

Investigación científica básica

Viabilidad de los sustitutos arteriales obtenidos mediante bioingeniería

Natalio García-Hondurilla¹, Belén Domínguez², Gemma Pascual², Cristina Escudero³, Francisco Minguela⁴, Juan Manuel Bellón¹ y Julia Buján², Madrid, España

La búsqueda de sustitutos vasculares para reemplazar los vasos de calibre mediano o pequeño constituye en la actualidad un motivo de preocupación para los cirujanos vasculares. Se diseñaron vasos obtenidos mediante bioingeniería para ser utilizados como equivalentes arteriales y se evaluaron en un modelo canino *in vivo*. Se establecieron tres grupos de estudio: polietetrafluoroetileno expandido (PTFEe; control, $n = 24$), PTFEe sembrado de células endoteliales (implante de CE, $n = 12$), y PTFEe con una matriz de fibroblastos sembrada con CE (implante de MF+CE, $n = 12$). Los implantes se sometieron a un circuito femoral *ex vivo* diseñado ex profeso y se implantaron en la arteria carótida durante 60 días. Se evaluó la viabilidad de los implantes protésicos. El circuito *ex vivo* reveló que la presencia de una matriz de fibroblastos indujo más del doble de retención celular que los implantes de CE. Se observó una reducción significativa de la adhesión plaquetaria en los implantes de CE. Tras el implante *in vivo*, los vasos obtenidos mediante bioingeniería fueron más eficientes a la hora de evitar la oclusión que los implantes protésicos. Los implantes de MF+CE indujeron una mayor endotelización que los sembrados sólo con CE. La respuesta de hiperplasia de la íntima se redujo en los sustitutos de CE. Se observaron diferencias significativas en las células apoptóticas entre los implantes de PTFEe con CE y los controles. Resumiendo, los vasos obtenidos mediante bioingeniería demostraron poseer una mejor permeabilidad inicial que los implantes de PTFEe. El implante de CE fue el mejor para hacer frente a la reestenosis, un buen indicador de la eficacia a largo plazo del implante.

INTRODUCCIÓN

Los biopolímeros pueden utilizarse para fabricar sustitutos arteriales en pacientes que no disponen de vasos sanos adecuados para un *bypass*, como la vena safena o la arteria mamaria interna^{1,2}. Sin embargo, la trombosis y la hiperplasia de la íntima continúan siendo las principales causas de fracaso de los implantes cuando se sustituyen arterias de calibre pequeño y mediano³.

La hiperplasia de la íntima, un proceso en el que se forma una nueva capa conocida como “mioíntima/neoíntima”, se produce en respuesta al proceso de reparación de las heridas producidas en la pared vascular. Este proceso se caracteriza por la proliferación celular y por la síntesis y el depósito de matriz extracelular. Es el crecimiento excesivo de esta matriz celular lo que provoca la estenosis, reestenosis y/u oclusión⁴. Sin embargo, en las técnicas para el desarrollo de implantes tisulares por bioingeniería, las

DOI of original article: 10.1016/j.avsg.2007.12.007.

¹Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares y Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Madrid, España.

²Departamento de Especialidades Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares y CIBER-BBN, Madrid, España.

³Servicio de Cirugía Experimental, Hospital Puerta de Hierro, Madrid, España.

⁴Servicio de Cirugía Vascular, Hospital La Paz, Madrid, España.

Correspondencia: Julia Buján, MD, PhD, Departamento de Especialidades Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá, Ctra. Madrid-Barcelona Km 33.600, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. Correo electrónico: mjulia.bujan@uah.es

Ann Vasc Surg 2008; 22: 255-265

DOI: 10.1016/j.avsp.2008.05.017

© Annals of Vascular Surgery Inc.

Publicado en la red: 17 de marzo de 2008

células musculares lisas tienen un papel predominante ya que también actúan como armazón necesario para la siembra de células endoteliales (CE).

Los recientes avances sobre la biología de este fenómeno han demostrado que el endotelio desempeña un papel importante en estos procesos^{5,6}. Un abordaje integral del problema requeriría el revestimiento de la luz de la prótesis vascular con CE⁷. La posibilidad de revestir los implantes vasculares de pequeño calibre para mejorar su permeabilidad a largo plazo supondría un hito importante en la cirugía vascular. Los esfuerzos realizados hasta la fecha han consistido en la siembra de la superficie protésica⁸ con diferentes tipos de células, como CE⁹, miofibroblastos, y células mesoteliales¹⁰. En realidad, el trasplante de CE en implantes vasculares ha supuesto un gran avance para la ingeniería tisular, ya que la mejora de la permeabilidad podría reducir teóricamente el fracaso de los implantes¹¹.

En la actualidad, la biotecnología ha combinado la terapia de sustitución y de regeneración para centrarse en la búsqueda de un sustituto vascular similar en estructura y función a los vasos originarios. El empleo de células vivas, la manipulación del entorno extracelular y la creación de sustitutos biológicos entran en el campo de la medicina reparadora, cuyo objetivo es crear sustitutos biológicos que restablezcan las funciones normales¹².

Una de las áreas de actividad más intensa en la investigación de ingeniería tisular ha sido el desarrollo de un método adecuado para crear un constructo de tejido tubular. Algunos autores han logrado crear vasos mediante bioingeniería utilizando exclusivamente células, aunque en la mayoría de los estudios se utiliza algún tipo de material como armazón, ya sea natural o sintético. Nuestro grupo de investigación se ha embarcado en un proyecto que trata de mejorar las propiedades del politetrafluoroetileno expandido (PTFEe) antes de su implantación *in vivo*^{5,10}, y en la actualidad disponemos de datos suficientes para pasar a comprobar el comportamiento postimplante de varios constructos potenciales.

El objetivo de este estudio fue preparar vasos obtenidos mediante bioingeniería para utilizarlos como equivalentes vasculares. Se evaluó la capacidad antitrombogénica de los vasos obtenidos y su capacidad para mejorar el proceso de reparación lesional o la hiperplasia de la íntima en un modelo experimental canino *in vivo*.

MATERIALES Y MÉTODOS

En todos los estudios se establecieron tres grupos de implantes arteriales: PTFEe utilizado en la práctica

clínica (control, $n = 24$), sembrado de CE en implantes de PTFEe (CE, $n = 12$) y revestimiento de un implante de PTFEe con una matriz de fibroblastos sembrada con CE (MF+CE, $n = 12$).

Obtención de las células autólogas

Las CE se obtuvieron de la vena yugular de perros mestizos (15-25 kg). Se realizó una cervicotomía vertical bilateral para exponer ambas venas yugulares, que se clamparon mediante dos puntos separados 8-10 cm. Una vez se obtuvo la porción venosa, las CE se aislaron cateterizando la vena para introducir colagenasa tipo 1 al 0,1%.

Los fibroblastos se obtuvieron de la piel del lugar del abordaje. Las muestras se cortaron en pequeños explantes y se colocaron en frascos de cultivo. Los cultivos se incubaron en M-199 y medio de McCoy a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂ hasta su confluencia.

Sembrado de las células en sustitutos arteriales

Se utilizaron implantes vasculares de PTFEe de 6 cm de largo (Gore, Elkton, MD) con un diámetro interno de 4 mm y una porosidad de 30 µm. Los segmentos se canularon y se incluyeron en un cilindro de cristal. La superficie protésica se trató con una solución de fibronectina como adhesivo (20 µg/ml). Después del tratamiento, los implantes vasculares se sembraron con células del primer pase (2 a 2,5 × 10⁵/pocillo) en cuatro fases de 30 min a 37°C en una incubadora de CO₂. Durante cada fase, se confirió un giro de 90° a la prótesis en la cámara de vidrio para que cada vez se sembrase un área diferente de la prótesis. Después de este cultivo estático, el biomaterial se perfundió *in vivo* con un medio y se incubó sometido a una rotación suave constante a 6 rph hasta que se formó una monocapa en la superficie del PTFEe. En el grupo MF+CE, la primera siembra se realizó con fibroblastos; una vez se hubo formado la monocapa, las células se fijaron a la superficie del implante gracias a un tratamiento con glicerol al 5% durante 5 min. Posteriormente se realizó la siembra con CE.

Círculo *ex vivo*

Se estableció un circuito femoroauricular *ex vivo* en 12 perros cateterizando ambas arterias femorales y el apéndice auricular derecho, al que se accedió mediante una esternotomía medial. Se utilizó una sonda de polietileno de 4 mm para conectar cada implante, y éstos se conectaron a las sondas de polietileno unidas mediante una conexión en Y a la

aurícula derecha. En cada perro se colocó un implante de PTFEe y un vaso obtenido mediante bioingeniería. Se mantuvo el flujo sanguíneo durante 45 min.

Antes de la exposición de los implantes sembrados al circuito *ex vivo*, se comprobaron todos los implantes para asegurar que el 100% de la superficie protésica estuviese cubierta por CE. Después de la exposición al circuito *ex vivo*, se cuantificó el área de la superficie cubierta por CE sometiendo los cortes histológicos para microscopía electrónica de barrido a un análisis planimétrico con un Analizador Microm (Microm, Madrid, España).

La adhesión plaquetaria a las prótesis se determinó tras marcar las plaquetas del animal de experimentación con ^{111}In oxina y reinfundirlas al mismo animal. Posteriormente las plaquetas se incubaron en una solución de ^{111}In oxina (100 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) durante 15 min a temperatura ambiente. La capacidad trombogénica se estableció determinando la radioactividad como medida indirecta de las plaquetas depositadas en la superficie luminal del implante.

Implantación de los vasos obtenidos mediante bioingeniería

Para la implantación de los vasos obtenidos por bioingeniería se utilizaron diferentes implantes. El procedimiento se realizó bajo anestesia general en las 24 arterias carótidas de los 12 perros, a los que se administró heparina a razón de 100 U/kg. Las dos arterias carótidas se expusieron mediante un abordaje en la línea media del cuello y se eliminó un segmento de 5 cm de la arteria carótida que fue sustituido por un implante de PTFEe (izquierda) y por uno de los constructos (derecha) utilizando para las anastomosis una sutura de polipropileno de 7-0. Los animales se mantuvieron en jaulas en condiciones constantes de luz y temperatura, de acuerdo con las directrices de la Unión Europea (CEE 2871-22A9) durante 60 días, hasta que se retiraron los implantes.

Microscopía óptica

Las muestras se embebieron en parafina y se obtuvieron cortes histológicos seriados de 5 μm mediante un micrótomo Microm HM-325. Las tinciones utilizadas fueron hematoxilina-eosina, tricrómica de Masson, y rojo sirio. Se determinó el grosor de la neoíntima (proximal/distal y media) y el porcentaje de colágeno 1 y 3 (rojo sirio) en cortes histológicos longitudinales de 5 μm de ancho (10/grupo de estudio) utilizando un analizador de imágenes computarizadas Microm.

Microscopía electrónica de barrido

Se fijaron porciones de los implantes hasta alcanzar el punto crítico en un instrumento Polaron E-3000 (Cambridge, MA, EE. UU.) con CO_2 . Las muestras totalmente desecadas se metalizaron con oro-paladio y se examinaron al microscopio electrónico de barrido (DMS-950; Zeiss, Thornwood, NY).

Inmunohistoquímica

Los implantes se procesaron según el método descrito para la microscopía óptica. Los anticuerpos utilizados fueron CD34 antimurino (Biogénesis, Sandown, NH), α -actina antimurina, y heparán sulfato anticunicular (perlecan; Sigma, St. Louis, MO).

La reacción antígeno-anticuerpo se visualizó utilizando el método de avidina-biotina marcada con fosfatasa alcalina. El marcado se detectó mediante microscopía óptica. Se examinaron diez cortes histológicos inmunomarcados con cada anticuerpo en cada grupo de estudio y se sometieron a un análisis cuantitativo con la ayuda de un analizador de imágenes Microm.

Lesión celular

Se determinaron las células lesionadas utilizando una versión modificada de la técnica del marcado del extremo terminal de la desoxiuridina trifosfato mediado por la desoxinucleotidil transferasa¹³ (TUNEL). Los fragmentos de ADN se detectaron utilizando un kit específico (Calbiochem, San Diego, CA). Se examinaron diez cortes histológicos/implantes con un microscopio óptico (40x) y un analizador de imágenes Microm. Se realizó el recuento de las células positivas de un campo de cada cuatro seleccionado de forma aleatoria en cada corte histológico.

Análisis estadístico

Todos los datos se expresan como media \pm desviación estándar utilizando la aplicación Graph-Pad Prism v. 4 (San Diego, CA). Los datos del análisis de las imágenes se sometieron a un análisis estadístico descriptivo. Se comparó la media de los resultados entre los grupos mediante la prueba *U* de Mann-Whitney. El nivel de significación se estableció en $p < 0,05$.

RESULTADOS

Círculo *ex vivo*

Antes de que los implantes sembrados se expusieran al circuito *ex vivo* (control de preimplantación), el porcentaje de superficie protésica cubierta por CE

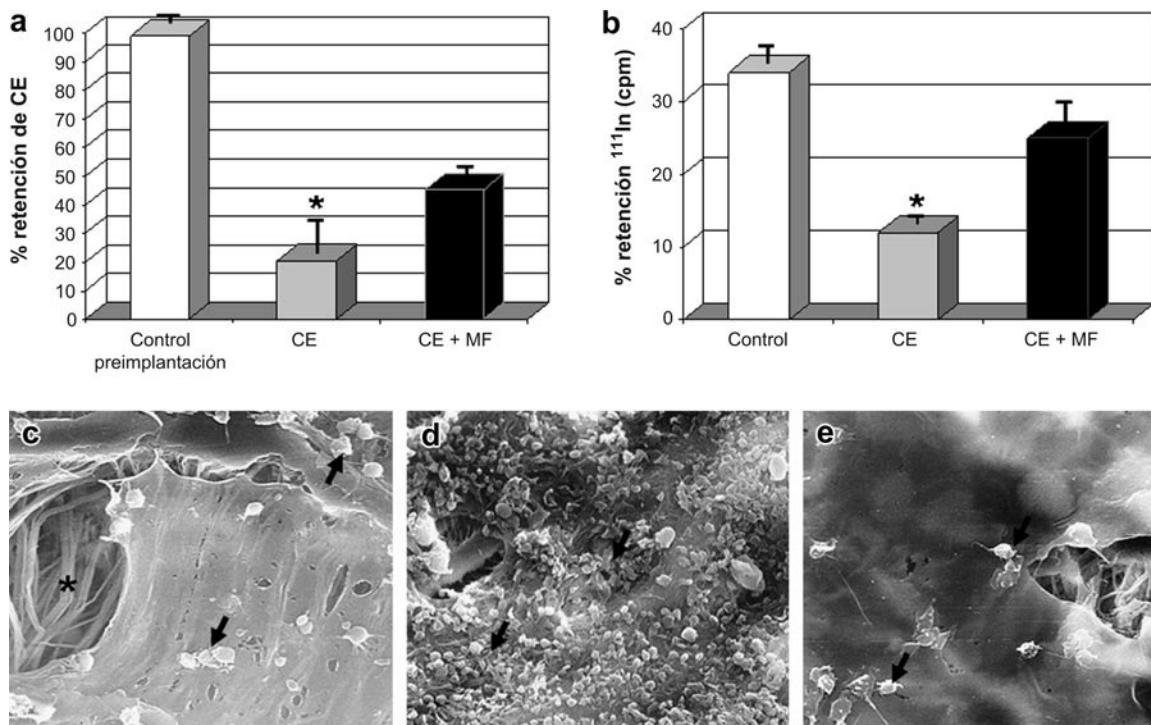


Fig. 1. **a** Porcentaje de CE restantes en los constructos antes (control preimplantación) y después (CE/MF+CE) de la implantación en el circuito *ex vivo*. **b** Número de plaquetas ($^{111}\text{In}/\text{cpm}$) retenidas en los diferentes constructos (* $p < 0,05$). **c** Imágenes al microscopio electrónico de barrido de las áreas desprovistas de células (*) en los constructos de MF+CE y algunas plaquetas (→) adheridas al endotelio ($\times 1.000$). **d** Grupo control (PTFE) mostrando una gran cantidad de plaquetas adheridas a la prótesis (→, $\times 500$). **e** Constructos mostrando algunas plaquetas activadas (→) adheridas al endotelio ($\times 1.000$), en el circuito *ex vivo*. CE: células endoteliales; MF+CE: matriz de fibroblastos sembrada con células endoteliales.

era de $98,8 \pm 1,3$. Tras una exposición de 45 min al flujo sanguíneo, cerca del 20% de las CE sembradas permanecieron en la superficie del implante. El porcentaje de implantes de MF+CE aumentó al 45% (fig. 1a). En efecto, se pudo observar el rastro dejado por las CE al separarse de la matriz de fibroblastos, rastro que apareció cubierto por plaquetas (fig. 1c).

Los implantes de CE (fig. 1b) demostraron ser los mejores ($p < 0,05$) como revestimiento antiagregante plaquetario. La exposición del PTFEe al flujo sanguíneo indicó que este material es altamente trombogénico (fig. 1d). Los implantes de CE solamente presentaron algunas plaquetas activadas adheridas al endotelio o al PTFEe sin revestir (fig. 1e), mientras que las plaquetas del grupo MF+CE aparecieron en los orificios producidos en la matriz de fibroblastos desprovista de CE (fig. 1c).

Viabilidad *in vivo* de los implantes protésicos

De los 24 implantes colocados, se ocluyeron 8; dos de ellos eran vasos obtenidos mediante bioingeniería y 6 eran prótesis de control (PTFEe). La oclusión

de los implantes arteriales se debió a una trombosis.

Las prótesis de PTFEe control implantadas en la arteria carótida izquierda fueron muy trombogénicas. El índice de trombosis fue del 50%, puesto que se ocluyeron 6 de las 12 prótesis utilizadas como control. Los implantes que estaban permeables en el momento de la muerte mostraron una superficie luminal que parecía endotelializada, con pequeñas áreas trombogénicas en la zona de sutura (fig. 2a). En la zona media del implante, las zonas endotelializadas alternaban con zonas que presentaban eritrocitos, depósitos de fibrina y leucocitos (fig. 2b). El PTFEe mostró una discreta infiltración celular en el tercio luminal, una ausencia de crecimiento celular en el tercio medio de la pared del implante, y la presencia de células en el tercio exterior, en la superficie de contacto con el lado adventicio (fig. 2c). La hiperplasia de la íntima fue menor en el área proximal del implante que en el área distal (fig. 2d).

De los 6 constructos de CE implantados en la arteria carótida derecha, cinco fueron viables y uno se ocluyó. Aparecieron áreas no revestidas por CE

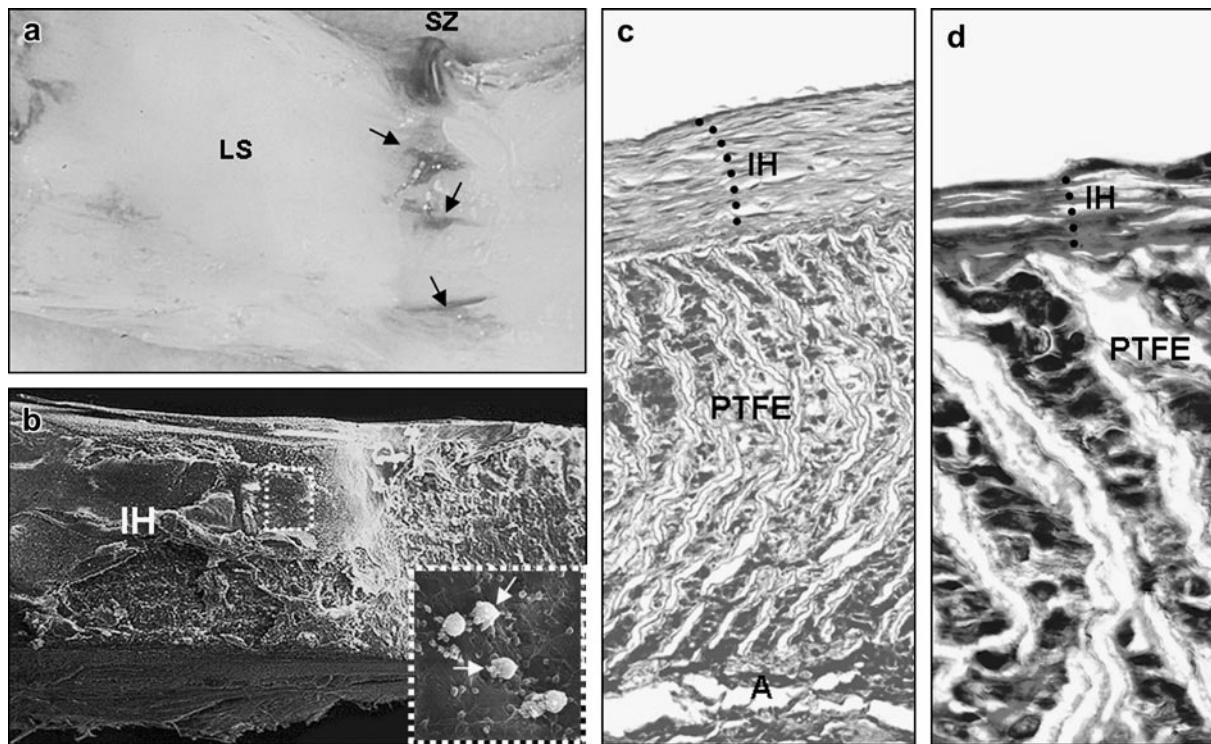


Fig. 2. **a** Aspecto macroscópico del constructo transcurridos 60 días de su implantación en el que se observa la superficie luminal endotelizada (LS) y la zona de sutura (SZ) con áreas trombogénicas (→). **b** Imagen al microscopio electrónico de barrido que muestra una lengua irregular de hiperplasia (IH) ($\times 19$). Pueden observarse redes de fibrina y restos de leucocitos (→, $\times 500$). **c** Hiperplasia homogénea de la íntima (IH) en la zona distal del implante y una gruesa capa adventicia (A, tricrómica m.o. $\times 20$). **d** La hiperplasia de la íntima fue menor en el área proximal del implante (Tricrómica de Masson m.o. $\times 40$). PTFE: politetrafluoroetileno.

(fig. 3a). En algunos implantes, la hiperplasia consistió en una única capa endotelial y una pequeña barrera celular en la capa adventicia bien conservada (fig. 3b). El interior del PTFEe fue colonizado por diferentes tipos celulares: células gigantes, células polimorfonucleares, fibroblastos, posibles restos de células sembradas, y células viables ocupando zonas intersticiales.

De los 6 vasos de MF+CE obtenidos mediante bioingeniería que se implantaron, cinco mantuvieron la permeabilidad y uno se ocluyó. El comportamiento del grupo fue similar al mostrado por los constructos de CE. La capa de hiperplasia intimal originada en los extremos de la arteria receptora cubrió el PTFEe, lo que permitió la conservación de la matriz formada por fibroblastos (figs. 3c y 3d). A medida que avanzó hacia la mitad del constructo, esta capa disminuyó de grosor hasta convertirse en una fina capa celular (fig. 3e). Estos implantes mostraron una importante cápsula fibrosa con una barrera formada por vasos y una intensa infiltración debida a la reacción celular ante el cuerpo extraño.

Cuantificación del grosor de la neoíntima

La hiperplasia presentó un patrón uniforme en la mayoría de los sustitutos arteriales utilizados en este estudio. En cada implante, la capa mioíntima se originó en la arteria receptora y creció hacia la mitad del constructo, alcanzando el grosor máximo en el extremo distal. No se observaron diferencias significativas al comparar la respuesta hiperplásica de los diferentes constructos con el grupo control. En los constructos de CE, la neoíntima fue significativamente más delgada ($p < 0,05$) que en los implantes de MF+CE (fig. 4a).

Al comparar las diferentes zonas de implante entre los grupos de estudio, los constructos de MF+CE difirieron significativamente de los de CE en cuanto al grosor de la neoíntima en la zona distal. En la misma zona, el grupo de CE presentó el menor grado de hiperplasia. Al comparar el grosor de la neoíntima de la zona medial entre el grupo control y el grupo de MF+CE, las diferencias también fueron significativas (fig. 4b).

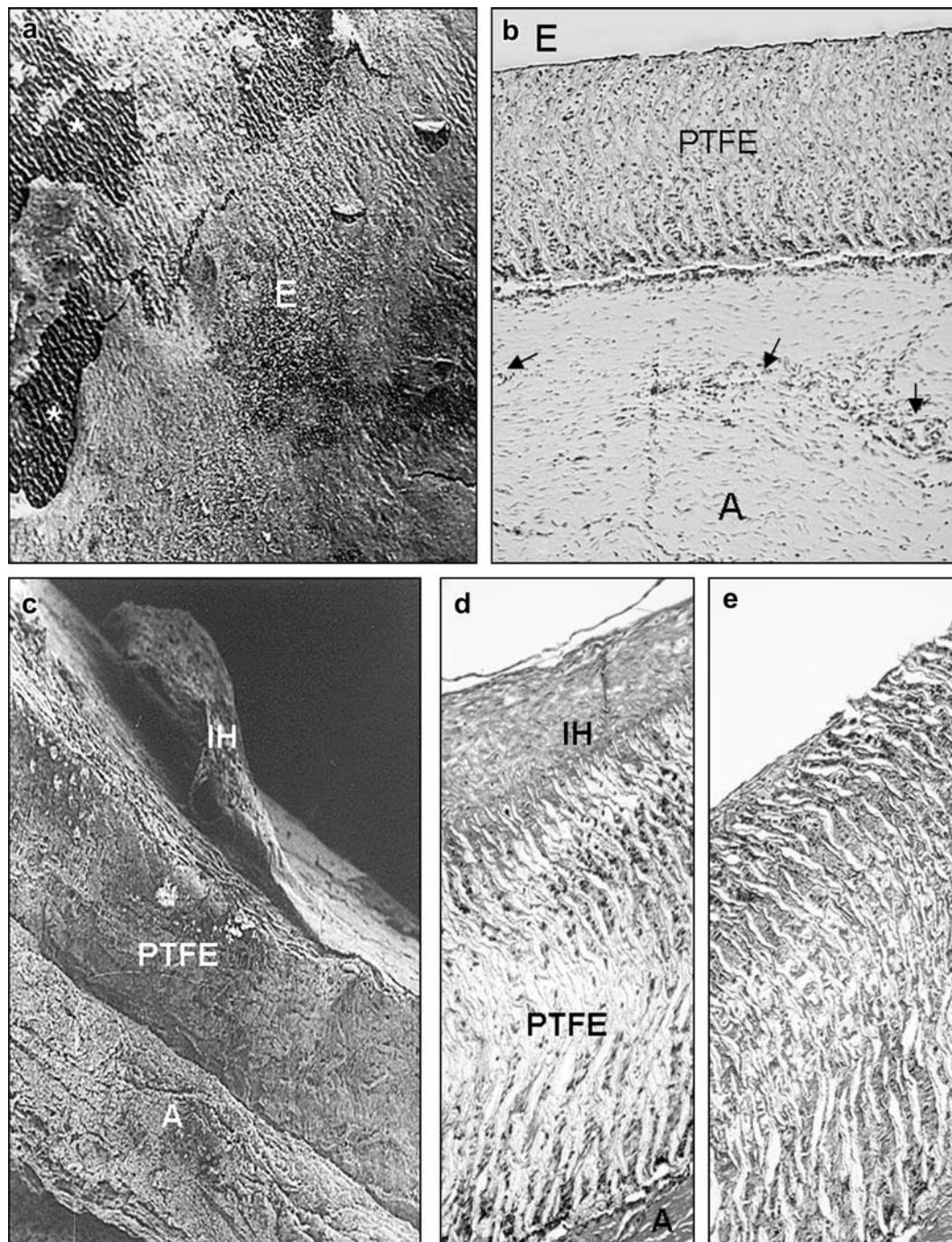


Fig. 3. **a** Microscopía electrónica de barrido de la superficie del constructo de CE con zonas desnudas (*) del endotelio (E) ($\times 50$). **b** Vista panorámica del constructo de CE. A destacar la adventicia vascularizada (→) y el biomaterial (PTFEe) infiltrado por células. Zona sin hiperplasia con una monocapa endotelial (E, hematoxilina/eosina m.o. $\times 10$). **c** Microscopía electrónica de barrido de la hiperplasia de la íntima (IH) en forma de lengua en los constructos de MF+CE ($\times 100$). El engrosamiento de la íntima disminuye desde el extremo distal (**d**) hacia el centro del implante, alcanzando el grosor mínimo en esta área (**e**) (tricrómica m.o. $\times 20$). A: adventicia; PTFE: politetrafluoroetileno.

Tinción rojo sirio

La técnica nos permitió evaluar la presencia de colágeno y su madurez en el proceso de reparación

tisular. La respuesta del grupo control fue la encapsulación, una reacción típica ante cualquier material extraño. Los implantes celulares mostraron un comportamiento similar; en este caso la encapsulación

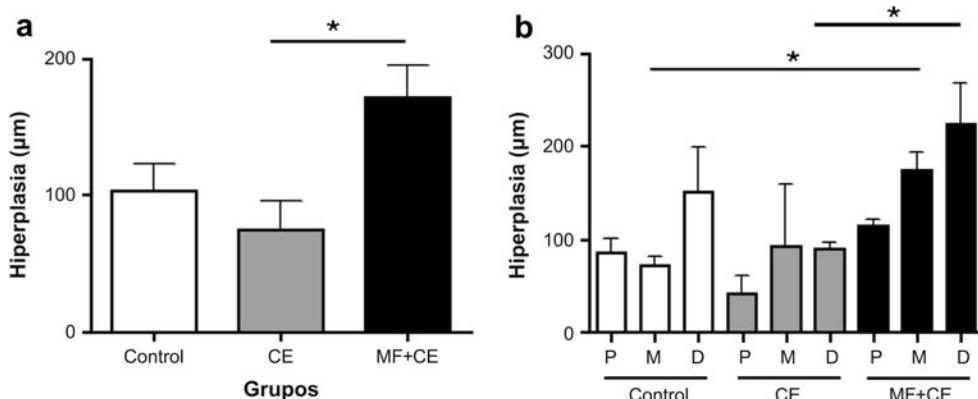


Fig. 4. a Valores promedio del grosor de la capa íntima (μm) en los diferentes implantes (proximal + distal + medio). Solamente se observaron diferencias significativas entre los grupos de constructos de CE y de MF+CE (* $p < 0,05$). b Grosor de la neoíntima (μm) registrado de forma individual para cada uno de los segmentos de los implantes, proximal (P), medio (M) y distal (D). Se observaron diferencias significativas entre las porciones medias de los constructos control y MF+CE y entre las porciones distales de los constructos de CE y MF+CE (* $p < 0,05$). CE: células endoteliales; MF+CE: matriz de fibroblastos sembrada con células endoteliales.

consistió en la formación de una gruesa cápsula de colágeno maduro (tipo 1) altamente organizado infiltrando el constructo. Esto fue más evidente en los implantes de MF+CE y pareció estar relacionado con la colonización celular (fig. 5a). Todos los grupos mostraron un porcentaje estadísticamente significativo de colágeno maduro con respecto al tipo inmaduro, pero no se observaron diferencias significativas cuando se comparó un único tipo de colágeno (tabla I).

Inmunohistoquímica

Utilizamos un anticuerpo antiCD34 para confirmar la presencia de endotelio y de microvasos dentro del constructo de los diferentes grupos. Se detectaron diferencias a nivel de la íntima y en el interior del PTFEe, con un marcado más intenso de las células CD34 en el grupo del implante de CE (fig. 5b), pero estas diferencias en tinción no fueron estadísticamente significativas. Este marcador reveló que las células sembradas aparecieron en diferentes capas de la íntima y se vieron atrapadas por las propias células de la mioíntima. Los implantes de MF+CE mostraron un claro marcado de las células CD34, que reveló la presencia de cordones celulares y microvasos en el interior del constructo.

La expresión de la α -actina identifica la presencia de angiogénesis y células musculares lisas en regeneración. Su expresión en las prótesis control confirmó este aspecto, en particular en la adventicia, en cuya microvascularización se detectó un intenso marcado. Se observó el mismo patrón de expresión en todos los implantes, que estuvo confinado a la capa adventicia y a algunas células del interior de

la capa neoíntima en todos los grupos. No obstante, la magnitud de la expresión fue diferente, siendo la más elevada en los implantes de MF+CE debido a la presencia de una amplia red angiogénica (fig. 5c) y al mayor número de células de la mioíntima con este fenotipo, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

El perlecan, un proteoglicano de tipo heparán sulfato, es uno de los principales componentes de la pared vascular que se expresa de forma muy intensa en las CE de los microvasos. Se pudo observar su expresión por parte de los fibroblastos en algunas colonias de pequeño tamaño del grupo control. La expresión del perlecan estuvo restringida a la célula, mientras que los constructos mostraron el marcado del anticuerpo en las células de la adventicia, que delineaban claramente los haces de colágeno (fig. 5d). Solamente algunas células del interior del PTFEe, especialmente en los constructos sembrados con células, expresaron el fenotipo perlecan. El grupo control fue el que menos expresó el perlecan.

Lesión celular

Al comparar los porcentajes de células lesionadas se observó una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los grupos de CE y control (fig. 6).

En el grupo control se observó un leve marcado de la neoíntima, mientras que los valores más elevados se observaron en el biomaterial/adventicia. Los implantes de CE presentaron valores más elevados que el grupo control en las zonas de la neoíntima y la adventicia. En los implantes de MF+CE, las células positivas se distribuyeron de forma diferente, observándose más células marcadas en la íntima y

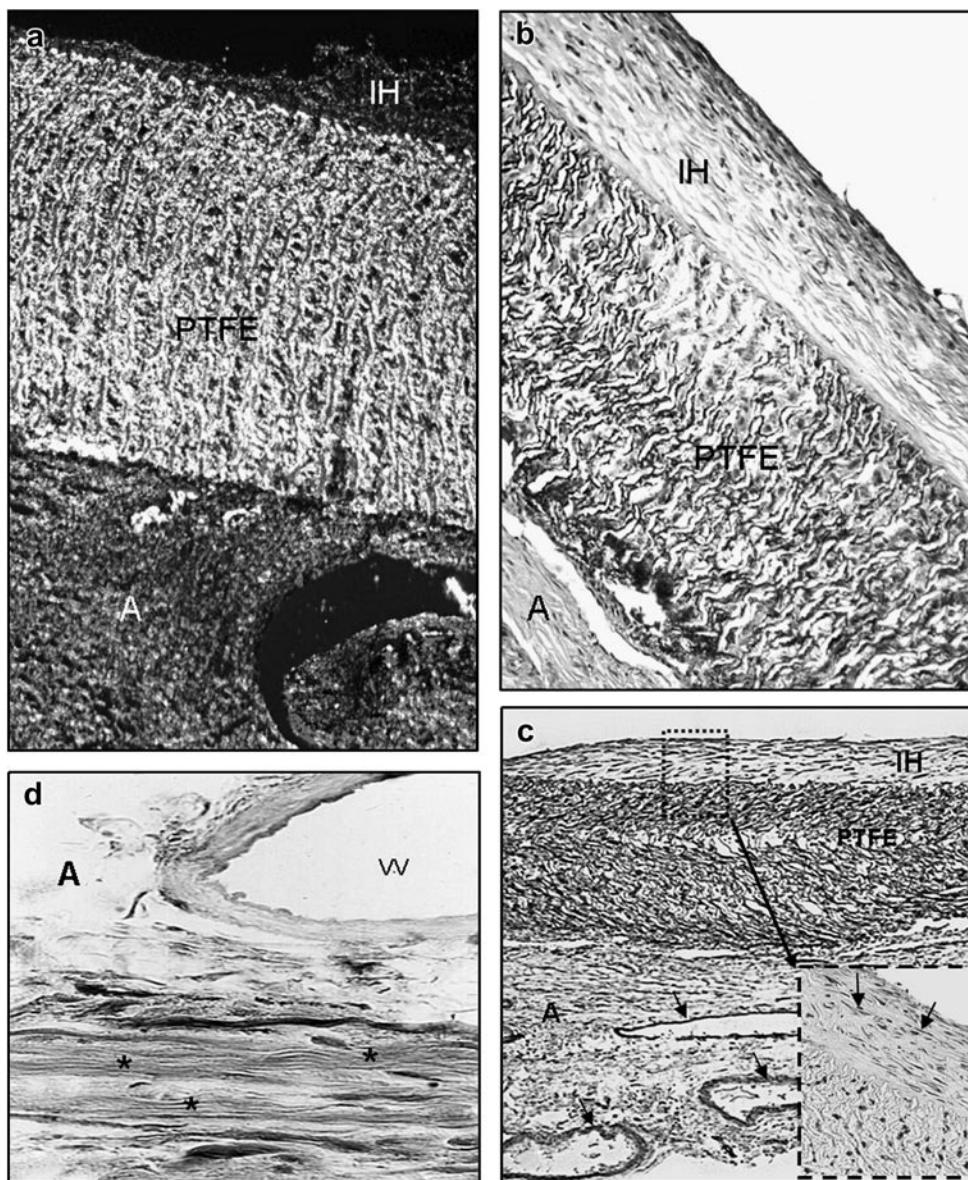


Fig. 5. **a** Tinción del componente fibrilar del colágeno. El colágeno tipo 1 aparece como fibras de color rojo intenso, y el colágeno tipo 3 se tiñe de color amarillo verdoso. Colágeno encapsulando el biomaterial. Grupo control (rojo sirio m.o. $\times 16$). **b** Células CD34 $^{+}$ (marrones) en los constructos de CE (anticuerpo antiCD34 m.o. $\times 20$). **c** expresión de la α -actina (\rightarrow) en los constructos de MF-CE predominante en la mioíntima (IH) y la adventicia (A) (anticuerpo anti α -actina m.o. $\times 10$). **d** Expresión del perlecan (*) entre las fibras de colágeno de la adventicia en los constructos de MF+CE (anticuerpo anti-perlecan m.o. $\times 40$). PTFE: politetrafluoroetileno; vv: vasos vasculares.

menos células en el interior del implante (fig. 6). El marcado de mayor intensidad observado en los implantes de CE se debió al mayor número de células positivas, tanto dentro del biomaterial (fig. 6) como en la adventicia.

DISCUSIÓN

A pesar de los numerosos esfuerzos realizados para mejorar las prótesis de pequeño calibre, en la

actualidad no existe ningún producto en el mercado que pueda compararse con el rendimiento de un implante de vena autóloga como sustituto arterial. Idealmente, los vasos "creados" mediante bioingeniería tisular deberían mostrar propiedades biológicas y biomecánicas similares a las de las arterias, aumentando así las probabilidades de lograr buenos índices de permeabilidad¹⁴.

En nuestro estudio logramos confirmar que, en cuanto a equivalentes vasculares, se logra una

Tabla I. Porcentaje de colágeno tipo 1 y 3 en los diferentes grupos de implantes después de 60 días de su colocación

	% colágeno tipo 1 (maduro)	% colágeno tipo 3 (inmaduro)
Control	57,72 ± 4,69*	16,48 ± 8,57
CE	49,36 ± 9,77*	15,55 ± 7,01
MF+CE	65,23 ± 5,02*	21,63 ± 8,85

CE: células endoteliales; MF+CE: matriz de fibroblastos sembrada con células endoteliales.

* $p < 0,05$ frente a colágeno tipo 3.

mayor eficiencia con los implantes que con las prótesis vasculares. La endotelización del implante, por tanto, parece ser un factor determinante para la viabilidad¹⁵. Una de las propiedades beneficiosas del PTFEe como prótesis vascular es su hidrofobicidad. Esta propiedad, no obstante, limita la adhesión de las CE en su superficie¹⁶. El endotelio desempeña un papel importante en el desarrollo de hiperplasia de la íntima, una respuesta que, junto con la trombosis, constituye la principal causa de fracaso de una prótesis vascular. En los implantes, las CE venosas se adaptaron perfectamente a la nueva situación y permanecieron estables y funcionales.

En el seguimiento realizado tras un período establecido de 2 meses, el proceso de reparación (hiperplasia de la íntima) debe estar en una fase en la que las respuestas celulares proliferativas y secretoras se hayan estabilizado y den lugar a la remodelación del tejido cicatricial. Así pues, escogimos este momento para realizar los estudios de implantación. Al parecer, existen muchos factores que contribuyen a la generación de este nuevo tejido, entre los que destacan los factores humorales y biomecánicos¹⁷. En nuestro estudio, la respuesta de la íntima fue evidente en todos los constructos. Se detectaron diferencias significativas entre los dos tipos de constructos celulares utilizados, los implantes de CE presentaron una estenosis menor que los constructos de MF+CE, de manera que fueron permeables durante más tiempo.

El comportamiento hiperplásico observado en estos constructos no es sorprendente si se considera que las CE sembradas en el PTFEe fueron células venosas en un entorno arterial, capaces de formar uniones homodiméricas estables con las moléculas de adhesión de las células endoteliales plaquetarias (PECAM-1) y de crecer en forma de multicapa¹⁸. Sin embargo, también es necesario considerar que nuestro animal de experimentación, el perro, tiene una rápida capacidad de endotelización, a diferencia de los seres humanos, de manera que debemos ser

prudentes a la hora de trasladar estos resultados a la clínica¹⁹.

Se han comprobado varios métodos diseñados para incrementar la adhesión de las CE, como la modificación de las propiedades fisicoquímicas o eléctricas de las prótesis²⁰ y el revestimiento previo de la superficie luminal con fibrina²¹ o el uso de células musculares lisas como sustrato para la siembra de las CE²². En un intento por mejorar la adhesión de las CE examinamos el uso de una matriz celular con características similares a las de la matriz subendotelial de los vasos originarios. Observamos una mejoría significativa de la adhesión celular en condiciones fisiológicas de flujo cuando las células se sembraron en una matriz de fibroblastos.

Cuando las CE se trasplantan al PTFEe, los leucocitos y fibroblastos colonizan el biomaterial. También detectamos células CD34 y CE con evidentes signos de degeneración, pero el patrón general de colonización fue similar al observado en los controles. Las diferencias más obvias se detectaron en los constructos de MF+CE, que presentaron una menor colonización celular, células que parecían degenerativas y podrían ser restos de fibroblastos, y células inflamatorias en el lado adventicial. Ciertamente, los constructos de CE son los que presentaron un mejor comportamiento.

Nuestra evaluación de la α -actina, que se expresa en la regeneración de las células musculares lisas, reveló la presencia de estas células en todas las capas, a excepción de la endotelial. Este hallazgo es bien conocido y se usa para distinguir las CE diferenciadas $CD34^+/\alpha$ -actina⁻ de sus progenitores más inmaduros que expresan ambos marcadores²³.

El colágeno permite la migración y la contracción de las células e interacciona con el entorno extracelular mediante el control de la diferenciación de las células musculares lisas y la expresión de la integrina. Inmediatamente después de una lesión en la pared vascular, aumenta el contenido en colágeno y su arquitectura cambia de forma gradual²⁴.

En los implantes de CE, la neoíntima mostró una distribución homogénea del colágeno de tipo 1 y 3. Dado que estos implantes también mostraron el porcentaje más elevado de células apoptóticas indicativas de remodelado, parece que la hiperplasia que se desarrolla en la superficie luminal es diferenciada, tanto en lo que se refiere a las células musculares lisas con un fenotipo contráctil como a la matriz de colágeno organizada y madura. Esta neoíntima puede describirse como “mioíntima madura”.

Se atribuye un papel cada vez más importante a la capa vascular más externa, la adventicia, en los procesos de herida/reparación vascular²⁵. En los implantes de PTFEe con uso clínico la encapsulación

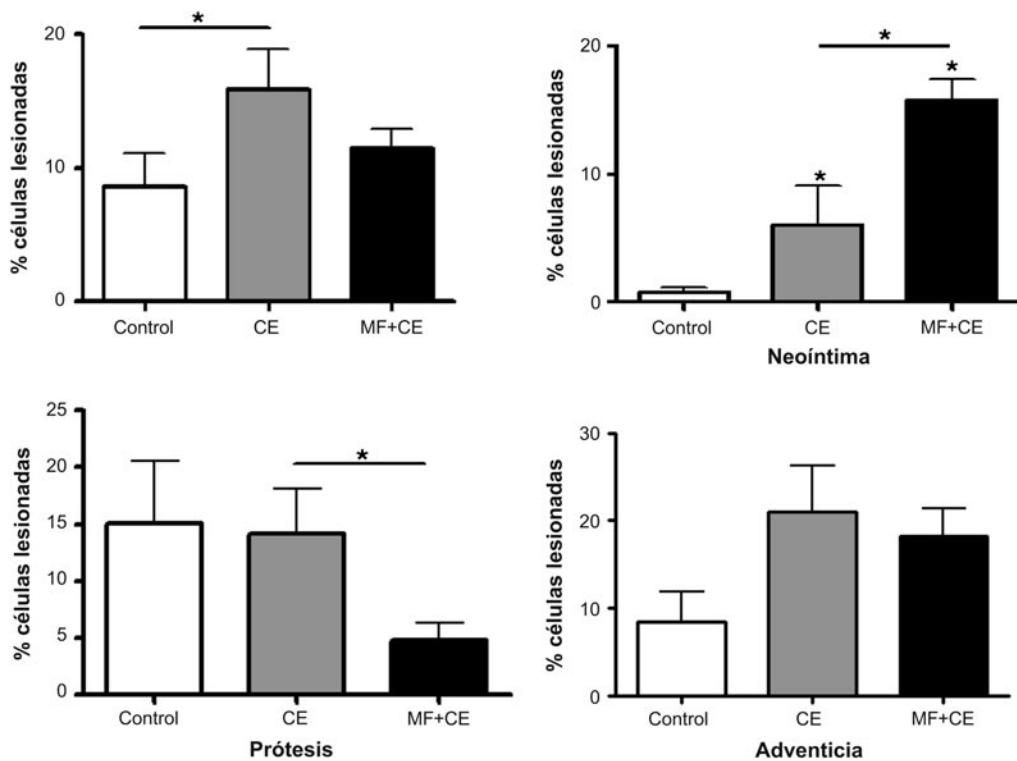


Fig. 6. Diferencias en los porcentajes de células TUNEL⁺ entre los 3 grupos de estudio (* $p < 0,05$) y porcentaje de células lesionadas en la neoíntima, el biomaterial y la capa adventicial en los 3 grupos de estudio (* $p < 0,05$). CE: células endoteliales; MF+CE: matriz de fibroblastos sembrada con células endoteliales.

externa del biomaterial puede ir acompañada, incluso, por adherencias firmes a los tejidos adyacentes, produciéndose un efecto constrictor en el biomaterial²⁶. Nuestros implantes indujeron el desarrollo de una cápsula adventicial, si bien destacamos que los constructos de MF+CE mostraron una mayor capacidad neoangiogénica que los restantes implantes.

Con respecto a la implicación de la adventicia en las reestenosis, algunos autores argumentan que los miofibroblastos contribuyen al desarrollo de la neoíntima²⁷. Así pues, se ha descrito una relación tanto directa como inversa²⁸ entre el contenido en colágeno de la adventicia y el grado de reestenosis.

Por último, la respuesta adventicia observada aquí muestra el papel interesante del perlecan. Los proteoglicanos son moléculas complejas que afectan en gran medida a las propiedades de la pared arterial, incluida la permeabilidad, viscoelasticidad, hemostasia, trombosis y organización de la matriz extracelular²⁹. Se cree que el perlecan tiene un efecto inhibidor sobre las células musculares lisas³⁰, un efecto antitrombótico³¹, y un efecto en la neoangiogénesis³², desempeñando un papel importante en la reparación arterial. En los constructos celulares se pudo detectar además de en las células musculares lisas, en la matriz

extracelular, lo que refleja una capa externa activa en los constructos.

Los procedimientos de ingeniería tisular, diseñados para mejorar los procesos de reparación mediante regeneración tisular, han tratado de minimizar las respuestas inmunitarias e inflamatorias del organismo receptor, acercándose al "sustituto vascular ideal". Ciertamente, los vasos obtenidos mediante bioingeniería y estudiados aquí fueron más eficientes a la hora de evitar la oclusión. Además, la reducción de la hiperplasia de la íntima fue significativa en los implantes de CE en comparación con los grupos restantes. Por tanto, nuestros dos implantes mostraron una permeabilidad clínica mejorada en comparación con el PTFE. El constructo de CE fue el mejor a la hora de hacer frente a la reestenosis, un buen indicador de la eficiencia a largo plazo de un implante.

Este estudio fue financiado por una beca del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS-SAF-92-8875).

BIBLIOGRAFÍA

1. Schemedlen RH, Elbjeirami WM, Gobin AS, West JL. Tissue engineered small-diameter vascular grafts. Clin Plast Surg 2003;30:507-517.

2. Daly CD, Campbell GR, Walker PJ, Campbell JH. Vascular engineering for bypass surgery. *Vascular engineering for bypass surgery. Expert Rev Cardiovasc Ther* 2005;4:659-665.
3. Harris JR, Seikaly H. Evaluation of polytetrafluoroethylene micrografts in microvascular surgery. *J Otolaryngol* 2002;31: 89-92.
4. Autieri MV. Regulating the regulators: transcription factors as targets for attenuating proliferative arteriopathies. *Drug News Perspect* 2003;16:149-158.
5. Bellón JM, Buján G, Honduvilla N, Hernando A, Navlet J. Behavior of cryopreserved endothelial cells in different phases. Their application in the seeding of vascular prostheses. *Ann Vasc Surg* 1995;9:266-273.
6. Kipshidze N, Dnagas G, Tsapenko M, et al. Role of the endothelium in modulating neointimal formation: vasculoprotective approaches to attenuate restenosis after percutaneous coronary interventions. *J Am Coll Cardiol* 2004;18:733-739.
7. Conte MS, VanMeter GA, Akst LM, Clemons T, Kashgarian M, Bender JR. Endothelial cell seeding influences lesion development following arterial injury in the cholesterol-fed rabbit. *Cardiovasc Res* 2002;53:502-511.
8. Herring M, Gardener A, Glover J. A single staged technique for seeding vascular grafts with autogenous endothelium. *Surgery* 1978;84:598-604.
9. Pasic M, Muller-Glauser W, Von Segesser L, Odermatt B, Lachat M, Turina M. Endothelial cell seeding improves patency of synthetic vascular grafts: manual versus automated method. *Eur J Cardiothorac Surg* 1996;10:372-379.
10. Bellón JM, García-Hondurilla N, Escudero C. Mesothelial versus endothelial cell seeding: evaluation of cell adherence to a fibroblastic matrix using ¹¹¹In oxine. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997;13:142-148.
11. Stansby G, Berwanger C, Shukla N, Hamilton G. Endothelial cell seeding of vascular grafts: status and prospects. *Cardiovasc Surg* 1994;2:254-258.
12. Schmidt CE, Baier JM. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. *Biomaterials* 2000;21:2215-2231.
13. Negoescu A, Lorimer P, Labat-Moleur F, et al. In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *J Histochem Cytochem* 1996;44:959-968.
14. Thomas AC, Campbell GR, Campbell JH. Advances in vascular tissue engineering. *Cardiovasc Pathol* 2003;12:271-276.
15. Durand E, Scoazec A, Lafont A, et al. In vivo induction of endothelial apoptosis leads to vessel thrombosis and endothelial denudation. *Circulation* 2004;109:2503-2506.
16. Hsu SH, Tsai IJ, Lin DJ, Chen DC. The effect of dynamic culture conditions on endothelial cell seeding and retention on small diameter polyurethane vascular grafts. *Med Eng Phys* 2005;27:267-272.
17. Gusic RJ, Myung R, Petko M, Gaynor JW, Gooch KJ. Shear stress and pressure modulate saphenous vein remodeling ex vivo. *J Biomech* 2005;38:1760-1769.
18. Pascual G, Escudero C, Rodríguez M, et al. Restoring the endothelium of cryopreserved arterial graft: co-culture of venous and arterial endothelial cells. *Cryobiology* 2004;49: 272-285.
19. Zilla P, Bezuidenhout D, Human P. Prosthetic vascular grafts: wrong models, wrong questions and no healing. *Biomaterials* 2007;28:5009-5027.
20. Boura C, Menu P, Payan E, et al. Endothelial cells grown on thin polyelectrolyte multilayered films: an evaluation of a new versatile surface modification. *Biomaterials* 2003;24: 3521-3530.
21. Meinhart JG, Schense JC, Schima H, et al. Enhanced endothelial cell retention on shear-stressed synthetic vascular grafts precoated with RGD-cross-linked fibrin. *Tissue Eng* 2005;11:887-895.
22. Yu H, Dai W, Yaung Z, et al. Smooth muscle cells improve endothelial cell retention on polytetrafluoroethylene grafts in vivo. *J Vasc Surg* 2003;38:557-563.
23. Lu X, Dunn J, Dickinson AM, Gillespie JL, Baudouin SV. Smooth muscle alpha-actin expression in endothelial cells derived from CD34⁺ human cord blood cells. *Stem Cells Dev* 2004;13:521-527.
24. Pickering JG. Regulation of vascular cell behaviour by collagen: form is function. *Circ Res* 2001;88:458-459.
25. Misra S, Doherty MG, Woodrum D, et al. Adventitial remodeling with increased matrix metalloproteinase-2 activity in a porcine arteriovenous polytetrafluoroethylene grafts. *Kidney Int* 2005;68:2890-2900.
26. George SJ, Izzat MB, Gadsdon P, et al. Macro-porosity is necessary for the reduction of neointimal and medial thickening by external stenting of porcine saphenous vein bypass grafts. *Atherosclerosis* 2001;155:329-336.
27. Christen T, Bochaton-Piallat ML, Neuville P, et al. Cultured porcine coronary artery smooth muscle cells. A new model with advanced differentiation. *Circ Res* 1999;85: 99-107.
28. Lafont A, Durand E, Samuel JL, et al. Endothelial dysfunction and collagen accumulation: two independent factors for restenosis and constrictive remodeling after experimental angioplasty. *Circulation* 1999;100:1109-1115.
29. Perrimon N, Bernfield M. Specificities of heparan sulphate proteoglycans in development processes. *Nature* 2000;404: 725-728.
30. Garl PJ, Wenzlau JM, Walter HA, Whitelock JM, Costell M, Weiser-Evans MC. Perlecan-induced suppression of smooth muscle cell proliferation is mediated through increase activity of the tumor suppressor PTEN. *Circ Res* 2004;94: 175-183.
31. Weitz JI. Heparan sulfate: antithrombotic or not? *J Clin Invest* 2003;111:952-954.
32. Zachary I, Mathur A, Yla-Hertuala S, Martin J. Vascular protection: a novel nonangiogenic cardiovascular role for vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1512-1520.