessed

at 24 hours (room temperature sample) and then weekly. Cultures from tuberculosis, Gram positive and negative bacteria, fungi and post-mortem contaminants were performed. Viability was assessed by a semiquantitative method comparing each sample with a control.

Results

Cultures included 30 murine; 56 porcine/canine; and 72 human samples. Twenty-four murine, 56 canine/porcine, and 72 human samples were histologically assessed. Cultures were negative in 93% (14/15) human; 83% (25/30) murine, and 75% (6/8) of canine/porcine samples. Viability was 75-85% in the fourth week for all groups.

Conclusions

According to these results, it is possible to preserve post mortem valvular and arterial tissues sterile and viable in a nutrient medium with antibiotics at 4°C during a 4-week period. It is possible to create a fresh homograft bank with an 8% process failure due to contamination and a viability rate over 70%.

Key words Fresh homografts - Cardiac valves - Experimental

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración de las siguientes personas y servicios:

Dr. Marcos Rivarola. Director de Investigación del Hospital de Pediatría J. P. Garrahan, por la revisión crítica del manuscrito.

Dras. Etelvina Ruboglio y Claudia Hernández. Servicio de Microbiología del Hospital de Pediatría J. P. Garrahan.

Dr. Guillermo Gallo. Jefe de la sección Patología del Hospital de Pediatría J. P. Garrahan.

Dra. E. D'Agostini. Jefa del servicio de Esterilización del Hospital de Pediatría J. P. Garrahan.

Bioquímicas Rita Moreira, Estela Carchio y técnica Marisa Escobedo. Laboratorio de Serología del Hospital de Pediatría J. P. Garrahan.

Histotécnica Norma Pozzo. Sección Patología del Hospital J. P. Garrahan.

BIBLIOGRAFIA

1. Ross DN. Homograft replacement of the aortic valve. *Lancet* 1962; 2: 487.
2. Barrant-Boyes BF. Homograft aortic valve replacement in aortic incompetence and stenosis. *Thorax* 1964; 19: 131.
3. Copeland JG, Griepp RB, Stinson EB, Shumway NE. Long term follow-up after isolated aortic valve replacement. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1977; 74: 875.
4. Anderson ET, Hancock EN. Long term follow-up of aortic valve replacement with fresh aortic homograft. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1977; 72: 151.
5. Barrant-Boyes BG, Roche ABC, Whitlock PM. Six year review of the results of free hand aortic valve replacement using an antibiotic-sterilized homograft valve. *Circulation* 1977; 55: 353.
6. Bodnar E, Wain WH, Martelli N, Ross DN. Long term performance of 580 homograft and autograft valves used for aortic valve replacement. *Thorac Cardiovasc Surg* 1979; 27: 31.
7. Matsuki O, Robles A, Gibbs G, Bodnar E, Ross DN. Long

- term performance of 555 aortic homograft in the aortic position. *Ann Thor Surg* 1988; 46: 187.
8. Okita Y, Franciosi G, Matsuki O, Robles A, Ross DN. Early and late results of aortic root replacement with antibiotic sterilized aortic homograft. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1988; 95: 696.
 9. Moreno Cabral CE, Miller DC, Shumway NE. "Fresh" freehand, non viable allografts for aortic valve replacement: Operative techniques and 15 year results. *En: Yankah AC, Hetzer R, Miller DC y col (eds). Cardiac valve allografts 1962-1987. Berlin, Steinkopff Verlag Darmstadt 1987: 125-140.*
 10. Kirklin JK, Kirklin JW, Pacifico AD y col. Long-term function of cryopreserved aortic homografts. A ten year study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 106: 154.
 11. McKay R, Ross DN. Aortic replacement. *En: Stark J, Pacifico AD (eds): Reoperations in cardiac surgery. Springer-Verlag, 1989, cap 19.*
 12. Radley Smith R, Yacoub MH. Long-term results of antibiotic allografts in subcoronary position. *En: Yankah AC, Hetzer R, Miller GC y col (eds). Cardiac valve allografts 1962-1987. Steinkopff Verlag Darmstadt, 1987: 265-271.*
 13. Barrant Boyes BG, Roche AA, Subramanian R y col. Long-term follow up of patients with the antibiotic-sterilized aortic homograft valve inserted freehand in the aortic position. *Circulation* 1987; 75 (4): 768-777.
 14. Ross DN, Somerville J. Correction of pulmonary atresia with a homograft aortic valve. *Lancet* 1966; 2: 1446.
 15. Kay PH, Livi U, Parker R, Ross DN. The pulmonary allograft for right ventricular outflow tract reconstruction. *En: Yankah AC, Hetzer R, Miller DC y col (eds). Cardiac valve allografts 1962-1987. Berlin, Steinkopff Verlag Darmstadt, 1987: 189-193.*
 16. Kirklin JK, Kirklin JW, Pacifico AD, Blackstone EH. Intermediate-term results of cryopreserved allograft and xenograft valved ventriculo to pulmonary artery conduits. *En: Yankah AC, Hetzer R, Miller DC y col (eds). Cardiac valve allografts 1962-1987. Berlin, Steinkopff Verlag Darmstadt, 1987: 125-140.*
 17. Jonas RA, Mayer JE, Castaneda AR. Technique of allograft repair of tetralogy of Fallot with pulmonary atresia. *En: Yankah AC, Hetzer R, Miller DC y col (eds). Cardiac valve allografts 1962-1987. Berlin, Steinkopff Verlag Darmstadt, 1987: 221-222.*
 18. Turley K. The use of aortic allografts in the primary repair of truncus arteriosus in early infancy and replacement of previous conduits. *En: Yankah AC, Hetzer R, Miller DC y col (eds). Cardiac valve allografts 1962-1987. Berlin, Steinkopff Verlag Darmstadt, 1987: 223-227.*
 19. Somerville J. Late results of homograft function used for right ventricular outflow obstruction. *En: Yankah AC, Hetzer R, Miller DC y col (eds). Cardiac valve allografts 1962-1987. Berlin, Steinkopff Verlag Darmstadt, 1987: 249-259.*
 20. Mc Kay R. Comunicación personal. Buenos Aires, 1993.
 21. Al-Janabi N, González Lavin L, Neirotti R, Ross DN. Viability of fresh aortic valve homografts: a quantitative assessment. *Thorax* 1972; 27 (1): 83.
 22. Al-Janabi N, Ross D. Enhanced viability of fresh aortic homografts sored in nutrient medium. *Cardiovascular Research* 1973; 7: 817-822.
 23. Barrant-Boyes BG, Roche AHG. A review of aortic valve homografts over a six and one half year period. *Annals of Surgery* 1969; 170: 483-486.
 24. Al-Janabi N, Ross DN. Long term preservation of fresh viable aortic valve homografts by freezing. *Brit J Surg* 1972; 61: 229.
 25. Parker R. Homograft Department, Royal Brompton National Heart and Lung Hospital. Comunicación personal. 1991.
 26. Jonas R, Zeimer G, Britton L, Arminger L. Cryopreserved and fresh antibiotic-sterilized valve aortic homograft conduits in a long-term sheep model; hemodynamic, angiographic and histologic comparisons. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1988; 96: 755-764.
 27. Allen MD, Shoji Y, Fujimara Y y col. Growth and cell viability of aortic versus pulmonic homografts in the systemic circulation. *Circulation* 1991; 84 (suppl III): III-94 - III-99.
 28. Livi U, Abdulla AK, Parker R y col. Viability and morphology of aortic and pulmonary homografts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987; 93: 755-760.
 29. Parker R. European standards for cryopreserved heart valve homografts. Comunicación personal. 1993.