

Siembra de células endoteliales porcinas sobre un substrato de polietetrafluoroetileno (PTFE). Estudio experimental¹

J. M. Bellón Caneiro* - J. Buján Varela** - J. Navlet Armenta** - M. C. Gianonatti Alias** - A. Hernando Fraile*** - N. García Honduvilla*** - F. Turégano Fuentes****

Departamento de Ciencias Morfológicas y Cirugía.
Facultad de Medicina. Universidad de Alcalá de Henares,
Madrid (España)

RESUMEN

El endotelio en la pared vascular constituye una túnica natural antitrombogénica en íntimo contacto con el torrente sanguíneo.

La sustitución de vasos de pequeño calibre con prótesis artificiales no ha tenido el éxito esperado, debido fundamentalmente a la ausencia de endotelización en el material protésico.

El poder recubrir estos materiales con una superficie celular, previo al implante, podría solventar este problema. Por ello en este trabajo, nos planteamos la obtención de una monocapa endotelial estable «in vitro» como paso previo a su implante en una prótesis vascular «in vivo».

Hemos estudiado la influencia de la fibronectina, en sus papeles de mediador entre el substrato y la célula endotelial y su comportamiento cuando se añade al medio de cultivo. Nuestros resultados demuestran que, aunque la fibronectina ejerce un efecto favorable cuando se utiliza como pegamento biológico, en el tratamiento de las prótesis previo a la siembra, posteriormente al añadirla al medio de cultivo, parece ejercer un efecto tóxico sobre la adhesión y supervivencia de las células endoteliales.

SUMMARY

The endothelium of the vascular wall represents a natural antithrombogenic layer in intimal contact with the bloody flow.

The waited success of the artificial prosthesis as replacers of minor vessels was not reached. Basically, its poor results were caused by the lack of endotelization on the prosthesical material.

A cellular lap on the prosthesis, previously to the implant, could be a good resolution to this problem. In we studied the possibility to obtain a stable, endotelial monolayer «in vitro» before to the «in vivo» implant of the vascular prosthesis.

We studied the role of fibronectine as a mediator between the substract and the endotelial cell. Changes on fibronectine when it is added on the culture medium were also analized. Although fibronectine has some positive effects as a biologic «glue» previously to the implant to the prosthesis, our results show that after the implant, fibronectine could cause a toxic effect on the adherence and survival of the endotelial cells.

Introducción

La siembra de células endoteliales sobre prótesis vasculares tiene como objetivo la búsqueda de un recubrimiento natural, en forma de monocapa endotelial, que evite el fracaso del material protésico de pequeño calibre implantado en territorios vasculares patológicos. Con ello se obviarían complicaciones inmediatas debidas fundamentalmente a trombosis (1), así como podría impedirse el desencadenamiento de una respuesta en forma de hiperplasia intimal (2).

Numerosos trabajos, tanto experimentales (3, 4, 5, 6) como, últimamente, clínicos (7, 8, 9) han sido publicados en los últimos 12 años, des de que **Herring y cols.** (10) en 1978 comunicaran sus primeros resultados sobre la siembra de las células endoteliales en una prótesis de Dacron.

Los estudios «in vitro» son necesarios para conocer el comportamiento de la célula endotelial sobre los distintos materiales protésicos utilizados en clínica humana. Así, todavía quedan muchos problemas por resolver, tales como: a) origen y fuente idónea de obtención de las células endoteliales destinadas a la siembra; b) factores que favorecen

* Prof. Titular de Cirugía.

** Prof. Titular Ciencias Morfológicas.

*** Becarios (Medicina, Biología).

**** Médico Adjunto de Cirugía. Hosp. Gregorio Marañón (Madrid).

(1) El presente trabajo ha sido realizado con las ayudas de investigación FISS 91/0175 y M-66 (U.A.H.).

la adhesión al substrato protésico; c) morfología y función de esas células en contacto con el material sintético; d) renovación de dichas células y e) evolución a largo plazo de las mismas post-siembra.

Conocer todos estos datos sería de gran importancia antes de llevar a cabo el implante de las prótesis sembradas y su exposición al flujo sanguíneo, donde otros muchos factores sabemos que van a conducir al éxito o al fracaso del recubrimiento deseado.

Dentro de esta línea de investigación, nos hemos planteado un estudio experimental «*in vitro*» con células endoteliales procedentes del cerdo, sembradas en material protésico de PTFE (porosidad 30 μm), como primer paso antes de implantar dichas prótesis en este animal de experimentación. Trataremos con ello de encontrar el momento idóneo para, según la monocapa endotelial establecida con las células endoteliales sembradas, obtener los mejores resultados con el implante protésico.

Material y métodos

1. Obtención de las células endoteliales

La obtención de células endoteliales se realizó a partir de las venas yugulares externas del cerdo (variedad mini-pig). Los animales, una vez anestesiados, eran simetridos a cervicotomía, disecando meticulosamente ambas yugulares externas, ligando todas sus colaterales, y canulando sus dos extremos en el mismo acto operatorio, siendo posteriormente introducidas en MEM, para su transporte al laboratorio. Las venas fueron entonces procesadas en una cámara de flujo laminar en condiciones de máxima esterilidad siendo lavadas y posteriormente rellenas con una solución de collagenasa II al 0,1%, dejando actuar la misma durante 15 minutos en es-

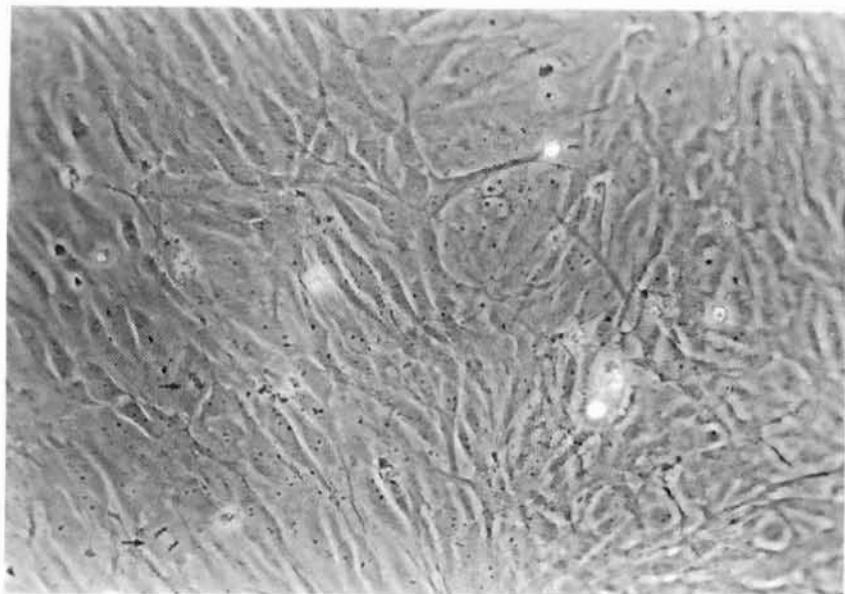


Fig. 1 - Cultivo de células endoteliales. Se observan mitosis (→). 20X.

tufa a 37°C. A continuación, previo lavado, fue recogido el contenido venoso en medio de cultivo y centrifugado. El precipitado fue resuspendido en M-199 suplementado y depositado en recipientes de siembra y estufa de CO₂. El medio de cultivo fue renovado cada 2 días. Cuando se establecía una monocapa celular sobre toda la base del recipiente de siembra, se realizaban subcultivos, llevando a cabo las siembras a partir de estos subcultivos primarios. Posteriormente, las células endoteliales procedentes de los subcultivos eran levantadas de la placa de siembra con una solución de tripsina, siendo concentradas de nuevo en M-199, extrayendo una muestra que sirvió para realizar un conteo del número de células, realizando dicho conteo en una cámara Neumbarer.

La identificación de las células endoteliales se realizó mediante procedimiento inmunohistoquímico, utilizando la detección de anticuerpos CD 10 de mono y el método conjugado biotina-avidina post-identificación con naftol esterasa (Budd y cols.) (5).

2. Material protésico

El tipo de prótesis vascular utilizado para la siembra ha sido el polietrafluoroetileno expandido (PTFE) de 5 mm de diámetro interno y 30 μm de porosidad. La prótesis fue abierta longitudinalmente y seccionada en pequeños cuadrados de 1,5 cm de lado, los cuales eran introducidos entre el tope y un pequeño segmento de la parte superior de un tubo Ependorf, con objeto de poder esterilizar el pequeño fragmento de PTFE y que el mismo ofreciera además una superficie circular sobre la que sembrar las células endoteliales. Las pequeñas muestras de PTFE, previa esterilización en óxido de etileno, quedaban de esta forma preparadas para ser sembradas.

3. Diseño experimental

El material protésico fue sembrado en todos los casos partiendo de una concentración de 2 a 5 millones/mm³ de células endoteliales, depositando con una micropipeta una cantidad de 0,2 ml.

Se realizaron las siembras de dos modos diferentes:

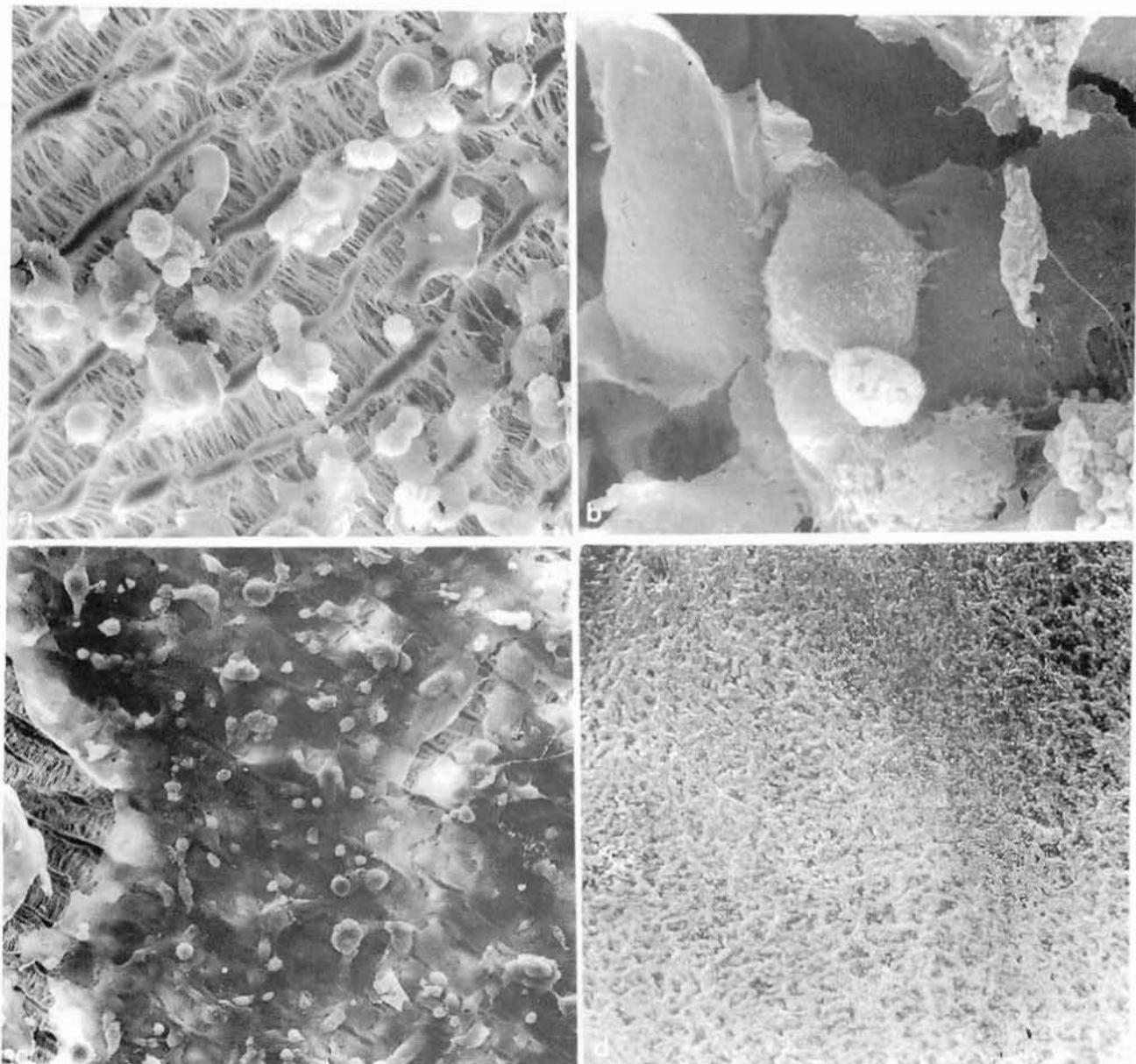


Fig. 2 - Grupo A-1: a) Siembra de células endoteliales a los 10 minutos. 500 X. b) Cambio de la morfología celular durante la adhesión. 2000 X. c) Lámina de células endoteliales a las 2 horas. 200 X. d) Disco de PTFE totalmente cubierto por células endoteliales. 16X.

A₁ — Tratamiento del PTFE con fibronectina (20 μ g/ml) durante 15 minutos previa a la siembra.

A₂ — Tratamiento del PTFE con fibronectina (20 μ g/ml) durante 15 minutos previa a la siembra y adición al medio de cultivo cada vez que éste era renovado.

Los tiempos de estudio han sido: 10 minutos, 1 hora, 2 horas, 18 horas, 24 horas, 40 horas, 4 días, 7 días y 10 días.

Se obtuvieron muestras de los dos grupos, las cuales fueron fijadas en glutaraldehido al 3% durante 18 horas, posteriormente pasadas a tampón **Milloning** pH 7,3; deshidratadas en series graduales de acetonas,

obteniendo a continuación el punto crítico en un **Polaron** E-300 con CO₂, metalizadas en oro paladio y observadas en un microscopio electrónico de barrido **Zeiss** 590 DSM.

Resultados

Las células endoteliales procedentes de la vena yugular de cerdo, crecen en los frascos de cultivo for-

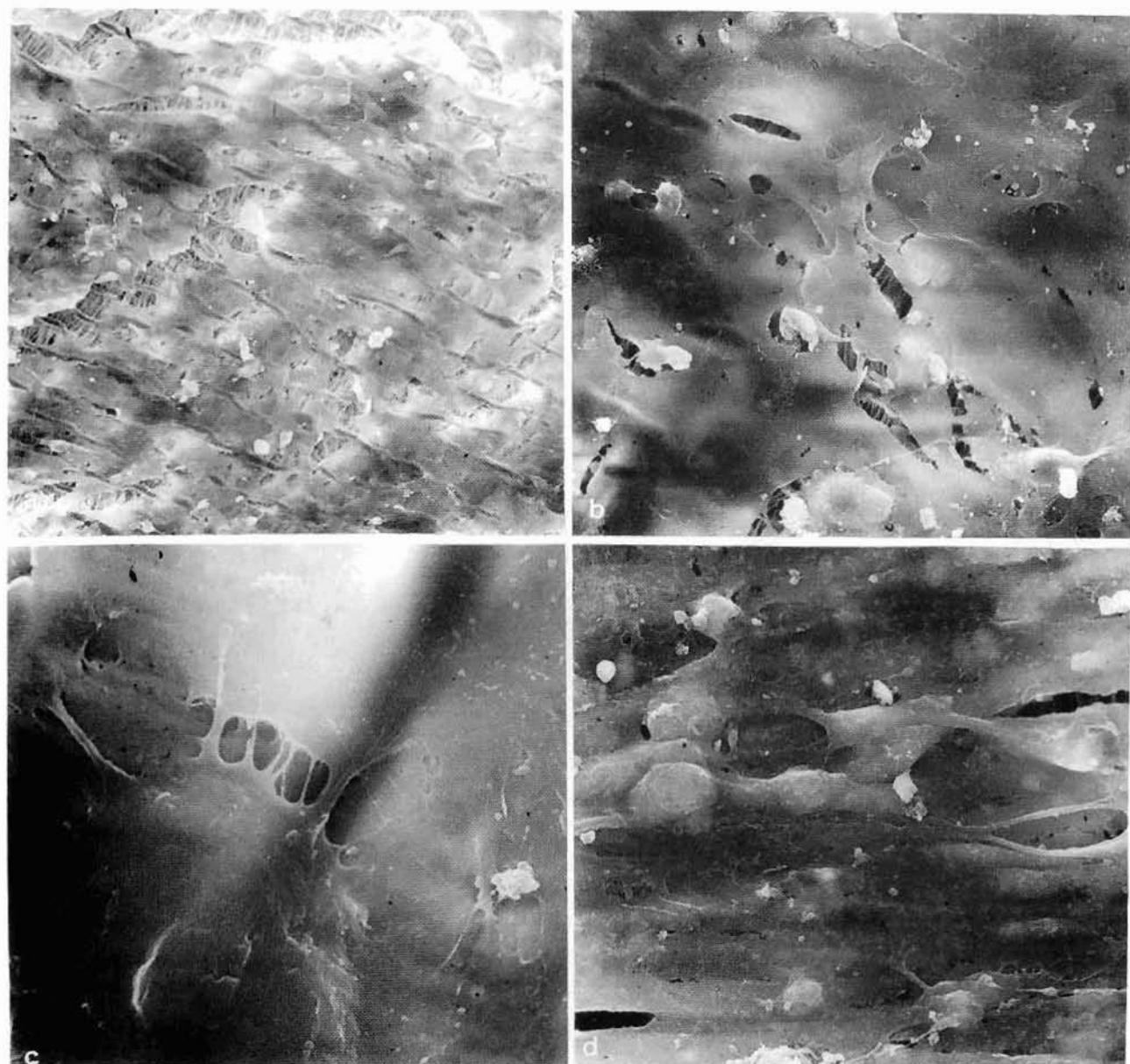


Fig. 3 - Grupo A-1: a) Monocapa endotelial estable a las 24 horas. 200X. b) Lámina continua a las 48 horas. 500X. c) Puentes intercitoplasmáticos a los 4 días. 2500X. d) Alargamiento de la lámina celular. 1000X.

mando una monocapa confluyente, pudiendo incluso a veces observarse células en un estrato superior, visualizándose figuras mitóticas (Fig. 1).

Grupo A-1 (Siembra sobre substrato tratado con fibronectina).

La primera muestra, tomada a los diez minutos de realizada la siembra, permite observar un gran nú-

mero de células sobre el disco de PTFE. Predominan todavía células de forma esférica, indicando que no se han adherido al substrato. Otras, en cambio, ya han modificado su morfología, volviéndose de forma poligonal plana, con prolongaciones pseudopódicas que preferentemente emiten hacia los nodos de la malla de PTFE para así poder adherirse mejor (Fig. 2a).

A los 60 minutos ya se observan algunos grupos de células muy adheridas y de forma característica, junto a otras que presentan una superficie burbujeante y microvellosidades, indicando cambios en su citoesqueleto para su desplazamiento en busca de adhesión al substrato de PTFE (Fig. 2b). Dos horas después, las láminas celulares sobre el PTFE son muy evidentes y apenas se ob-

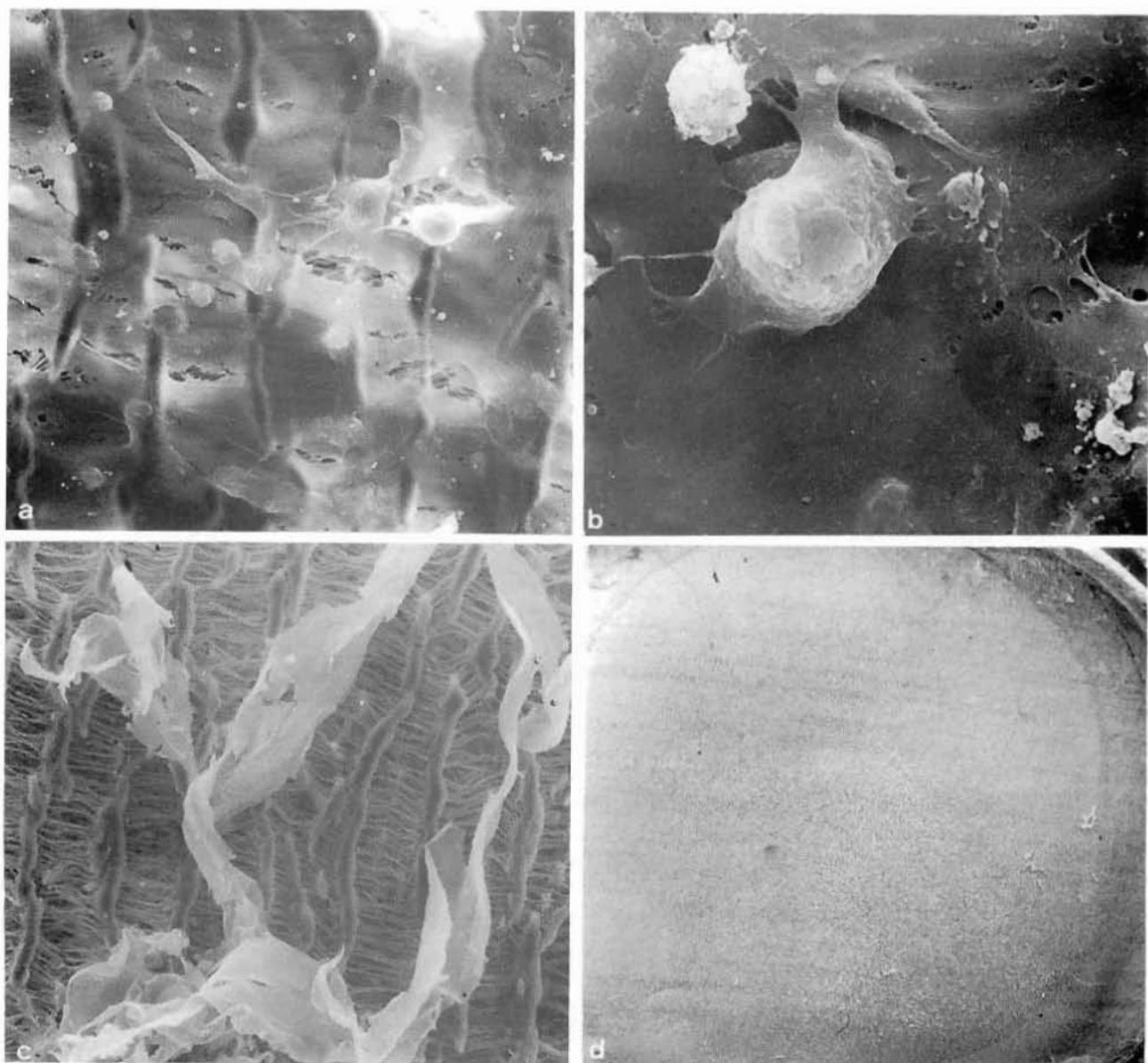


Fig. 4 - Grupo A-2: a) Monocapa confluyente a las 48 horas. 500X. b) Célula adosada mediante prolongaciones pseudopódicas a un estrato celular subyacente. 2000X. c) Trabéculas celulares levantándose del substrato de PTFE a los 7 días. 400X. d) Panorámica del disco de PTFE, no observándose láminas adheridas al substrato. 12X.

servan zonas de prótesis sin cubrir. Ya a pequeños aumentos se distingue perfectamente una cubierta celular formada por células planas poligonales y sobre ella todavía se observan algunas células endoteliales subyacentes (Fig. 2c).

Una panorámica de PTFE (Figura 2d) a las 18 horas, para observar la gran profusión celular que abarca toda la superficie, no presenta

áreas de exposición de la malla protésica, por tanto en este estadio podemos considerar que ya se establece una cubierta celular óptima de sembrado.

A las 24 horas, la superficie sembrada presenta un aspecto menos abigarrado, con el establecimiento de una monocapa celular. Las células forman un solo estrato y apenas se distinguen las uniones celulares

(Fig. 3a). Esta monocapa se mantiene estable durante las 48 horas (Fig. 3b). A las 96 horas, en alguna zona a grandes aumentos, se pueden observar puentes citoplasmáticos de unión intercelular (Fig. 3c). La estabilidad observada hasta los 4 días comienza a perderse, traduciéndose en la aparición de la malla de PTFE entre las láminas celulares. Hay que destacar el discreto cam-

bio en la morfología celular, donde las células a los 7 días muestran un aspecto más elongado y no tan poligonal (Fig. 3d).

En el último estadio estudiado, que corresponde a los 10 días de la siembra, apenas si se observan algunas células sobre la malla de PTFE.

Grupo A-2 (Adición de fibronectina cada vez que se renueva el medio).

Dado que los medios se renuevan diariamente, el primer estadio estudiado es a las 48 horas y en este tiempo no se observan diferencias con el grupo anterior (Fig. 4a). Las células endoteliales forman láminas confluentes y en algunas áreas se observan biestratos celulares con imágenes similares a las observadas en los cultivos primarios de células endoteliales. Tampoco se observan diferencias significativas a los 4 días (Fig. 4b). Pero a partir de este estadio, se observa un efecto negativo de la adición de fibronectina, ya que el proceso de desanclaje al substrato es mayor y, así, a los 7 días la superficie sembrada se halla cubierta por muy pocas células que forman láminas alargadas y parcialmente libres sobre la malla de PTFE (Figura 4c); y a los 10 días, como en el caso anterior y en una panorámica, sólo se aprecian células individuales con algunos restos celulares (Fig. 4d).

Discusión

En la búsqueda del sustituto vascular más adecuado para vasos de pequeño calibre, se han ensayado gran número de prótesis de diferentes biomateriales. Estos han fracasado, no por la falta de biocompatibilidad, sino porque su implante no va seguido de un recubrimiento endotelial (11); éste es un factor necesario e indispensable para evitar el fracaso quirúrgico, sobre todo debido

a trombosis. Todo ello ha motivado que gran parte de las investigaciones se hayan dirigido a intentar encontrar el método más eficaz que permita un recubrimiento endotelial en dichos materiales protésicos.

Los estudios «in vitro» son un primer paso importante para obtener, en condiciones estacionarias, una capa celular estable sobre las prótesis vasculares. Estos estudios todavía no han resuelto algunas cuestiones importantes y básicas, que son: el método ideal para la obtención de las células endoteliales, el momento óptimo para la siembra de las mismas y la adherencia al substrato de las células sembradas.

Aunque tanto los métodos mecánicos (12) como enzimáticos (13, 14) permiten obtener células viables, posiblemente haya alteraciones funcionales que no permiten su estabilidad a largo plazo. Por otro lado el momento ideal para la siembra constituye otro problema, ya que el mismo puede ser efectuado de una forma inmediata a la extracción de las células o bien, más tarde, procedentes de subcultivos. También es importante saber cuál es el momento idóneo en los mencionados subcultivos para realizar la siembra, pues indudablemente una célula en cultivo se altera y se adapta a las condiciones del nuevo medio en el que se desarrolla y, así, se han descrito alteraciones en la expresión de sus proteínas antigenicas, secreción de ciertas enzimas, etc. (16, 17).

En nuestro diseño experimental hemos obtenido con resultados satisfactorios, células endoteliales procedentes de la vena yugular externa del cerdo, procediendo con éxito a su cultivo. Posteriormente, hemos subcultivado dichas células y realizado la siembra en el momento del segundo subcultivo, aunque en la literatura el número de los mismos es mayor, en general entre 3 y 10 (18). En nuestra opinión no es necesario dilatar tanto tiempo este proceso,

pues el comportamiento de la célula endotelial, por lo menos en el caso de las células porcinas, es exuberante, estableciéndose rápidamente una monocapa confluyente e incluso, en ocasiones, se puede observar la existencia de multiestratos, lo que conlleva al levantamiento de las células del cultivo y a la invalidación del experimento.

Otro problema importante, como ya mencionamos, es el de la adherencia al substrato, relacionado estrechamente con las propiedades físico-químicas de los materiales utilizados para la fabricación de las prótesis vasculares. Así, se incluyen: la carga negativa, la capacidad de impermeabilización y la porosidad de las mismas (19, 20, 21). Estas propiedades van a conferir una de las cualidades más importantes de las prótesis, que es la antiadherencia para evitar la trombosis al paso del flujo sanguíneo. Es precisamente éste un factor que incluye negativamente en el proceso de la siembra de células endoteliales.

Así, nosotros hemos comprobado (22, 23), al igual que otros autores (24), la dificultad de adhesión de las células a la trama de PTFE. Por ello, para mejorar la adherencia al substrato, se ha intentado la utilización de algún tipo de material que favorezca la adhesión celular. Dentro de éstos, han sido utilizadas diferentes sustancias, como fibronectina, laminina, colágeno, etc. (25, 26).

Desde los trabajos de **Ramalan-Jaona y cols.** (27), en los cuales describían la falta de producción endógena de fibronectina por las células endoteliales cuando éstas son levantadas de su medio habitual, se conoce la necesidad de añadir de modo complementario dicha sustancia.

De nuestros resultados se desprenden tres hechos: a) la fibronectina no es suficiente para mantener a la célula endotelial adherida largo tiempo; b) el pretratamiento del subs-

trato con fibronectina favorece la adhesión de la célula endotelial en el momento de la siembra; c) la adición suplementaria de fibronectina en cada renovación del medio de cultivo, parece ejercer, sin embargo, un efecto negativo sobre la adhesión celular, pudiendo observarse trabéculas celulares levantadas sobre la lámina de PTFE.

BIBLIOGRAFIA

- SHAREFKIN, J. B.; LATKER, C.; SMITH, M.; CRUESS, D.; CLAGETT, P.; RICH, N. M.: Early normalization of platelet survival by endothelial seeding of Dacron arterial prostheses in dogs. «Surgery», 1982, 92: 385-393.
- HERRING, M. B.: Endothelial seeding of vascular Prostheses. «Ann. Vasc. Surg.», 1989, 3: 95.
- ANDERSON, J. S.; PRICE, T. M.; HARRISON, S. R.; HARKER, L. A.: In vitro endothelialisation of small-caliber vascular grafts. «Surgery», 1987, 101: 577-586.
- GOUREVITCH, D.; JONES, C. E.; CROCKER, J.; GOLDMAN, M.: Endothelial cell adhesion to vascular prosthetic surfaces. «Biomaterials», 1988, 9: 97-100.
- BUDD, J. S.; BELL, P. R. F.; JAMES, R. T. L.: Attachment of indium-111 labeled endothelial cells to pre-treated polytetrafluoroethylene vascular grafts. «Br. J. Surg.», 1989, 76: 1259-1261.
- KENT, K. C.; OSHIMA, A.; IKAMOTO, T.; WHITTEMORE, A. D.: An in vitro model for human endothelial cell seeding of a small diameter vascular graft. «Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs», 1988, 34: 578-580.
- HERRING, M.; GARDNER, A.; GLOVER, J.: Seeding human arterial prostheses with mechanically driven endothelium. The detrimental effect of smoking. «J. Vasc. Surg.», 1984, 1: 279-289.
- WALKER, M. G.; THOMSON, G. L.; SHAW, J. W.: Endothelial cell seeded versus non-seeded ePTFE grafts in patients with severe peripheral vascular disease. In: ZILLA, P.; FASOL, R. D.; DEUTSCH, M. Eds. «Endothelialisation of Vascular Grafts». Basle: Karger, 1987, 245-248.
- ORTENWALL, P.; WADEVIK, H.; KUTTI, J.; RISBERG, B.: Endothelial cell seeding reduces thrombogenicity of Dacron grafts in humans. «J. Vasc. Surg.», 1990, 11: 403-410.
- HERRING, M. B.; GARDNER, A. L.; GLOVER, J.: A single staged technique for seeding vascular grafts with autologous endothelium. «Surgery», 1978, 84: 498-504.
- BERGER, K.; SAUVAGE, L. R.; RAO, A. M.; WOOD, S. J.: Healing of arterial prostheses in man: its incompleteness. «Ann. Surg.», 1972, 175: 188-127.
- BALCONI, G.; DEJANA, E.: Cultivation of endothelial cells: limitations and perspectives. «Med. Biol.», 1986, 64: 231-245.
- GRAHAM, L. M.; VINTER, D. W.; FORD, D. W.; KAHN, R. H.; BURKE, W. E.; STANLEY, J. C.: Cultured autogenous endothelial cell seeding of prosthetic vascular grafts. «Surg. Forum», 1979, 30: 204-206.
- GRAHAM, L. M.; VINTER, D. W.; FORD, J. M.; KAHN, R. H.; BURKE, W. E.; STANLEY, J. C.: Endothelial cell seeding of prosthetic vascular grafts. Early experimental studies with cultured autologous canine endothelium. «Arch. Surg.», 1980, 115: 929-933.
- MISCHECK, V.; MEYER, J.; GALLA, H. J.: Characterization of gamma-glutamyl transpeptidase activity of cultured endothelial cells from porcine brain capillaries. «Cell Tissue Res.», 1989, 256: 221-226.
- DEJANA, E.; LAMPUGNANI, M. G.; GIORGI, M.; GABOLI, M.; MARCISIO, P. C.: Fibrinogen induces endothelial cell adhesion and spreading via the release of endogenous matrix proteins and the recruitment of more than one integrin receptor. «Blood», 1990, 75: 1509-1517.
- WACHEM VAN, P. B.; REINDERS, J. H.; BUUL-WORTELBOER VAN, M. F.; GROOT, P. G.; AKEN, W. G.; MOURIK, J. A.: Von Willebrand factor in cultured human vascular endothelial cells from adult and umbilical cord arteries and veins. «Trombosis and Haemostasis», 1986, 56: 189-192.
- MARTIN-MONDIERE, C.; DAVID, P. H.; LOISANCE, D.: Polyurethane arterial prostheses experimental evaluation. «Ann. Vasc. Surg.», 1990, 4: 52-55.
- WACHEM VAN, P. B.; BEUGELING, T.; FEIJEN, J.; BANTJES, A.; DEMENRS, J. P.; AKEN VAN, W. G.; Interaction of cultured human endothelial cells with polymeric surfaces of different wettabilities. «Biomaterials», 1985, 6: 403-408.
- CLOWES, A. W.; KIRKMAN, T. R.; REIDY, M. A.: Mechanism of arterial graft healing. Rapid transmural capillary ingrowth provides a source of intimal endothelium and smooth muscle in porous PTFE prostheses. «Am. J. Pathol.», 1986, 123: 220-223.
- GOLDEN, M. A.; STEPHEN, R. H.; KIRKMAN, B. A.; SCHNEIDER, P. A.: Healing of polytetrafluoroethylene arterial grafts is influenced by graft porosity. «J. Vasc. Surg.», 1990, 11: 838-845.
- HERNANDO, A.; BELLON, J. M.; BUJAN, M. J.; NAVLET, J.; GIANONATTI, M. C.: Endothelial cell seeding on plate vascular prostheses of polytetrafluoroethylene (PTFE). XVII European Federation Congress I.C.S. Amsterdam (Holanda), 1991, pp. 152.
- BELLON CANEIRO, J. M.; BUJAN VARELA, M. J.; NAVLET ARMENDA, J.; HERNANDO ALONSO, A.; GIANONATTI ALIAS, M. C.; LOPEZ ALONSO, A.: Estudio in vitro de la siembra de células endoteliales en prótesis vasculares de polietrafluoroetileno (PTFE), utilizando la fibronectina como medio adherente. «Cir. Esp.» (en prensa).
- FOXAL, T. L.; AUNGER, K. R.; CALLOW, A. D.; LIBBY, P.: Adult human endothelial cell coverage of small-caliber Dacron and polytetrafluoroethylene vascular prostheses in vitro. «J. Surg. Res.», 1986, 41: 158-172.
- VOHRA, R. K.; THOMSON, G. J. L.; CARR, H. M. H.; SHARMA, H.; WALKER, M. G.: Comparison of different vascular prostheses and matrices in relation to endothelial seeding. «Br. J. Surg.», 1991, 78: 417-420.
- VO, N. M.; ARBOGAST, L.; ARBOGAST, B.; STANTON, P. E.: Effect to precoating agents on seeded venous grafts. «J. Cardiovasc. Surg.», 1989, 30: 604-608.
- RAMALANJAONA, G.; KEMP-CZINSKY, R. F.; ROSENMAN, J. E.; DOUVILLE, E. C.; SILBERSTEIN, E. B.: The effect of fibronectin coating on endothelial cell kinetics in polytetrafluoroethylene grafts. «J. Vasc. Surg.», 1986, 3: 264-272.