

Reducción de la agregación plaquetaria tras recubrimiento de prótesis vasculares con derivados acrílicos de ácido acetil salicílico(•)

Acrylic derivatives of acetyl salicylic acid reduce platelet aggregation on vascular prostheses

J. Buján - J. M. Bellón* - N. G.^a-Honduvilla* - C. Escudero**- L. Millán**
F. Minguela - J. San Román****

*Departamento de Ciencias Morfológicas y Cirugía

Facultad de Medicina

Universidad de Alcalá. Madrid

**Clínica Puerta de Hierro. Madrid

***Consejo Superior de Investigaciones
Científicas. Madrid

RESUMEN

Objetivo: Los diseños de mejora de la permeabilidad de las prótesis vasculares de pequeño calibre siguen siendo un objetivo a conseguir, con la finalidad de obtener los mejores resultados en cuanto a zonas que requieren revascularización sanguínea. El recubrimiento artificial empleando células endoteliales o mesoteliales no ha conseguido mejorar dicha permeabilidad. Una de las alternativas, no disponiendo de vasos naturales, sigue siendo la modificación de los materiales protésicos, hasta conseguir resultados que mejoren las tasas de trombosis y que, por tanto, logren un funcionamiento óptimo de las prótesis vasculares.

Material y métodos: Prótesis vasculares de PTFE de 6 cm de longitud y 4 mm de diámetro interno fueron recubiertas con diferentes copolímeros en forma de hidrogeles. Los grupos de estudio fueron establecidos de la forma siguiente: a) control (n=6) (PTFE sin recubrimiento); b) PHEMA (n=6) (PTFE recubierto con poli-metacrilato de 2-hidroxietilo); c) MS-20 (n=6) (PTFE recubierto con un copolímero formado por poli-metacrilato de 2-hidroxietilo y ácido 2-metacriloiloxibenzoico); d) AAS (n=6) PTFE recubierto con ácido 2-metacriloiloxibenzoico. Para el estudio de agregación se dise-

ñó un circuito «ex-vivo» fémoro-auricular en perro, que se mantuvo funcionando durante 45 minutos. Las plaquetas fueron marcadas con In¹¹¹ para la realización de los estudios de agregación.

Resultados: El grupo control mostró un aumento de la agregación plaquetaria en todo el tiempo de estudio. En las prótesis pretratadas con PHEMA y MS-20 se observó una disminución de la agregación, obteniendo con el AAS una disminución de la agregación estadísticamente significativa.

Conclusiones: Se observa una significativa reducción de la agregación plaquetaria cuando se emplean prótesis recubiertas con AAS.

Palabras clave: Prótesis vasculares; agregación plaquetaria; ácido acetil salicílico.

SUMMARY

Introduction: One of the main aims in the design of small calibre vascular prostheses is to improve the permeability of the prosthetic material in order to achieve better revascularization. The artificial coating of such prostheses with endothelial or mesothelial cells has not proved successful. One of the alternatives currently under investigation is the modification of prosthetic materials in an attempt to reduce the incidence of thrombosis.

Material and methods: PTFE vascular prostheses (length 6 cm, internal diameter 4 mm) were coated with different copolymers in the form of hydrogels. The following study groups were established: a) Control (n=6) (uncoated PTFE); b) PHEMA (n=6) (PTFE coated with 2-hydroxyethylpolymetacrylate); c) MS-20 (n=6) (PTFE coated with a copolymer of 2-hydroxyethylpolymetacrylate and 2-Oxybenzoimeta-

(•) El presente trabajo ha sido realizado con una Ayuda de Investigación FISss 94-0033, SAL AE/00098/95.

cilate; d) ASS (n=6) (PTFE coated with 2-Oxybenzoimetracrilate. Platelet aggregation on the prostheses was tested using a custom designed ex-vivo, femoro-auricular circuit in the dog. Platelets were labelled with In¹¹¹ oxine to evaluate aggregation.

Results: The control group showed an increase in platelet aggregation throughout the study period. Reduced aggregation was observed in prostheses coated with PHEMA and MS-20. Treatment with ASS resulted in a statistically significant reduction in platelet aggregation.

Conclusions: A significant reduction in platelet aggregation was observed prostheses were coated with AAS.

Key words: Vascular prostheses; platelet aggregation; acetyl salicylic acid.

Introducción

La utilización de materiales protésicos vasculares sigue siendo en la actualidad una alternativa en la práctica quirúrgica vascular, a pesar de no constituir un sustituto comparable al vaso natural, pues para ello deberían de tener una permeabilidad perfecta, formar una nueva capa endotelial morfofuncionante, no desarrollar una neoíntima patológica, no ser susceptibles de infecciones y, por último, no sufrir deformaciones (1).

La hemocompatibilidad es la característica fundamental que debe de tener el material protésico destinado a uso vascular. Cuando el mismo se pone en contacto con el flujo sanguíneo se produce una reacción interfacial caracterizada por el depósito de proteínas plasmáticas sobre la superficie del biomaterial, activándose la cascada de la coagulación, lo que genera una superficie trombogénica (2). Ninguno de los biomateriales disponibles hasta el momento actual presenta propiedades o características que eviten la adsorción superficial de proteínas del plasma sanguíneo (3). Dicha adsorción depende de fenómenos que suceden sobre la superficie protésica y determinan, en definitiva, el carácter antitrombogénico de los implantes. En los primeros minutos del re establecimiento del flujo sanguíneo, la adsorción se puede producir de dos modos diferentes: uno es el resultado del depósito preferencial competitivo de la albúmina, fibrinógeno y γ -globulina, y el segundo aparece como consecuencia de la activación del sistema de la coagulación. Si la primera proteína que se adhiere a la superficie es la albúmina, parece

que se forma una superficie antitrombogénica (4), sin embargo, si el biomaterial adsorbe preferencialmente fibrinógeno o γ -globulina se transforma en una superficie altamente trombogénica (5). Pero no sólo influye el tipo de proteína depositada, sino también la forma de depósito en monocapa o multicapa (6). Por ello, el modelo cinético de formación de la cubierta protética comprende tres factores vinculantes: a) el estado de la proteína con respecto a sus centros de adsorción (según lo cual la proteína se adhiere irreversiblemente o lo hace de modo transitorio); b) la disminución por desnaturización proteica, y c) la cantidad de proteínas adsorbidas de modo reversible que son eliminadas secundariamente. La afinidad proteica es mayor cuanto mayor es la energía libre superficie-agua. Por ello, los criterios de hidrofobicidad (7, 8, 9) que llevarían a la formación de una película proteica estable se basan en la formación de una capa estable en la interfase sangre/biomaterial que inhibía fundamentalmente la adhesión plaquetaria y/o los factores de la coagulación.

Teniendo en cuenta estos aspectos, se han sugerido numerosas modificaciones que permitan alcanzar mayor tasa de permeabilidad protésica, siendo fundamental el lograr una cubierta celular de material autólogo (10, 11, 12), o bien modificar la propia superficie luminal protésica (13, 14). Dentro de esta última vía, la utilización de materiales poliméricos en forma de hidrogeles (15, 16, 17, 18) neutros, iónicos y modificados con agentes antitrombogénicos (19, 20) puede constituir una alternativa que inhibía la trombosis inicial que conlleva al fracaso protésico.

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la efectividad de recubrimientos compuestos por hidrogeles en forma polimérica o copolimérica que presentan actividad antitrombogénica, sobre prótesis vasculares de PTFE. De las diversas composiciones ensayadas la forma polimérica con derivados acrílicos del ácido acetilsalicílico es la que mejores resultados aporta, con una marcada reducción del depósito plaquetario sobre la superficie luminal recubierta.

Material y métodos

Animales de experimentación

Fueron empleados 12 perros Mongrel, de un peso comprendido entre 12 y 14 kg.

Prótesis vasculares

Se utilizaron prótesis vasculares de politetrafluorotileno expandido (PTFE) de 4 mm. de diámetro interno, 6 cm de longitud y una porosidad de 20 μm .

Preparación de los recubrimientos

El poli-metacrilato de 2-hidroxietilo (PHEMA) es un polímero acrílico de elevado peso molecular ($P_m=135.000$) preparado por polimerización radical de metacrilato de 2-hidroxietilo.

Mediante técnicas de polimerización se preparó un copolímero (MS-20), formado por metacrilato de 2-hidroxietilo y un derivado acrílico del ácido acetilsalicílico, el ácido 2-metacriloiloxibenzoico. La proporción en peso de ambos polímeros fue de 4/1 respectivamente. El ácido 2-metacriloiloxibenzoico se preparó previamente, de acuerdo al método descrito por *San Roman et al.* en 1987 (18).

El copolímero MS-20 se caracterizó por resonancia magnética nuclear. Presenta una estructura química característica, en la que las unidades del derivado acrílico del ácido salicílico se distribuyen al azar en las cadenas del copolímero y los restos de ácido salicílico se encuentran unidos a las macromoléculas como sustituyentes laterales.

Se preparó también un homopolímero del derivado acrílico del ácido acetilsalicílico (AAS), con elevado peso molecular ($P_m=87.000$) y naturaleza no cristalina, que forma películas de espesor controlado sobre superficies con excelente adhesión. Se elaboraron películas de 0,4-0,5 mm por evaporación lenta, de una solución de los polímeros o copolímeros (10% peso/volumen) en N,N-dimetilformamida, seguido de secado a bajas presiones.

Marcaje de plaquetas con Oxinato de In¹¹¹

De cada animal de experimentación se extrajeron 20 ml de sangre total, a partir de la cual se realizó un plasma rico en plaquetas (PRP) mediante centrifugación a 1000 rpm durante 10 minutos. Se llevó a cabo un recuento del número de plaquetas existentes en el PRP y se procedió al marcaje de las mismas con 100 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ de oxinato de In-111. Para ello, se realizó una incubación del PRP con el radiofármaco durante 15 minutos. A continuación se procedió a la eliminación del sobrante de radiofármaco por medio de centrifugaciones sucesivas.

Mediante un contador de partículas y se midió la cantidad de radiofármaco incorporado a la superficie plaquetaria, a fin de determinar la eficacia del marcaje

previa a la incorporación de la suspensión celular en el animal de experimentación.

Circuito «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 según metodología previamente descrita por nosotros (20).

Microscopía electrónica de barrido

Las muestras obtenidas fueron fijadas en glutaraldehído al 3% durante 2 h. y pasadas a buffer Millonig (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 en 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): Formado por prótesis de PTFE sin ningún tipo de recubrimiento.

PHEMA (n=6): Formado por prótesis de PTFE recubiertas con poli-metacrilato de 2-hidroxietilo.

MS-20 (n=6): Formado por prótesis de PTFE recubiertas con un copolímero a base de poli-metacrilato de 2-hidroxietilo y ácido 2-metacriloiloxibenzoico.

AAS (n=6): Formado por prótesis de PTFE recubiertas con el derivado acrílico del ácido acetilsalicílico (ácido 2-metacriloiloxibenzoico).

Las prótesis vasculares fueron mantenidas en circuito durante 45 minutos, midiéndose la cantidad de radiofármaco depositado sobre la superficie protésica al inicio del circuito y posteriormente, cada 10 minutos, hasta completar el tiempo total en que las prótesis son sometidas a la acción del flujo.

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

Resultados

La eficacia del marcaje plaquetario estuvo comprendida entre el 89,3% y el 93,5%.

En el grupo control, a microscopía electrónica de barrido, se observaron pequeños agregados trombogénicos sobre la superficie luminal de las prótesis de PTFE sin recubrimiento (Fig. 1). En este grupo, se aprecian células sanguíneas colonizando las zonas internodales de prótesis y agregados plaquetarios, con células atrapadas, sobre la superficie luminal.

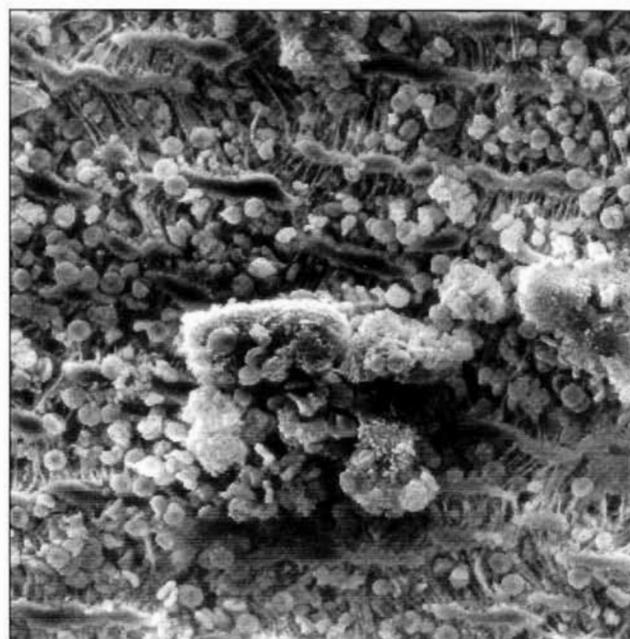


Fig. 1. Explicación en el texto.

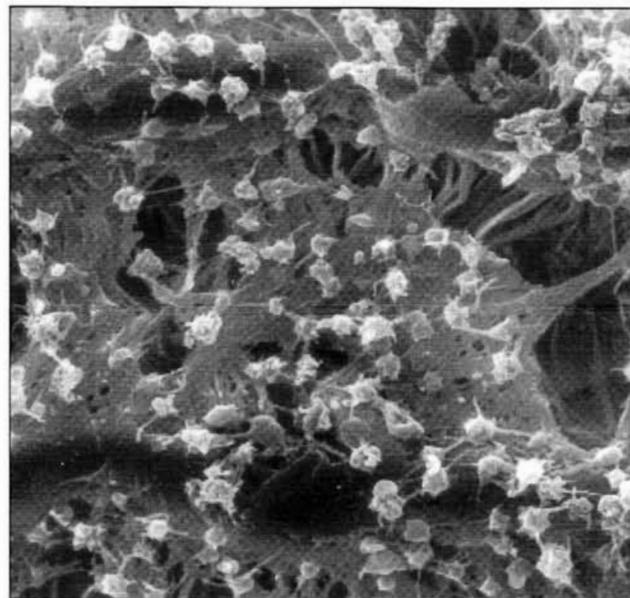


Fig. 2. Explicación en el texto.

El recubrimiento polimérico con 2-hidroxietilmetacrilato (PHEMA), presenta una clara disminución de células sanguíneas y, en los lugares de depósito plaquetar, éstas forman agregados en los que se pueden apreciar plaquetas activas y, algunas de ellas, bien adheridas a la superficie del PTFE (Fig. 2).

El grupo MS-20 no aportó nuevos efectos antiadherentes para plaquetas y, sin embargo, en pequeñas áreas, se puso de manifiesto una activación del sistema fibrinogénico con la formación de amplias redes de fibrina sobre la superficie del PTFE (Fig. 3).

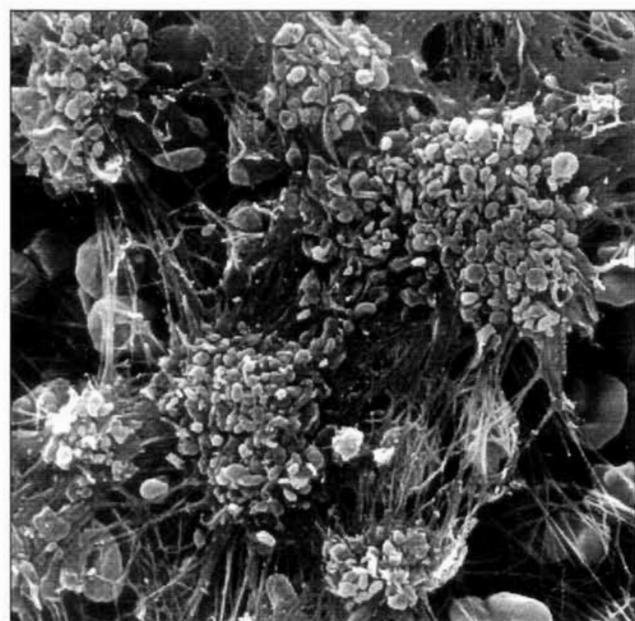


Fig. 3. Explicación en el texto.

No obstante, cuando se ensayaron los recubrimientos con derivados acrílicos del ácido salicílico, el hidrogel conformó una lámina que, tapizando los lugares internodales de la malla de PTFE, contribuye a formar una cubierta homogénea sobre la cual sólo se observa un escaso depósito de plaquetas de un modo aislado.

Estos resultados proporcionan al polímero de ácido salicílico (AAS) una baja capacidad para la adhesión de plaquetas (Fig. 4), siendo sus valores estadísticamente significativos con respecto a los otros grupos estudiados. La valoración cuantitativa del isótopo incorporado en las plaquetas que se han depositado sobre el hidrogel al comienzo y al final del circuito *«ex vivo»* se muestran en la Tabla I.

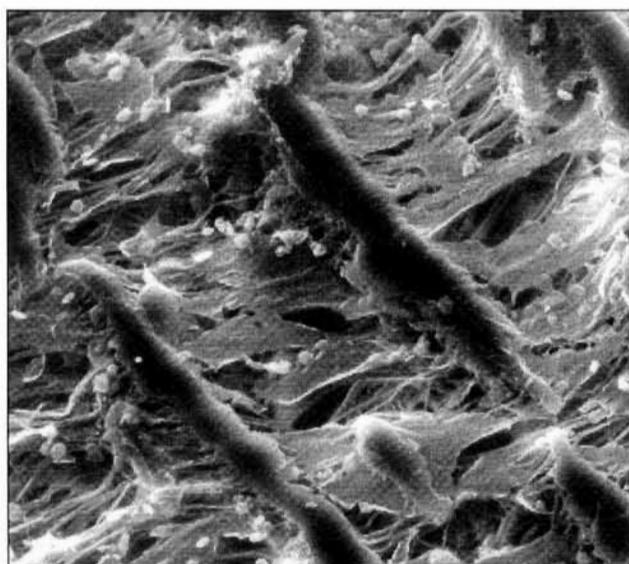


Fig. 4. Explicación en el texto.

Discusión

Las propiedades del ácido acetilsalicílico como antiagregante plaquetario se mantienen en la formación de los hidrogeles de recubrimiento para prótesis vasculares de pequeño calibre, mostrando una marcada reducción en el habitual depósito de plaquetas sobre el PTFE sin recubrimiento alguno. Este tipo de recubrimientos de hidrogeles ha sido ensayado previamente por nuestro grupo empleando otros biomateriales como el Dacron (21).

Los hidrogeles de derivados del metacrilato (PHEMA) forman una fina película sobre la superficie del biomaterial, creando una superficie antitrombótica que impide el depósito de material celular sanguíneo al paso del flujo (22).

Sin embargo, el depósito polimérico sobre el PTFE no forma una capa homogénea, existiendo soluciones de continuidad en donde se incrementa el riesgo de acumulo de material trombótico.

Cuando se emplean geles copoliméricos (MS-20) los resultados obtenidos son similares al grupo anterior con PHEMA. Estos parecen indicar que la incorporación del ácido acetil salicílico en el gel no tiene una liberación tan efectiva como cabría esperar, por lo menos en el tiempo ensayado por nosotros.

Sin embargo, cuando el hidrogel sólo se conforma con los derivados del AAS, su efectividad farmacológica es inmediata, lo cual se traduce en un menor depósito

Porcentaje de radiofármaco depositado sobre la superficie protésica al inicio y a la finalización del circuito «ex vivo» (*p<0,01)

	CONTROL	PHEMA	MS-20	AAS
INICIO	0,27±0,008	0,26±0,1	0,29±0,08	0,18±0,1*
FINAL	0,05±0,04	0,10±0,06	0,09±0,07	0,01±0,007*

Tabla I

de plaquetas marcadas. La valoración cuantitativa se corrobora con las imágenes que ofrece la microscopía electrónica de barrido, donde se muestra que las plaquetas que aparecen sobre la superficie del hidrogel simplemente están adheridas pero no muestran signos de activación, ya que se mantienen de forma homogénea y redondeada.

La efectividad farmacológica del ácido acetilsalicílico ha sido bien probada, tanto en modelos sobre vaso nativo como sobre biomateriales, aunque el modo de administración sea a través de la vía sistémica y no de aplicación local, como en este caso, donde el fármaco liberado del hidrogel pone suficiente actividad para inhibir la agregación.

De estos resultados podemos inferir que los recubrimientos de hidrogeles de polímeros acrílicos de acetil sobre la superficie del PTFE reducen significativamente la agregación plaquetaria.

BIBLIOGRAFIA

- ABBOTT, W. M.; CALLOW, A.; MOORE, W.; RUTHERFORD, R.; VEITH, F.; WIMBERG, S.: Evaluation and performance standars for arterial prostheses. *J. Vasc. Surg.*, 1993; 17:746-756.
- KARADAG, E.; SARAYDIN, D.; CETINKAYA, S.; GUVEN, O.: In vitro swelling studies and preliminary biocompatibility evaluation of acrylamide-based hydrogels. *Biomaterials*, 1996; 17:67-70.
- BAIER, R. E.; DUTTON, R. C.: Initial events in interaction of blood with a foreign surface. *Am. Chem. Soc. Mats.*, 1968; pp. 42. Atlantic City, New Jersey.
- PACKHAM, M. A.; EVANS, E.; GLYNN, M. F.; MUSTARD, F. J.: The effect of plasma proteins on the in-

- teraction of platelets with glass surface. *J. Lab. Clin. Med.*, 1969; 73:686-697.
5. BAUMGARTNER, H. R.; MUGGLI, R.; TSCHOPP, T. B.; TURITO, V. T.: Platelet adhesion release and aggregation in flowing blood: effect of surface properties and platelet function. *Thromb. Haemost.*, 1976; 35:124-138.
 6. BRASH, J. L.; LYMAN, D. J.: Adsorption of plasma proteins in solution to unchanged hydrophilic polymer surfaces. *J. Biomed. Mat. Res.*, 1969; 3:175-189.
 7. LYMAN, D. J.; MUIR, W. M.; LEE, I. J.: The effect of chemical structure and surface properties of polymers on the coagulation of blood, I. Surface free energy effects. *Trans. Am. Soc. Art. Intern. Organs*, 1965; 11:301-306.
 8. ANDRADE, J. D.; NAGAOKA, S.; COOPER, S. L.; OKANO, T.; KIN, S. W.: Surfaces and blood compatibility: Current hypothesis. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, 1987; 33:75-84.
 9. OKANO, T.; AOYAGI, K.; KATAOKA, K.; ABE, K.; SAKURAI, Y.: Hydrophilic-hydrophobic microdomain surfaces having an ability to suppress platelets aggregation and their *in vitro* antithrombogenicity. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1986; 20:919-927.
 10. BELLÓN, J. M.; BUJÁN, J.; G.^a-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.
 11. GARCÍA-HONDUVILLA, N.; 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 Syncronized endothelial cells: *in vitro* study. *Artif. Organs*, 1995; 19:144-153.
 12. HERNANDO, A.; G.^a-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.
 13. KIM, S. W.; FEIJEN, J.: Surface modification of polymer for improved blood biocompatibility CRC. *Crit. Rev. Biocompat.*, 1985; 1:229-260.
 14. HUBBELL, J. A.: Chemical modification of polymer surfaces to improve biocompatibility. *Trends Polymer Sci.*, 1994; 2:20-25.
 15. GÜVEN, O.; SEN, M.: Preparation and characterization of poly (N-vinyl 2-pyrrolidone) hydrogels. *Polymer*, 1991; 32:2491-2495.
 16. PEPPAS, N. A.: Contemporary issues in hydrogels research. *Polym. Prep.*, 1993; 34:8.
 17. GRECO, R. S.; KIM, H. C.; DONETZ, A. P.; HARVEY, R. A.: Patency of a small vessel prosthesis bonded to tissue plasminogen activator and iloprost. *Ann. Vasc. Surg.*, 1995; 9:140-145.
 18. SAN ROMÁN, J.; MADRUGA, E. L.; PARGADA, L.: Synthesis and Microstructure of Polymers from O-methacryloyloxybenzoic Acid. *J. Polym. Sci. Polym. Chem.*, 1987; 25:203-214.
 19. NOJIRI, C.; SENSHU, K.; OKANO, T.: Nonthrombogenic polymer vascular prosthesis. *Artif. Organs*, 1995; 19:32-38.
 20. BUJÁN, J.; G.^a-HONDUVILLA, N.; GIMENO, M.^a J.; ESCUDERO, C.; MINGUELA, F.; CONTRERAS, L.; NAVLET, J.; BELLÓN, J. M.: Mejora de la retención celular tras la siembra de células mesoteliales sobre una matriz fibroblástica en prótesis vasculares de politetrafluoroeléno. Influencia del flujo sanguíneo en un circuito «ex vivo». *Angiología*, 1996; 3:133-142.
 21. SAN ROMÁN, J.; ESCUDERO, C.; GALLARDO, A.; SANTA CRUZ, R.; JORGE, E.; HARO J.; ALVAREZ, L.; MILLÁN, I.; BUJÁN, J.; BELLÓN, J. M.; CASTILLO-OLIVARES, J. L.: Application of new coatings for vascular grafts based on polyacrylic systems with antiaggregating activity. *Biomaterials*, 1994; 15:759-765.
 22. SAN ROMÁN, J.; BUJÁN, J.; BELLÓN, J. M.; GALLARDO, A.; ESCUDERO, C.; JORGE, E.; HARO, J.; ALVAREZ, L.; CASTILLO-OLIVARES, J. L.: Experimental study of antithrombogenic behavior of Dacron vascular grafts coated with hydrophilic acrilic copolymers bearing salicylic acid residues. *J. Biomed. Mater. Reserch.*, 1996; 32:19-27.