
Mejora de la retención celular tras la siembra de células mesoteliales sobre una matriz fibroblástica en prótesis vasculares de politetrafluoroetileno. Influencia del flujo sanguíneo en un circuito «ex-vivo» (*)

Improved cell retention after seeding mesothelial cells on polytetrafluoroethylene vascular prostheses with a fibroblastic matrix. Influence of blood flow on an «ex vivo» circuit

J. Buján - N. G.^a-Honduvilla - M.^a J. Gimeno - C. Escudero - F. Minguela - L. Contreras - J. Navlet - J. M. Bellón

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

RESUMEN

En el presente trabajo hemos realizado un estudio del comportamiento de células mesoteliales (CM) de epiplón, sembradas sobre una matriz fibroblástica en prótesis vasculares de politetrafluoroetileno (PTFE), tras su interposición en un circuito «ex vivo», utilizando como animal de experimentación perros de raza Mongrel. Se diseñaron dos grupos de estudio: Grupo Control: CM sembradas sobre prótesis vasculares sin matriz fibroblástica; Grupo Experimental: formado por prótesis sembradas con CM sobre matriz fibroblástica. En ambos grupos, las células fueron marcadas con oxinato de In¹¹¹ (50 µCi/ml) antes de ser sembradas. Después de la siembra, una vez formada la monocapa sobre PTFE, aproximadamente a las 24 h., las prótesis fueron interpuestas en el circuito «ex vivo». La velocidad de flujo a que fueron sometidas dichas prótesis fue de 117,5±12,50 ml/min a la entrada de las prótesis y de 72,6±14,3 a la salida. El número de células adheridas a la matriz fue suficientemente elevado como para asegurar un alto grado de recubrimiento de la superficie protésica antes de su interposición en el circuito (77,25±9,36 % para el grupo de prótesis sembradas con CM previa interposición de una matriz fibroblástica). Tras la acción del flujo se observó una pérdida, tanto de marcaje celular como de la superficie protésica cubierta,

siendo estos parámetros significativamente superiores en el grupo en el que se sembró sobre la matriz fibroblástica en comparación con el grupo control.

A la vista de los resultados, podemos considerar que el comportamiento de las CM, tras la acción del flujo sanguíneo, mejoró tras la interposición de una matriz fibroblástica sobre la superficie protésica, previa a la siembra celular.

SUMMARY

The behavior of mesothelial cells (MC) from omentum seeded on polytetrafluoroethylene (PTFE) vascular prostheses coated with a fibroblastic matrix and interposed in an «ex vivo» circuit in Mongrel dogs was studied. Two study groups were designed: Control group: MC seeded on PTFE vascular prostheses not coated with a fibroblastic matrix, and Experimental group: MC seeded on PTFE vascular prostheses coated with a fibroblastic matrix. In both groups, cells were marked with ¹¹¹In oxinate (50 µCi/ml) before seeding. Once a single-cells-thick layer had formed on the PTFE prosthesis (about 24 h. after seeding), the prostheses were interposed in the «ex vivo» circuit. The rate of blood flow to which the prostheses were exposed was 117.5±12.50 ml/min at point of inflow and 72.6±14.3 ml/min at point of outflow.

The number of cells adhered to the matrix was sufficient to ensure a high proportion of coverage of the prosthetic surface before interposition in the «ex vivo» circuit (77.25±9.36 % for the group of MC seeded on prostheses coated with a fibroblastic matrix).

After exposure to blood flow, cell making and prosthetic surface coverage decreased. The decrease in both parameters was significantly smaller in the experimental group

* Trabajo realizado con una Ayuda de Investigación CICYT SAF 92-0875 y FISSS 94-0033

in which MC were seeded on prostheses coated with a fibroblastic matrix than in the control group.

These results show that the interposition of a fibroblastic matrix on the prosthetic surface before cell seeding improved the behavior of MC after exposure to blood flow.

Introducción

El alto índice de fracaso observado en humanos tras la interposición de prótesis vasculares de mediano y pequeño calibre en zonas de bajo flujo vascular, llevó a algunos investigadores a proponer la posibilidad de revestir la superficie luminal del material protésico con una capa celular lo más parecida posible a la presente en el lecho vascular y que evitase, en la medida de lo posible, los fenómenos de trombosis que presentaban este tipo de prótesis (1).

La estirpe celular más utilizada para la realización de las siembras de prótesis vasculares ha sido la célula endotelial. Mayoritariamente dichas células han sido extraídas de Cordón umbilical de humanos y de Vena Yugular en el caso de animales de experimentación. El bajo número de células obtenido de estas fuentes (2) ha hecho que, desde hace algún tiempo, los estudios vayan encaminados a la búsqueda de una fuente alternativa de células capaces de colonizar la superficie protésica tras el proceso de siembra (3, 4). El epiplón puede constituir la solución a este problema, tanto por su facilidad de acceso como por el gran número de células que pueden ser obtenidas a partir de pequeños fragmentos del mismo. Sin embargo, la utilización de esta fuente de obtención celular no está libre de controversia, debido, fundamentalmente, a las discrepancias existentes en el origen endotelial (5) o mesotelial (6) de las células extraídas.

Las células mesoteliales (CM) tienen capacidad para producir prostaciclina (7, 8). Además, dichas células presentan una buena adhesión celular y forman una cubierta estable sobre prótesis vasculares de PTFE (8). Por último, las CM tienen gran afinidad para incorporar oxinato de In¹¹¹ (9).

La utilización de fibronectina (Fn) mejora considerablemente la capacidad de adhesión de las células a la superficie protésica durante los primeros días tras la realización de la siembra, en sistemas estáticos (10). En anteriores trabajos hemos descrito una mejora de la adhesión celular cuando se interponía una

matriz fibroblástica fijada sobre la superficie protésica, previa a la realización de la siembra (11, 12).

A pesar de los buenos resultados obtenidos en sistemas estáticos con la utilización de la Fn y de la matriz fibroblástica, cabe destacar que los beneficios potenciales de la siembra celular sobre prótesis vasculares depende, no sólo de la buena adherencia celular a la superficie protésica, sino también, de la resistencia de estas células a la acción del flujo sanguíneo (13, 14). Los estudios sobre la acción de dicho flujo son importantes por la influencia del mismo en la biología y en la patología vascular, así como en la viabilidad de las prótesis vasculares para su interposición en el territorio vascular (15), lo que ha provocado que las investigaciones vayan encaminadas a los estudios de retención celular sobre prótesis vasculares tras la interposición de las mismas, tanto en circuitos «in vitro» (13, 14) como en circuitos «ex vivo» (16). Por todo ello, el objetivo del presente trabajo ha sido, por un lado, el estudio del efecto del flujo sanguíneo sobre el poder de adhesión de las CM sembradas y, por otro, la eficacia de la matriz fibroblástica en la resistencia de las prótesis sembradas a la acción de dicho flujo en un circuito «ex vivo».

Material y métodos

Cultivo celular

a) Células Mesoteliales (CM)

Pequeños fragmentos de epiplón (10-20 g) fueron extraídos de perros de raza Mongrel y sumergidos en Minimal Essential Medium (MEM; Gibco Brl.), suplementado con una solución de antibiótico/antimicótico compuesta por 10000 UI/ml penicilina, 10000 µg/ml streptomicina, 25 µg/ml Fungizona (Gibco Brl.) y transportada al laboratorio donde fue procesado en condiciones de máxima esterilidad.

El epiplón fue lavado varias veces en MEM y las células fueron extraídas por digestión enzimática con colagenasa CLS tipo I (Worthington) al 0,1 % en MEM, a la que se le añadió 15 mM CaCl₂. La digestión con colagenasa se realizó en un baño de agitación a 37°C y 100 U de velocidad de agitación, siendo el tiempo de incubación de 20 minutos. Transcurrido este tiempo, se retiró el fragmento de epiplón y la suspensión celular obtenida fue trasvasada a un frasco cónico de centrífuga de 50 ml (Falcon) y centrifugada

gada durante 7 minutos a 200 g. A continuación se eliminó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 5 ml de medio 199 (M-199) suplementado, según la metodología descrita en anteriores trabajos (11).

Después, la suspensión celular fue colocada en un frasco de cultivo de 25 cm² (Nunclon) e incubada a 37°C en una estufa de cultivo en una atmósfera de 5 % CO₂.

b) Fibroblastos

Una pequeña muestra de piel (1 x 0,5 cm²) fue extraída del animal durante la intervención quirúrgica. El fragmento de piel fue introducido en un container con MEM para su transporte hasta el laboratorio, en donde, bajo condiciones de máxima esterilidad, fue cortado en pequeños explantos. A continuación, los explantos fueron colocados en frascos de cultivo de 25 cm² conteniendo 5 ml de medio McCoy's (GIBCO) completo (11) e incubado a 37°C en una estufa de cultivo en una atmósfera de 5 % CO₂.

En todos los casos, el medio de cultivo fue cambiado cada 2 días hasta la formación de una monocapa confluyente en la superficie de cultivo. Formada la monocapa, las células fueron levantadas de la superficie del frasco de cultivo mediante tratamiento enzimático con una solución de trypsin/EDTA IX (Gibco Brl.) durante 5 minutos a 37°C. La acción de esta enzima fue inhibida mediante la adición de medio completo, obteniéndose una suspensión celular que fue distribuida en distintos frascos de cultivo a razón 1:2, quedando de esta forma subcultivadas las células.

Las células utilizadas para el presente estudio fueron las procedentes del primer subcultivo.

El número de células viables fue determinado mediante la prueba de azul tripán y posterior recuento en una cámara de Neumbauer.

Identificación celular

Las células fueron identificadas mediante técnicas inmunohistoquímicas. Se utilizaron anticuerpos anti-CD34 (SEROTEC), anti-Factor VIII (BIOMEDA), anti-citoqueratina 18 (BIOGENESIS), anti vimentina (BIOMEDA), anti-desmina, anti- α actina y anti-actina total.

Producción de Prostaciclina (PGI₂)

La capacidad de las CM para producir PGI₂ fue determinada mediante técnicas de radioinmunoensa-

yo (RIA) por medición de los niveles de 6-keto-prostaglandina F_{1a} (Amersham), intermediario establece en la ruta metabólica de la síntesis de prostaciclina.

Siembra celular sobre PTFE

Para la realización de la siembra se utilizaron prótesis vasculares (porosidad 30 u) de PTFE de 6 cm de longitud y 4 mm de diámetro interno. Dichas prótesis fueron canuladas por los dos extremos e introducidas y fijadas en unos recipientes tubulares de cristal construidos al efecto.

Matriz fibroblástica

Los fibroblastos procedentes del primer subcultivo fueron levantados de la superficie del frasco de cultivo por tratamiento enzimático con una solución de tripsina-EDTA. Se separó una pequeña alícuota de la suspensión celular para la realización de un recuento de células viables a fin de poder determinar el número de células que se sembrarán sobre cada prótesis.

Con anterioridad a la realización de la siembra, todas las prótesis fueron llenadas con una solución que contenía 20 µg/ml de Fn (SIGMA) en MEM. Una vez llenadas, las prótesis fueron incubadas durante 1 h. a 37°C en un «roller» (diseñado para tal efecto) cuya velocidad de giro fue de 10 rph, de esta forma nos asegurábamos de la perfecta distribución de la Fn por toda la superficie protésica. Tras el proceso de incubación, se eliminó el exceso de Fn y se procedió a la realización de la siembra.

La superficie protésica fue sembrada en cuatro fases con una suspensión celular conteniendo 1x10⁶ fibroblastos/ml en cada una de ellas. Una vez inoculado el interior del biomaterial con la suspensión celular, la prótesis fue incubada a 37°C durante 15 minutos, en estado de reposo. Transcurrido este tiempo, se eliminaron las células no adheridas a la superficie protésica, quedando así preparado el biomaterial para la realización de la segunda fase de la siembra. La prótesis era girada 180°, repitiéndose de nuevo los mismos pasos anteriores. Una vez realizada esta segunda fase de la siembra, la prótesis fue girada 90° para la realización de la tercera fase, la cual se realizó siguiendo los mismos pasos descritos para las dos anteriores. Transcurrido el tiempo de incubación de esta tercera fase, la prótesis fue girada nuevamente 180° para realizar la siembra de la última parte de la

prótesis: Después de los últimos 15 minutos de incubación y, tras la eliminación de las células que no se adhieren a la superficie protésica, el biomaterial fue rellenado con M-199 suplementado e incubado a 37°C en una estufa de CO₂ (5 % CO₂), en rotación constante (10 rph) durante 24 horas.

Una vez formada la monocapa sobre la superficie protésica, se procedió a la fijación de la misma mediante tratamiento con glicerol al 5 % durante 5 minutos. Tras la fijación, se lavó la superficie protésica con MEM para asegurarnos de la completa eliminación del fijador sobrante. De esta forma se consiguió establecer una matriz fibroblástica sobre la que realizar la siembra de CM.

Siembra de CM

Tras la creación de la matriz fibroblástica, las prótesis vasculares fueron incubadas durante 1h. a 37°C con una solución de Fn (20 µg/ml) para facilitar la adhesión de las CM en el momento de la siembra, la cual se realizó en cuatro fases siguiendo la metodología descrita para el caso de la siembra de fibroblastos, utilizando para tal fin CM procedentes del primer subcultivo. Para la realización de este proceso se llenó el interior de la prótesis con una suspensión que contenía 1x10⁶ células/ml en cada uno de los pasos. Una vez completada la siembra, las prótesis se incubaron a 37°C en la estufa de cultivo, haciéndolas girar lentamente (10 rph).

Marcaje celular con oxinato de In¹¹¹

Con anterioridad a la siembra, las CM fueron marcadas con oxinato de In¹¹¹ siguiendo la técnica descrita por Sharekin y cols. (17). Se añadieron 50 µCi/ml en M-199 sin suero y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se centrifugó la suspensión celular a 200g durante 7 minutos, se decantó para retirar el sobrante de radiofármaco, se lavó el pellet celular con PBS y se resuspendieron las células con M-199 completo, quedando así preparadas para la siembra sobre la matriz fibroblástica.

Círculo «ex vivo»

Una vez anestesiados los animales, se aislaron ambas arterias femorales y se abordó la aurícula derecha a través de una esternotomía media, estableciendo un shunt externo entre ambas arterias femorales y dicha cavidad cardíaca.

Se diseñó un circuito consistente en un tronco de cono cuyo extremo de mayor diámetro se acopla a uno de los extremos de un tubo cilíndrico (28 mm de diámetro y 10 cm de longitud). La parte libre de este tubo cilíndrico se acopla a un tubo en Y, provocando así una bifurcación. A cada rama de la bifurcación se le acopló un tubo flexible en el cual se interpusieron, radialmente, dos recipientes tubulares de cristal que protegían las prótesis vasculares. Ambas estructuras quedan separadas por un ángulo de 120°. Una vez establecido el circuito, se desclampó dejando pasar el flujo sanguíneo a través de la superficie protésica sembrada durante 1h. Transcurrido este tiempo se retiraron las prótesis del circuito, se lavaron dos veces con suero fisiológico para retirar los restos sanguíneos y se midió la radiactividad retenida en la prótesis mediante un contador de partículas gamma (Fig. 1).

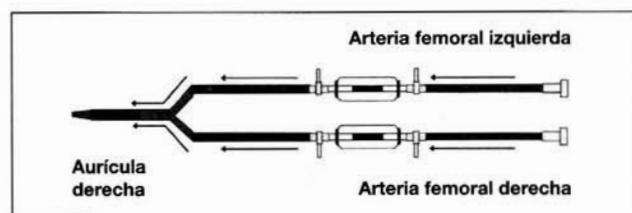


Fig. 1. Representación esquemática del circuito «ex vivo» fémoro atrial. Las flechas indican el sentido del flujo vascular.

Microscopía electrónica de barrido

Las muestras obtenidas fueron fijadas en 3 % glutaraldehido durante 2 h. y pasadas a buffer Milloning (pH 7.3). A continuación, las muestras fueron deshidratadas en una serie creciente de acetonas (desde acetona al 30 % hasta acetona pura) y, posteriormente, sometidas a punto crítico con un Polaron E-3000, para su completa desecación. Por último, fueron metalizadas en oro-paladio para su posterior observación en un microscopio electrónico de barrido Zeiss 950 DSM.

Diseño experimental

Grupo control (n=6): PTFE sembrado directamente con CM tras tratamiento con Fn.

Grupo experimental (n=6): PTFE sembrado con CM previa interposición de una matriz fibroblástica.

Todas las prótesis fueron sometidas a la acción del

flujo sanguíneo en un circuito «*ex vivo*» fémoro-auricular durante 1 h., realizando mediciones de pérdida de radiactividad cada 10 min.

Se utilizaron 6 perros Mongrel de 12-14 Kg para la realización del circuito, interponiendo en el mismo una prótesis perteneciente al grupo control y otra perteneciente al grupo experimental en cada uno de los animales.

En todos los animales se realizó una medición del flujo sanguíneo a la entrada y a la salida de las prótesis mediante un sensor de detección de velocidad de flujo (Transonic Systems, Inc. Ithaca. NY. USA).

Tanto antes como después de someter las prótesis sembradas a la acción del flujo sanguíneo, la superficie protésica recubierta fue medida mediante técnicas de análisis de imagen.

El análisis estadístico fue realizado mediante el test U de Mann Whitney para comparación entre grupos.

Resultados

Cultivo celular

Fibroblastos

Los fibroblastos en cultivo muestran una morfología característica, con una forma fusiforme y crecimiento en colonias concéntricas. La secreción celular en cultivo se manifiesta por acúmulos vacuolizados intracitoplasmáticos y secreción extracelular en forma de material discretamente refringente a microscopía invertida.

Células mesoteliales

Las CM presentan un buen comportamiento en cultivo, formando una monocapa confluyente a los pocos días del comienzo del cultivo. Esta monocapa estaba formada por células poligonales con núcleo redondeado y rodeadas por abundante glicocalix.

En todos los tipos celulares la prueba de Azul Tripán nos reveló la existencia de unas tasas de viabilidad lo suficientemente elevadas como para garantizar la realización de una siembra efectiva sobre el material protésico.

Identificación celular y producción de prostaciclina

Las células mesoteliales fueron positivas para todos los anticuerpos testados. Las técnicas de inmu-

nofluorescencia revelaron una gran positividad de las células mesoteliales frente a anticuerpos anti-desmina, anti- α -actina y anticuerpos anti-actina total.

Por otro lado, las CM produjeron altos niveles de prostaciclina en cultivo ($> 5\text{ ng/ml}$), mientras que en los cultivos de fibroblastos no se detectó ninguna actividad.

Siembra celular

Fibroblastos

Los fibroblastos sobre el PTFE muestran una morfología de aspecto redondeado con numerosas prolongaciones espiculadas que contactan unas con otras, estableciendo un típico retículo celular. Además, desde los primeros momentos comienzan a desarrollar una gran actividad secretora que, en su cara apical, le confiere a la cubierta un aspecto fibrilar filamentoso, formándose un amplio glicocalix encima de la propia cubierta fibroblástica. Estas células recubren la totalidad de la prótesis formando una monocapa estable sobre la superficie de la misma entre las 18 y las 24 horas posteriores a la siembra.

Una vez formada la monocapa, ésta fue fijada a la superficie protésica con glicerol al 5 %, de forma que se conseguía una superficie muy rugosa que hacía las funciones de matriz para la siembra del resto de los tipos celulares (Fig. 2)

Células mesoteliales

A las 24 h. de la siembra, las células mesoteliales forman una capa celular estable, tanto sobre la su-

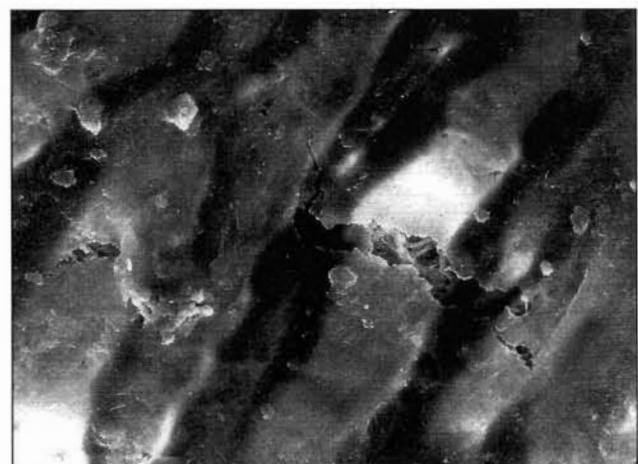


Fig. 2. Aspecto de la matriz fibroblástica tras su fijación con glicerol a la superficie del PTFE. (500 X).

perficie protésica como sobre la matriz fibroblástica. Las células que conforman esta capa permanecen completamente estiradas sobre el biomaterial, apareciendo algunas células de morfología esférica con aspecto típico de células en diferentes estados de división (Figs. 3a y b).

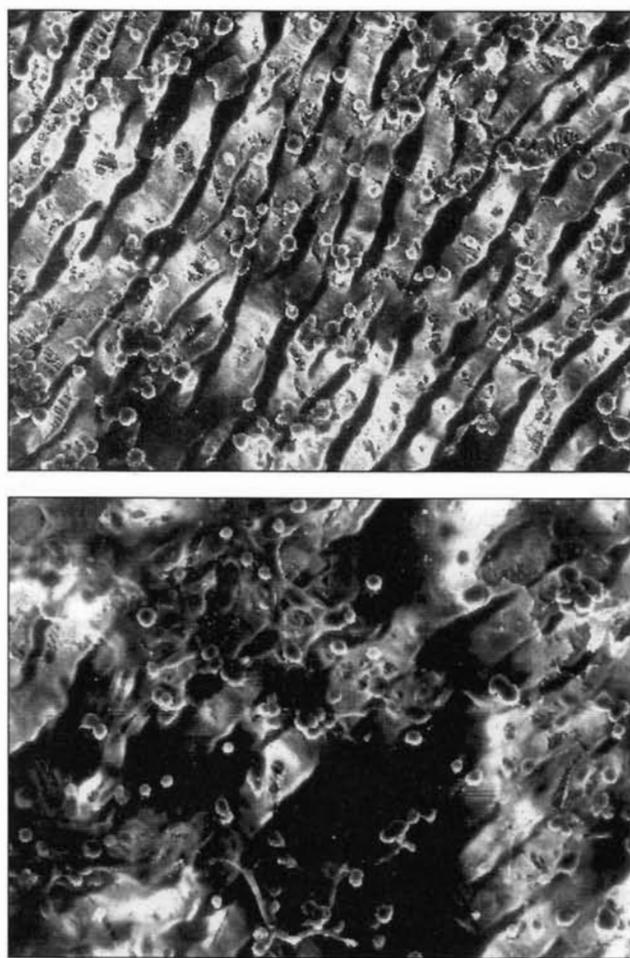


Fig. 3. Células mesoteliales formando una monocapa estable sobre la superficie del PTFE antes de su interposición en el circuito.

- a) PTFE pretratado con fibronectina (Grupo control). (200 X).
- b) PTFE previa fijación de una matriz fibroblástica (Grupo experimental). (200 X).

Círculo «ex-vivo»

La medición de la velocidad del flujo en el circuito fue por término medio de $117 \pm 12,5$ ml/min. a la entrada y de $72,6 \pm 14,3$ ml/min. a la salida del mismo.

– *Grupo Control:* En este grupo, formado por CM sembradas sobre PTFE pretratado con Fn, observamos unos valores de retención del isótopo radiactivo que oscilaron desde el 11,43 % en el momento del desclampaje, hasta el 3,59 % 1h. después de abierto el circuito (Fig. 4a).

– *Grupo Experimental:* Al someter al flujo las células mesoteliales sembradas sobre matriz fibroblástica se observaron diferencias significativas ($p < 0,001$) en cuanto al porcentaje de retención celular, al compararlas con el grupo control. Los valores en cuanto a porcentaje de retención del oxinato de In¹¹¹ oscilaron

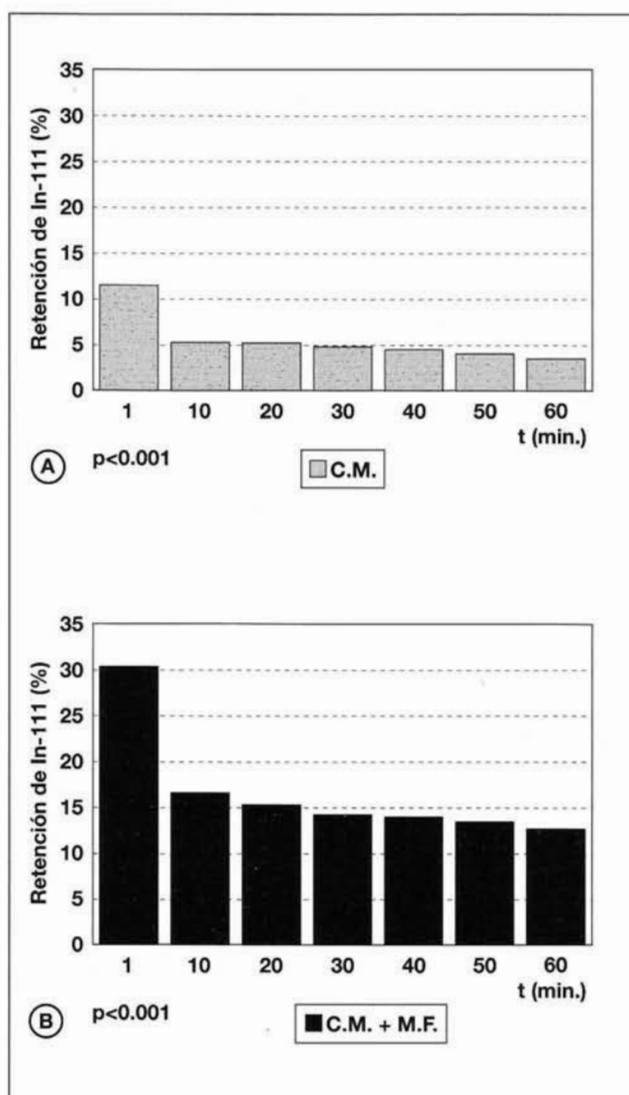


Fig. 4. Retención de oxinato de In¹¹¹ a lo largo del tiempo, tras la apertura del circuito ex vivo (* $p < 0,001$). a) Grupo control, b) Grupo experimental.

entre el 31,15 %, inmediatamente después del desclampaje, hasta el 13,01 % tras 1 h. de interposición en el circuito (Fig. 4b).

Superficie cubierta

La medición de la superficie cubierta a través de técnicas de análisis de imagen demostró cómo la eficacia de la siembra fue similar para los dos grupos estudiados, siendo de un $71,65 \pm 6,23$ % para el grupo control y $73,50 \pm 9,36$ para el grupo de prótesis sembradas con CM sobre la matriz fibroblástica antes de su interposición en el circuito «ex vivo». Sin embargo, tras la acción del flujo sanguíneo, se observó una significativa disminución de la superficie cubierta en cada uno de los grupos en relación con la observada antes de la acción del flujo. ($p < 0,001$) (Fig. 5).

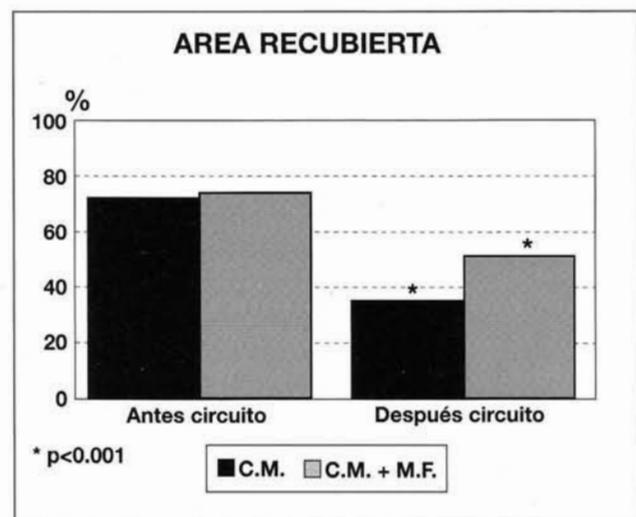


Fig. 5. Porcentaje de superficie cubierta antes y después de la acción del flujo sanguíneo en ambos grupos de estudio (* $p < 0,001$).

Discusión

La utilización de células mesoteliales (CM) como alternativa a la siembra de células endoteliales (CE) ha dado buenos resultados en sistemas estáticos, tanto por su capacidad de producir prostacilina como por su comportamiento sobre la superficie protésica a lo largo del tiempo (3). Es indudable que el empleo de células destinadas a la siembra de prótesis vasculares, que no procedan de los propios vasos del paciente, constituye una gran ventaja desde el punto de vista práctico.

Otro punto importante en el contexto de las siembras de prótesis vasculares concierne, no sólo a la estabilidad de la monocapa formada sobre la superficie del biomaterial, sino a la resistencia de dicha cubierta celular a la acción del flujo. Algunos autores (1, 18, 19) han demostrado que la función endotelial es mejor cuando la capa sobre la que descansa el endotelio es lo más parecida a la capa media vascular, lo que ha provocado el ensayo de distintos recubrimientos y el empleo de proteínas para mejorar la adhesión de las células al material protésico. Recubrimientos tan variados como colágeno (1, 20), laminina (21), Fn (10, 22), han sido ampliamente estudiados. Sin embargo, los mejores resultados se han obtenido con la interposición de una matriz natural (11, 12). En trabajados previos hemos descrito cómo, pese a que con la utilización de Fn, a concentración de $20 \mu\text{g}/\text{ml}$, se han obtenido buenos resultados en cuanto a la estabilidad de la monocapa celular sobre la superficie protésica (10); es con la interposición de una matriz fibroblástica con la que se obtienen mejores resultados, en cuanto al mantenimiento de esta monocapa a lo largo del tiempo en sistemas de siembra estáticos (11, 12). Los buenos resultados obtenidos nos llevaron a ensayar dicha matriz empleando CM sembradas sobre la misma y sometiéndola a la acción del flujo sanguíneo las prótesis vasculares. Con este fin, diseñamos en el animal de experimentación un sistema dinámico de flujo, intercalando las prótesis entre las arterias femorales y la aurícula derecha.

La capacidad para incorporar In^{111} oxina nos permitió hacer un seguimiento del comportamiento celular sobre la superficie protésica a lo largo del tiempo de estudio. A pesar de la gran afinidad que tienen estas células para incorporar oxinato de In^{111} , hay que tener en cuenta dos factores fundamentales. Por un lado la capacidad que tiene el biomaterial para incorporar el radiofármaco a su estructura y, por otro, la pérdida espontánea de marcaje por parte de las células (23). Está suficientemente demostrado que la vida media del 111-In oxine es de 60-70 horas (23) por lo que se hace necesario que el estudio se realice dentro de este tiempo.

Los estudios realizados sobre la pérdida espontánea de marcaje han dado como resultado valores que oscilan entre el 5 % de pérdida espontánea para CE frescas, procedentes de venas humanas, durante los

primeros 60 min. (17) y el 7,8 % encontrado en CE procedentes de venas humanas, durante los primeros 60 min. (17) y el 7,8 % encontrado en CE procedentes de venas de perro (24). Por último, el grupo de Vhora y cols. (14) demostró, en CE procedentes de vena safena humana, que el mayor índice de pérdida espontánea se produce durante los primeros 30 min., siendo esta pérdida despreciable durante las cuatro horas siguientes.

Al analizar los resultados obtenidos tras la interposición de las prótesis sembradas con CM correspondientes al grupo control, se puso en evidencia que el flujo al que estuvieron sometidas las mismas provocó una pérdida de marcaje de hasta un 88 % desde los momentos iniciales hasta los 10 minutos. A partir de este tiempo, esta pérdida se stabilizó. Estos resultados se aproximan a los obtenidos por otros autores en modelos diferentes (7, 25), pero se contraponen a los obtenidos por otros grupos de autores que obtienen una mayor retención tras la acción del flujo (16, 26).

Otro factor a tener en cuenta y que es motivo de controversia es la diferente velocidad de flujo utilizada en los distintos modelos. Así, Sentissi y cols. (27) ensayaron prótesis sembradas en condiciones variables de flujo (flujos comprendidos entre 50 ml/min y 400 ml/min) observando, de acuerdo con otros autores (16, 28), que se produce una mayor retención cuanto menor es el flujo. Estos resultados se contraponen a los obtenidos por otros autores (13, 14), que encuentran una mayor retención a una mayor velocidad de flujo (200 ml/min.).

Para nuestro modelo se realizaron dos tipos de medidas del flujo, realizándose una de ellas en la zona de entrada a la prótesis ($117,5 \pm 12,5$ ml/min.) y otra a la salida del mismo ($72,6 \pm 14,3$). Este hecho, no descrito en otros modelos, indica la resistencia que ofrece la interposición de las prótesis al paso del flujo sanguíneo. Podemos considerar que nuestro modelo se corresponde con las condiciones de alta velocidad de flujo, estando nuestros resultados de retención celular de acuerdo con los descritos por otros autores (25, 28) bajo dichas condiciones, observándose una mayor retención cuando se interponía una matriz fibroblástica.

Creemos en la importancia de complementar los estudios de retención de ^{111}In oxine con estudios de recubrimiento celular de la superficie protésica, a fin de poder correlacionar ambos factores, observan-

do que la adherencia de CM mejoró en las prótesis pretratadas con una matriz fibroblástica. Otros autores, empleando circuitos «in vitro», también obtuvieron mejores retenciones celulares cuando pretrataron las prótesis con colágeno (27).

Nuestros resultados indican que parece existir una correlación entre la pérdida progresiva de marcaje y la disminución de retención celular tras la acción del flujo sanguíneo, como parece deducirse de los estudios de superficie cubierta realizados antes y después de la interposición de las prótesis sembradas en el circuito «ex vivo».

Por todo ello podemos *concluir* afirmando que:

a) La pérdida de marcaje celular por la acción del flujo parece estar íntimamente ligada a la pérdida progresiva de retención celular sobre la superficie protésica, pudiendo considerar despreciable, en nuestro modelo, la pérdida espontánea de marcaje; b) la interposición, sobre la superficie protésica, de una matriz fibroblástica previa a la siembra mejora significativamente, tanto la retención de marcaje sobre el PTFE, como la retención celular sobre la superficie del mismo, tras la acción del flujo sanguíneo.

BIBLIOGRAFIA

1. BAKER, K. S.; WILLIAMS, S. K.; JARELL, B. E.; KOOLPE, E. A.; LEVINE, E.: Endothelialization of human collagen surfaces with human adult endothelial cells. *Am. J. Surg.*, 1985; 150:197-200.
2. MOSQUERA, D. A. and GOLDMAN, M.: Endothelial cell seeding. *Br. J. Surg.*, 1991; 78:656-660.
3. BELLÓN, J. M.; BUJÁN, J.; GARCÍA-HONDUVILLA, N.; MINGUELA, F.; HERNANDO, A.: Utilidad de las células mesoteliales obtenidas de epiplón humano para el recubrimiento de prótesis vasculares de polietileno (PTFE). Estudio comparativo con células endoteliales de vena umbilical. *Angiología*, 1994; 2:44-48.
4. THOMSON, G. J. L.; VOHRA, R.; WALKER, M. G.: Cell seeding for small diameter ePTFE vascular grafts: A comparison between adult human endothelial and mesothelial cells. *Ann. Vasc. Surg.*, 1989; 3:140-145.
5. STREPETTI, A. V.; HUNTER, W. J.; SCHULTZ, R. D.; SU-

- GIMOTO, J. T.; BLAIR, E. A.; HACKER, K.; CHASAN, P.; VALENTINE, J.: Seeding with endothelial cells derived from the microvessels of the omentum and from the jugular vein: A Comparative study. *J. Vasc. Surg.*, 1988; 7:677-684.
6. VISSER, M. J. T.; VAN BOCKEL, J. H. VAN MUIJEN, G. N. P.; VAN HINSBERGH, V. W. M.: Cells derived from omental fat tissue and used for seeding vascular prostheses are not endothelial in origin. A study on the origin of epitheloid cells derived from omentum. *J. Vasc. Surg.*, 1991; 13: 373-381.
7. BEARN, P. E.; SEDDON, A. M.; MCCOLLUM, N.; MARSTON, A.: Mesothelial seeding knitted Dacron. *Br. J. Surg.*, 1993; 80:587-591.
8. HERNANDO, A.; GARCÍA-HONDUVILLA, N; BELLÓN, J. M.; BUJÁN, J.; NAVLET, J.: Coatings for vascular prostheses: Mesothelial cells express specific markers for muscle cells and have biological activity similar to that of endothelial cells. *Eur. J. Vasc. Surg.*, 1994; 8: 531-536.
9. BELLÓN, J. M.; BUJÁN, J.; GARCÍA-HONDUVILLA, N; DE HARO, J.; ESCUDERO, C.; NAVLET, J.: Valoración de la siembra de células endoteliales y mesoteliales mediante el marcaje isotópico con oxinato de In¹¹¹. *Angiología*, 1995; 4: 187-192.
10. HONDUVILLA, N. G.; BUJÁN, J.; LIZARBE, M. A.; BELLÓN, J. M.; OLMO, N.; HERNANDO, A.: Adhesion and stability of fibronectin on PTFE before and after seeding with normal and synchronized endothelial cells: In vitro study. *Artif. Org.*, 1995; 19:144-153.
11. BELLÓN, J. M.; BUJÁN, J.; HONDUVILLA, N; HERNANDO, A.; NAVLET, J.: Endothelial cell seeding of polytetrafluoroethylene vascular prostheses coated with a fibroblastic matrix. *Ann. Vasc. Surg.*, 1993; 7: 549-555.
12. BUJÁN, J.; GARCÍA-HONDUVILLA, N; HERNANDO, A.; BELLÓN, J. M.: Use of a fibroblastic matrix improves the results of mesothelial-cell seeding on vascular prostheses of polytetrafluoroethylene. *Histol. Histopathol.*, 1995; 10: 803-810.
13. BUDD, J. S.; ALLEN, K. E.; BELL, P. R. F.: Effects of two methods of endothelial cell seeding on cell retention during blood flow. *Br. J. Surg.*, 1991; 78: 878-882.
14. VOHRA, R. K.; THOMSON, G. J. L.; SHARMA, H.; CARR, H. M. H.; WALKER, M. G.: Effects of shear stress on endothelial cell monolayers on expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) grafts using preclot and fibronectin matrices. *Eur. J. Vasc. Surg.*, 1990; 4: 33-41.
15. HELMLINGER, G.; GEIGER, R. V.; SCHRECK, S.; NEREN, R. M.: Effects of pulsatile flow on cultured vascular endothelial cell morphology. *J. Biomech. Eng.*, 1991; 113:123-131.
16. PRENDVILLE, E. D.; COLEMAN, J. E.; CALLOW, A. D.; GOULD, K. E.; LALIBERTE-VERDON, S.; RAMBERG, K. CONNOLLY, R. J.: Increased in-vitro incubation time of endothelial cells on fibronectin-treated ePTFE increases cell retention in blood flow. *Eur. J. Vasc. Surg.*, 1991; 5: 311-319.
17. SAREFKIN, J. B.; LATKER, C.; SMITH, M.; CRUESS, D.; RICH, N. M.: Endothelial cell labeling with 111-Indium-oxide as a marker of cell attachment to bioprosthetic surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1983; 17: 345-357.
18. WEINBERG, C. B.; BELL, E.: A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science*, 1986; 231: 397-400.
19. JAUREGUI, H. O.: Cell adhesion to biomaterials: The role of several extracellular matrix components in the attachment of nontransformed fibroblast and parenchymal cells. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, 1987; 33: 66-74.
20. FOXALL, T. L.; ANGER, 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.
21. FRANKE, R. P.; SCHNITTNER, H. J.; PANNE, B.; DRENCKHAHN, D.: The significance of laminin for the stability of endothelial-substrate adhesion in rheologic conditions. *Z. Kardiol.*, 1989; 78:5-8.
22. VOHRA, R. K.; THOMSON, G. J.; SHARMA, H.; CARR, H. M.; WALKER, M. G.: Fibronectin coating of expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) graft and its role in endothelial seeding. *Artif. Organs*, 1990; 14: 41-5.
23. STANSBY, G.; SHUKLA, N.; BERWANGER, C.; SEIFALIAN, A.; FULLER, B.; HAMILTON, G.: 111-Indium labeling of endothelial cells: Potential problems when applied to studies of vascular graft seeding. *Int. J. Ang.*, 1994; 3:86-89.
24. PATTERSON, R. B.; KELLER, J. D.; SILBERSTEIN, E. B.; KEMPCZINSKI, R. F.: A comparison between fibronectin and matrigel pretreated ePTFE vascular grafts. *Ann. Vasc. Surg.*, 1989; 3: 160-166.

25. ROSENMAN, J. E.; KEMPCZINSKI, R. F.; PEARCE, W. H.; SILBERSTEIN, E. B.: Kinetics of endothelial cell seeding. *J. Vasc. Surg.*, 1985; 2: 778-794.
26. RAMALANJAONA, G.; KEMPCZINSKI, 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. Surgery*, 1986; 3:264-272.
27. SENTISSI, J. M.: The effect of flow on vascular endothelial cell grown in tissue culture on polytetrafluoroethylene grafts. *Surgery*, 1986; 99: 337-343.
28. PRENDVILLE, E. D.; GOULD, K. E.; CONNOLLY, R. J.; CALLOW, A. D.: Effect of blood flow on retention of endothelial cell cultured on fibronectin-coated expanded polytetrafluoroethylene vascular grafts. *Br. J. Surg.*, 1990; 77: A3418.