

Efecto del almacenamiento en fase gaseosa sobre la viabilidad celular, la apoptosis y la actividad funcional en aortas de cerdo criopreservadas. Estudio preliminar

M.E. Rendal-Vázquez ^a, M. Rodríguez-Cabarcos ^a,
 R.O. Fernández-Mallo ^a, J. Sánchez-Ibáñez ^b, R.J. Segura-Iglesias ^c,
 A. Veiga-Barreiro ^d, P. Filgueira-Fernández ^d, S. Pértega-Díaz ^e,
 T. Bermúdez-González ^a, C. Andión-Núñez ^a

THE EFFECT OF GAS PHASE STORAGE ON CELL VIABILITY, APOPTOSIS AND FUNCTIONAL ACTIVITY IN CRYOPRESERVED AORTAS FROM PIGS. A PRELIMINARY STUDY

Summary. Aims. The purpose of this study was to analyse the effect of the freezing protocol and the method of storage on functional activity after thawing, the anatomicopathological structure and the degree of apoptosis of the abdominal aortas of a pig following six months' cryopreservation. Materials and methods. Arterial grafts were obtained from pigs. Each aorta was divided into two fragments. Group 1: segments were either fresh or set in formaldehyde after taking the sample (control group). Group 2: segments that were set after antibiotic incubation and six months' cryopreservation for an anatomicopathological and apoptosis study, or which were used directly after thawing for a functional study. Antibiotic incubation was performed in RPMI culture medium that was supplemented with antibiotics. Following antibiotic incubation, cryopreservation was carried out in RPMI culture medium + 10% dimethylsulphoxide (DMSO); the cooling rate was 1 °C/min and storage was later carried out in gas phase. Results. There was no difference in the degree of apoptosis between the two groups and there were no significant variations in the degree of elastic fibre fragmentation (it was slightly higher in group 2). An increase in both the amount of endothelial separation and detachment were observed in the frozen group as compared to the control group. After thawing, the maximum responses to the vasoconstrictors that were tested (KCl and noradrenalin) were 13 and 24% of the responses of the fresh aortas. There was a reduction in the endothelium-independent relaxing responses to sodium nitroprussiate, and endothelium-dependent relaxing responses to acetylcholine were also greatly diminished. Conclusions. The method of cryopreservation employed lowered contraction and relaxation responses at six months, and it also gave rise to important morphological changes as regards the conservation of the endothelium and the elastic fibres. Nevertheless, the rate of apoptosis was not altered. [ANGIOLOGÍA 2004; 56: 107-21]

Key words. Apoptosis. Contraction. Functional activity. Relaxation. Vascular segments. Viability.

Introducción

El interés en las técnicas de criopreservación ha permitido, en los últimos años,

su desarrollo y el uso de tejidos criopreservados en diferentes campos de la cirugía con resultados prometedores. La cirugía vascular encuentra cada vez más

^a Unidad de Criobiología.
^b Oficina de Coordinación de Trasplantes. ^c Departamento de Cirugía Vascular.
^d Departamento de Anatomía Patológica. ^e Departamento de Estadística. Complejo Hospitalario Juan Canalejo. A Coruña, España.

Correspondencia:

Dra. M.^a Esther Rendal Vázquez. Unidad de Criobiología. Carretera del Paseo, s/n. Hospital Teresa Herrera. E-15006 A Coruña. E-mail: esther_rendal@canalejo.org.

Agradecimientos. Al quirófano experimental y unidad de investigación de nuestro hospital, por su colaboración.

Este trabajo ha contado con la ayuda de una beca de la Xunta de Galicia (n.^o PR404A99/64-0).

© 2004, ANGIOLOGÍA

indicaciones para la utilización de estos injertos.

La criopreservación de tejidos ofrece la capacidad de un almacenamiento indefinido. Las mejoras en las técnicas de criopreservación, tales como la introducción de agentes crioprotectores y un índice controlado de congelación ha permitido el desarrollo de bancos de segmentos vasculares humanos [1].

Se ha comprobado que la recuperación funcional de los segmentos vasculares criopreservados tras la descongelación está generalmente asociada con una fuerza contráctil y función endotelial reducida. Por tanto, el objetivo de este estudio fue analizar las consecuencias del protocolo de congelación y del método de almacenamiento utilizado sobre la actividad funcional, la estructura anatomopatológica y el grado de apoptosis de las aortas abdominales de cerdo criopreservadas durante seis meses, tras su descongelación.

Materiales y métodos

Extracción del tejido

Utilizamos la aorta abdominal de 16 cerdos de 80 kg extraídas en modo aseptico. Para ello se llevaron a cabo los siguientes pasos:

- Laparotomía en la línea media desde el cartílago xifoides a infraumbilical.
- Desplazamiento lateral de las vísceras abdominales.
- Exposición de la aorta y la cava abdominales.
- Liberación de la aorta abdominal suprarrenal y ligadura de sus ramas.

- Apertura de los hiatos aórtico y esofágico y liberación transdiafragmática de la mayor longitud posible de la aorta torácica.
- Sección transversal de la aorta suprarrenal primero y la aorta torácica en segundo lugar.

Se ha utilizado el cerdo como animal de investigación ya que es un animal muy asequible y los experimentos con los segmentos vasculares son fácilmente extrapolables al hombre.

Preparación del tejido

Los tejidos se colocaron en solución salina a temperatura ambiente y se llevaron al laboratorio. Posteriormente, cada arteria se cortó en dos segmentos iguales que se asignaron al azar a dos grupos de estudio:

- *Grupo 1*: segmentos en fresco o bien fijados en formaldehído tras la toma de la muestra para el estudio anatopatológico y de apoptosis, o para utilizar directamente en el estudio funcional (grupo control).
- *Grupo 2*: segmentos fijados tras incubación antibiótica y criopreservación durante seis meses para el estudio anatopatológico y de apoptosis o utilizados directamente tras la descongelación para el estudio funcional.

Las arterias del grupo 1 se utilizaron inmediatamente para el estudio en el baño de órganos, y las del grupo 2 se congelaron. Se utilizaron cuatro anillos de cada arteria para analizar en fresco y otros cuatro para analizar las muestras tras la criopreservación. No todos los anillos tenían la misma longitud.

Criopreservación

Primero, los tejidos se colocaron inmediatamente en una solución de RPMI, a un pH de 7,4, y se realizó la incubación en solución antibiótica (5 µg/mL de anfotericina B, 50 µg/mL de metronidazol, 50 µg/mL de vancomicina y 50 µg/mL de amikacina) durante 6-20 h, a 4 °C. Tras la incubación antibiótica, se colocaron las muestras en una bolsa Gambio DF 700, que contiene una solución compuesta de 100 mL de medio RPMI con 10% de DMSO que se equilibró durante 30 min a 4 °C antes de la criopreservación.

La criopreservación se realizó en un congelador biológico (CM25, Carburos Metálicos S.A., Madrid, España), con un descenso programado de 1 °C/min hasta -40 °C e índices más rápidos de aquí en adelante hasta -150 °C y almacenamiento en fase gaseosa del nitrógeno líquido durante seis meses.

Transcurrido este tiempo, las arterias se descongelaron lentamente. Para ello, primero se colocó la bolsa con el segmento vascular 10 minutos a -80 °C, luego seis minutos a temperatura ambiente y se descongeló durante cuatro minutos a 40 °C, a una tasa media de descongelación de 15 °C/min.

Para minimizar los efectos tóxicos del DMSO, el crioprotector se retiró mediante lavados secuenciales y progresivas diluciones a 4 °C en solución salina.

Estudios en el baño de órganos

Para el registro isométrico de la fuerza de contracción y de relajación, los anillos arteriales se colocaron en posición vertical entre dos ganchos de acero en el baño de órganos; el gancho superior es-

taba conectado a un transductor de fuerza. La señal se amplificó y registró en un ordenador. El agua del baño de órganos se mantuvo a 37 °C, y el pH de la solución de Krebs-Henseleit (KH) -NaCl, 118 mM/L; KCl, 4,7 mM/L; MgSO₄, 2,4 mM/L; CaCl₂, 1,6 mM/L; KH₂PO₄ 1,2 mM/L mM/L; NaHCO₃, 24 mM/L; glucosa, 11,1 mM/L) contenida en los vasos de cristal se mantuvo a 7,4 gracias a una solución de O₂/CO₂ (95:5), ya que la oxigenación de las soluciones se ha indicado que mejora la conservación del tejido. Al comienzo del experimento, los anillos, de 3 mm de largo, se estiraron a una tensión inicial de 4 gm y se permitió que se relajaran y equilibraran unas 2 h en la solución de Krebs, que se cambió cada 15 minutos hasta que alcanzaron una tensión basal estable de 4 gm. Las curvas de respuesta a la concentración de CIK (20 a 100 mM) y noradrenalina (10⁻⁸ M a 10⁻⁴ M) se determinaron por adición acumulativa de los agentes; cada concentración se añadió cuando la concentración previa produjo el máximo efecto. Las respuestas a los agonistas que contraen se expresaron en gramos. En estos experimentos se añadió indometacina (10⁻⁵ M) 20 minutos antes de la primera administración del agonista para bloquear la síntesis de prostaglandinas endógena. Cuando se investigaron las respuestas de relajación, los anillos se precontrajeron con noradrenalina (10⁻⁶ M y 10⁻⁵ M) para producir una contracción estable. Después, las relajaciones independientes del endotelio se valoraron mediante curvas de dosis y respuesta acumulativas con nitroprusiato sódico (SNP) (10⁻⁹ M a 10⁻⁴ M), a fin de estudiar la ru-

ta de relajación dependiente de GMPc. En otra serie de experimentos, la función endotelial se valoró por la capacidad de la acetilcolina (ACH) para inducir la relajación en arterias de cerdo precontráctidas con noradrenalina 10^{-5} M.

Estudio anatomopatológico

Las muestras se fijaron en formaldehído al 10%, se incluyeron en parafina y se tiñeron con hematoxilina-eosina, tricrómico de Masson y orceína para estudiar las fibras elásticas.

Los parámetros que se analizaron fueron la presencia de células endoteliales, el grado de despegamiento y de desprendimiento y la fragmentación de las elásticas. El recuento de células endoteliales despegadas se realizó mediante un estudio semicuantitativo, teniendo en cuenta el porcentaje de la circunferencia arterial que presentaba despegamiento endotelial (0%, menos del 25%, del 25 al 50% y más del 50%).

Estudio de la apoptosis

Las muestras se fijaron en formaldehído al 10% y se incluyen en parafina. Se realizó la permeabilización de las membranas nucleares para detectar la fragmentación de los ácidos nucleicos con la enzima 16 Bio dUTP, y se marcó con peroxidasa para su detección en el microscopio.

El parámetro que se analizó fue el grado de apoptosis. El recuento de células en apoptosis se llevó a cabo de manera semicuantitativa, estableciendo tres grupos en función del número de células apoptóticas en 20 campos consecutivos de gran aumento (400×): menos del 10%

de células (+), 10-50% de células (++) y más del 50% de células (+++).

Fármacos

Se emplearon los siguientes agentes farmacológicos: CIK, noradrenalina (Sigma), indometacina (Sigma), SNP (Sigma) y ACH (Sigma).

Todas los fármacos se disolvieron en la solución de KH, excepto la indometacina, que se disolvió en una solución de carbonato sódico 100 mM. Los fármacos se mantuvieron a -20°C y se disolvieron en fresco en agua destilada hasta la concentración final apropiada. Las concentraciones de los fármacos se expresan como concentraciones molares en el baño de órganos.

Análisis de datos

El análisis estadístico se realizó usando un análisis de la varianza (ANOVA) para comparaciones múltiples; se consideró significativa una $p < 0,05$.

Las contracciones se expresan como gramos de fuerza isométrica desarrollada por los anillos arteriales en respuesta a los agentes que contraen (CIK y noradrenalina). Las relajaciones dependientes e independientes del endotelio se expresan como porcentajes de las contracciones máximas que se alcanzan con noradrenalina 10^{-5} M.

El efecto máximo (E_{\max}) era la respuesta mayor que se obtenía con un agente. Para los agonistas vasoconstrictores que se estudiaron, la concentración efectiva de sustancia que causaba el 50% de la respuesta máxima (EC_{50}) se determinó de cada curva. El valor pD_2 representa el logaritmo negativo de EC_{50} .

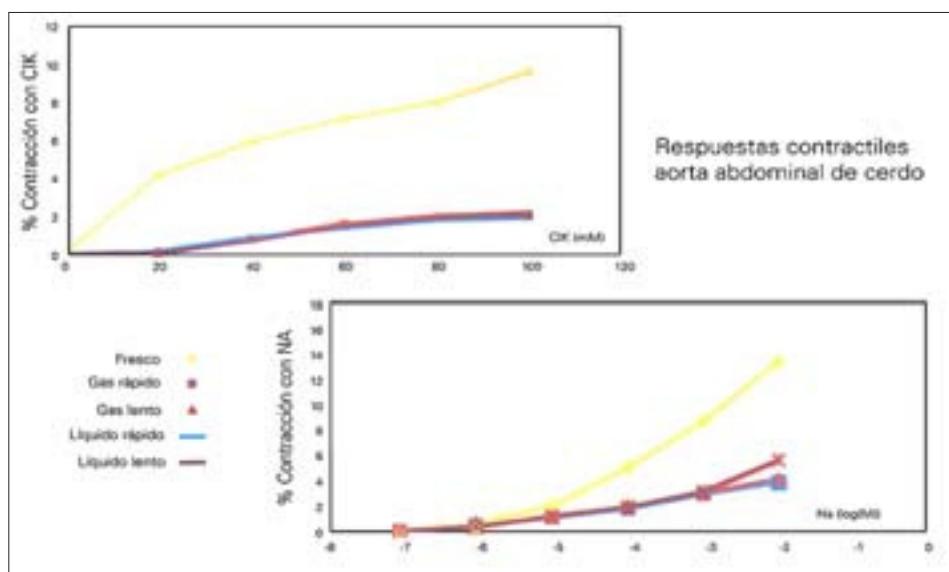


Figura 1. Curvas acumulativas de respuesta de concentración y contracción en anillos de aortas abdominales de cerdo en fresco y criopreservadas después de seis meses, en respuesta a KCl y noradrenalina. Los resultados se expresan como fuerza en gramos que desarrollan los anillos.

Para los agentes relajantes, IC_{40} se expresa como la concentración molar que produce el 40% de la relajación.

Los recuentos de células endoteliales y en apoptosis se llevó a cabo de la manera que se ha indicado anteriormente. Se han seguido criterios éticos y acordes con la normativa sobre el uso de animales de experimentación.

Resultados

Respuestas contráctiles

Se realizó una primera serie de experimentos para investigar la influencia de los métodos de congelación y de almacenamiento en la actividad contráctil tras la descongelación de las arterias que se habían congelado durante seis meses.

La fuerza contráctil, ensayada como la respuesta máxima en gramos de los anillos de aorta de cerdo, estaba signifi-

cativamente reducida en las preparaciones de arterias congeladas. En las aortas de cerdo congeladas, la respuesta contráctil máxima disminuyó hasta el 13% para el CIK (Fig. 1), y hasta el 22% para la noradrenalina (Fig. 1), comparada con el grupo control en fresco.

Como indica el valor pD_2 calculado, la noradrenalina estimuló las aortas de cerdo a concentraciones aproximadamente dos o tres veces más bajas que las del grupo control no congelado, lo que sugiere una sensibilización tras la descongelación a las respuestas contráctiles mediadas por α -adrenorreceptores de las arterias (Tabla I).

Respuestas relajantes independientes del endotelio

Las respuestas relajantes al SNP, que actúa a través de la activación directa de la guanilato ciclasa, se investigaron en anillos de aortas de cerdo, en fresco y

Tabla I. Respuestas a agentes contráctiles en aortas abdominales de cerdo en fresco y criopreservadas.

	Fresco	Descongelación			
		Fase gas (rápida)	Fase gas (lenta)	Fase líquida (rápida)	Fase líquida (lenta)
Eficacia (E_{max})					
KCl	15,54 ± 3,66	2,08 ± 0,25 ^a	2,35 ± 0,24 ^a	2,18 ± 0,63 ^a	2,35 ± 0,29 ^a
NA	17,77 ± 1,43	4,26 ± 0,53 ^a	4,77 ± 0,66 ^a	3,88 ± 0,21 ^a	3,93 ± 0,18 ^a
Potencia (pD₂)					
KCl	1,17 ± 0,22	1,35 ± 0,05	1,31 ± 0,04 ^a	1,33 ± 0,13	1,29 ± 0,05
NA	2,96 ± 0,17	3,58 ± 0,30	3,45 ± 0,34	3,75 ± 0,09	3,85 ± 0,08

^a Diferencias significativas ($p < 0,05$) frente a valores determinados en muestras no congeladas; E_{max} : contracción máxima expresada como gramos de fuerza isométrica desarrollada por los anillos; pD₂: $-\log EC_{50}$, logaritmo negativo de la concentración molar que produce el 50% de la respuesta máxima; los datos se expresan como medias ± DE.

descongeladas tras seis meses, después de haberse precontraído con noradrenalina. Las respuestas al SNP de las arterias en fresco y congeladas/descongeladas se expresaron como un porcentaje de la contracción máxima que se alcanzó con noradrenalina 10^{-5} M.

Se observaron marcadas diferencias de potencia (expresada como $-\log IC_{40}$) y eficacia entre las arterias en fresco y las descongeladas cuando se investigó la relajación inducida por el SNP (Fig. 2; Tabla II).

Respuestas relajantes dependientes de endotelio

Las relajaciones dependientes del endotelio se investigaron en aortas de cerdo en fresco y congeladas/descongeladas precontraídas con noradrenalina 10^{-5} M. La ACH indujo una respuesta relajante en las preparaciones en fresco que alcanzó un $22,50 \pm 4,72\%$ de la máxima relajación. Comparada con las aortas de

cerdo en fresco, la máxima relajación en respuesta a la ACH fue nula cuando se probó en las arterias que se habían criopreservado durante seis meses (Fig. 2).

El valor $-\log IC_{40}$ se redujo para este agente en las aortas de cerdo abdominales criopreservadas, y no fue estadísticamente diferente en aortas abdominales de cerdo en fresco y congeladas/descongeladas (Tabla II).

Estudio anatomo-patológico

No hay diferencias significativas en el grado de fragmentación de las elásticas (algo mayor en el grupo 2). Se observa un aumento tanto del grado de despegamiento como del desprendimiento endotelial en el grupo congelado con respecto al grupo control (Tabla III; Figs. 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9).

Estudio de la apoptosis

No hay diferencia en cuanto al grado de apoptosis en los dos grupos (Tabla III; Figs. 10 y 11).

Tabla II. Respuestas a agentes relajantes de las aortas abdominales de cerdo criopreservadas.

	Fresco		Descongelación		
		Fase gas (rápida)	Fase gas (lenta)	Fase líquida (rápida)	Fase líquida (lenta)
Eficacia (E_{\max})					
ACH	22,50 ± 4,72	7,91 ± 2,65	9,72 ± 3,59	9,68 ± 4,80	10,58 ± 6,08
SNP	93,17 ± 1,04	74,63 ± 3,67 ^a	74,76 ± 3,31 ^a	73,39 ± 2,23 ^a	77,61 ± 3,18 ^a
Potencia (-log IC₄₀)					
ACH	3,89 ± 0,54	3,79 ± 0,69	3,45 ± 0,76	3,17 ± 0,95	3,25 ± 1,26
SNP	5,34 ± 0,03	3,91 ± 0,12 ^a	4,04 ± 0,12 ^a	4,10 ± 0,08 ^a	3,92 ± 0,10 ^a

^a Diferencias significativas ($p < 0,05$) frente a valores determinados en muestras no congeladas; E_{\max} : relajación máxima expresada como porcentaje de la máxima respuesta a NA 10^{-5} M; IC₄₀: se expresa como la concentración molar que produce el 40% de la relajación; los datos se expresan como medias ± DE.

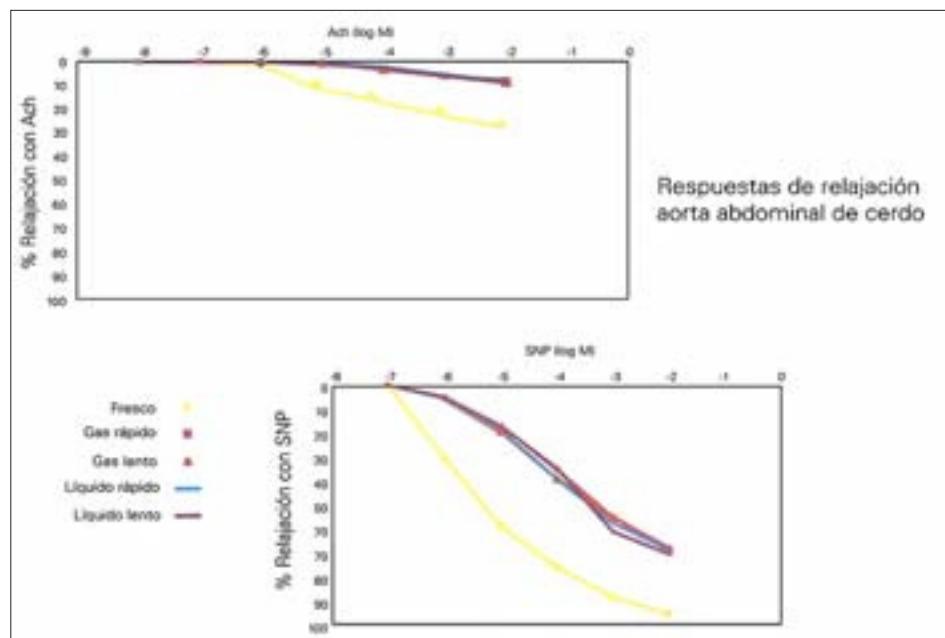


Figura 2. Curvas acumulativas de respuesta de contracción y relajación en anillos de aortas abdominales de cerdo en fresco y criopreservadas después de seis meses en respuesta a la acetilcolina y al nitroprusiato sódico. Los resultados se expresan como el porcentaje de la máxima respuesta a NA 10^{-5} M.

Discusión

La criopreservación se asoció con una marcada reducción de la contractilidad

[1-3]. Nuestro estudio compara las respuestas contráctiles y las de relajación dependientes e independientes del endotelio de aortas abdominales de cerdo en

fresco y criopreservadas durante seis meses. Las respuestas contráctiles máximas estaban en el intervalo del 13 al 27% de las respuestas en aortas de cerdo en fresco con noradrenalina y también con CIK, el cual provoca una contracción estrictamente dependiente del calcio.

Se ha observado una reducción de la contractilidad tras la descongelación para el CIK a menos del 40% del tejido en fresco en las arterias coronarias [4], las mamarias internas [5] y las arterias femorales humanas [1], mientras que la máxima respuesta a la noradrenalina se redujo al 75% en las arterias mesentéricas humanas [6], al 24% para las arterias mamarias internas humanas [7] y al 7% en las arterias femorales humanas [1]. La congelación de preparaciones vasculares generalmente produce una pérdida de la respuesta contráctil [1,8,9]. Además, Ku et al han mostrado que un idéntico protocolo de criopreservación aplicado a arterias coronarias caninas y humanas da lugar a una mayor pérdida de contractilidad en las arterias humanas, que indica variabilidad vaso a vaso en la susceptibilidad a la congelación [4,10].

Sin embargo, a pesar de una generalmente disminuida eficacia de la noradrenalina, el presente experimento en arterias abdominales de cerdo reveló un desplazamiento a la izquierda de la curva de noradrenalina en las arterias criopreservadas durante seis meses, lo que indica un aumento en la sensibilidad a la estimulación por α -adrenorreceptores después de la criopreservación. Un desplazamiento significativo a la izquierda de la curva de respuesta a la noradrenalina frente a la concentración

Tabla III. Resultados del estudio anatomopatológico.

		Grupo 1	Grupo 2
Endotelio despegado	0%	<i>n</i> = 4	<i>n</i> = 1
	< 25%	<i>n</i> = 5	<i>n</i> = 8
	25-50%	<i>n</i> = 7	<i>n</i> = 6
	> 50%	<i>n</i> = 0	<i>n</i> = 1
Endotelio desprendido	0%	<i>n</i> = 9	<i>n</i> = 4
	Poco (+)	<i>n</i> = 5	<i>n</i> = 9
	Mucho (++)	<i>n</i> = 2	<i>n</i> = 3
Fragmentación elástica	0%	<i>n</i> = 7	<i>n</i> = 3
	Leve (+)	<i>n</i> = 8	<i>n</i> = 10
	Moderada (++)	<i>n</i> = 1	<i>n</i> = 3
	Intensa (+++)	<i>n</i> = 0	<i>n</i> = 0
Grado de apoptosis	+	<i>n</i> = 0	<i>n</i> = 0
	++	<i>n</i> = 0	<i>n</i> = 0
	+++	<i>n</i> = 0	<i>n</i> = 0

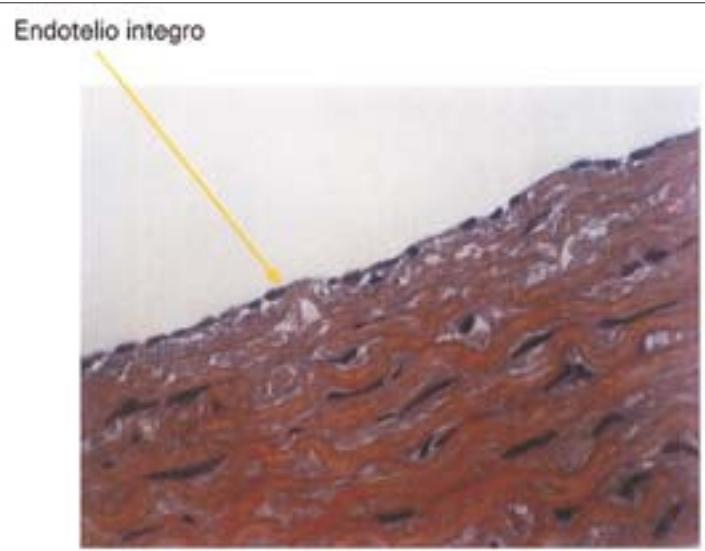


Figura 3. Endotelio íntegro; hematoxilina-eosina; 400x.

también se ha señalado en las arterias mamarias humanas [7].

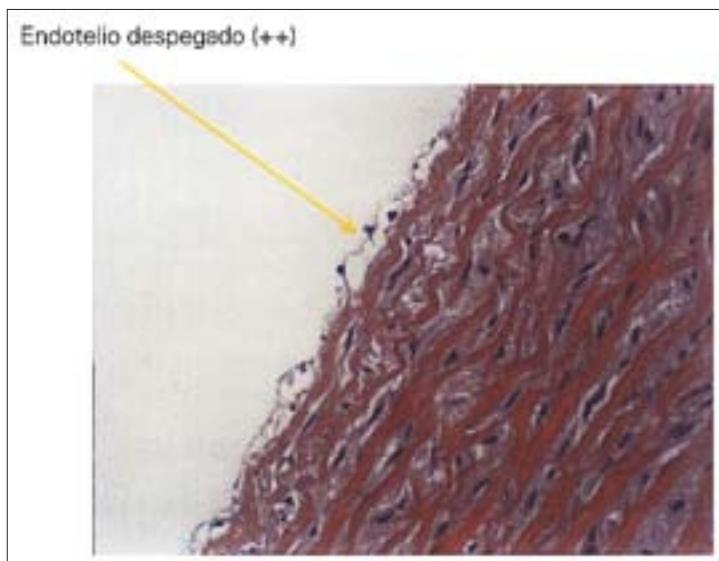


Figura 4. Endotelio despegado (++); hematoxilina-eosina; 400x.



Figura 5. Endotelio despegado (+++); hematoxilina-eosina; 400x.

Además, en nuestro estudio, las respuestas relajantes independientes del endotelio parecen alterarse por el procedimiento de criopreservación. Las aortas de cerdo criopreservadas eran menos sensibles que las aortas de cerdo frescas a los efectos relajantes del SNP, el cual actúa a través de la activación directa de

la guanilato ciclasa. Previamente se describió una disminución en la respuesta al monóxido de nitrógeno en injertos safenos caninos después de la criopreservación [11]. Además, recientemente se ha comprobado que las arterias coronarias humanas criopreservadas y las femorales humanas son menos sensibles al SNP que los tejidos frescos, mientras que se ha observado una ligera, aunque no significativa, hipersensibilidad al SNP en arterias mesentéricas humanas criopreservadas [1], así como respuestas relajantes al SNP independientes del endotelio que no variaron en arterias mamarias internas humanas y arterias mesentéricas y coronarias humanas [6,7]. Estos resultados sugieren que la ruta dependiente del GMPC de relajación es susceptible a la alteración por el procedimiento de criopreservación, y que el desarrollo de hipersensibilidad o hiposensibilidad a nitróvasodilatadores es específico de tejido.

La criopreservación de arterias de cerdo produjo una pérdida de las respuestas de relajación dependientes de acetilcolina. Las aortas de cerdo criopreservadas fueron menos sensibles que las aortas de cerdo frescas a los efectos relajantes de la acetilcolina. La pérdida de la relajación dependiente del endotelio puede ser causada por alteraciones de las células endoteliales de las arterias de cerdo criopreservadas. Se ha encontrado una reducción en las respuestas de relajación dependientes del endotelio después de la criopreservación en las arterias mesentéricas, coronarias, mamarias o femorales humanas [1,6,7]. Sin embargo, se ha indicado una conservación de las respuestas relajantes dependientes del

endotelio en arterias coronarias caninas y en venas safenas humanas [10, 12,13]. Nuevamente, un idéntico procedimiento de criopreservación aplicado a diferentes tipos de arterias produjo respuestas diferentes después de la criopreservación, lo que sugiere que esta respuesta es específica de tejido.

Por tanto, el método de criopreservación utilizado en este trabajo proporcionó una conservación limitada de la contractilidad de las aortas de cerdo, una conservación reducida de la relajación inducida por el SNP y, aparentemente, una pérdida de la relajación dependiente del endotelio con la acetilcolina.

Carrel introdujo el almacenaje de los vasos en frío al inicio de este siglo con el objetivo de reducir la actividad metabólica de las células [14,15]. Muchos investigadores han estudiado la influencia de dos importantes variables en el proceso de criopreservación: el tipo de crioprotector y la temperatura de almacenamiento. En 1975, Weber et al introdujeron el dimetilsulfóxido para la criopreservación de los vasos y mostraron un 87,5% de éxito con esta sustancia a una concentración adecuada [16]. Aunque durante los últimos años ha mejorado la técnica de criopreservación de tejidos, al conservarse varias funciones bioquímicas del músculo liso, la conservación del endotelio y del resto de la estructura de la pared durante la congelación/descongelación no es aún satisfactoria.

El uso de muy bajas temperaturas para el almacenamiento de aloinjertos puede llevar a daños significativos en las células y en la matriz extracelular, espe-

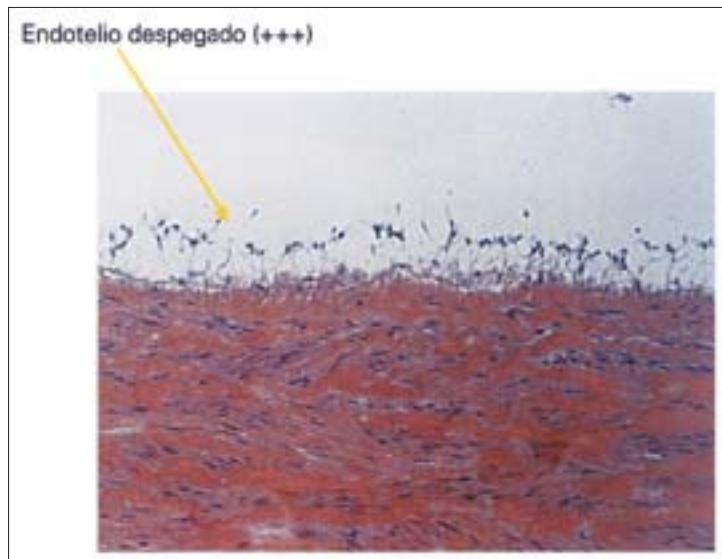


Figura 6. Endotelio despegado (++); hematoxilina-eosina; 400x.



Figura 7. Endotelio desprendido; hematoxilina-eosina; 400x.

cialmente durante el ciclo de congelación-descongelación.

En nuestro estudio no se ha observado la formación de fracturas macroscópicas en las arterias criopreservadas y almacenadas en fase gaseosa y descongeladas lentamente. Sin embargo, en estudios previos que se realizaron a -196 °C se

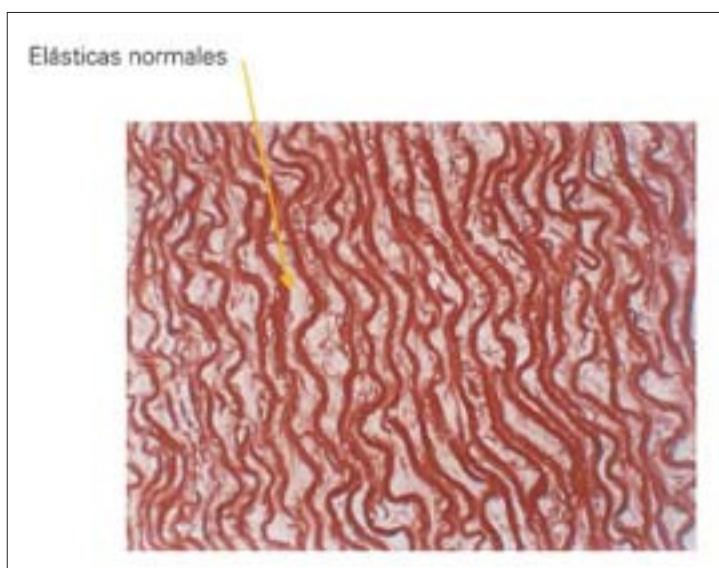


Figura 8. Elásticas normales; orceína; 400x.

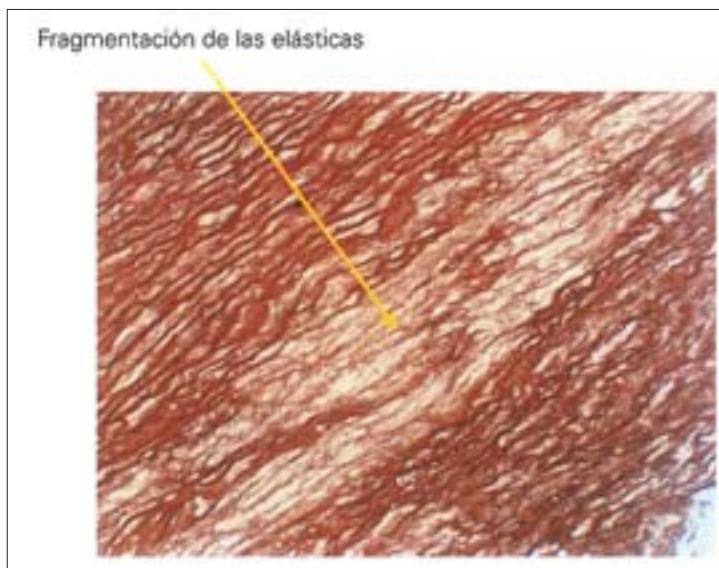


Figura 9. Fragmentación de las elásticas; orceína; 400x.

encontró en torno a un 40% de fracturas tras la descongelación en baño a 37 °C [19]. Pegg et al atribuyeron el fenómeno al estrés térmico que crea el rápido calentamiento del material [18,19].

La temperatura y el almacenamiento final en nitrógeno líquido son factores básicos para la conservación del endote-

lio y de las fibras elásticas [6,20,21]. El presente estudio histológico muestra que la integridad estructural estaba sólo parcialmente conservada, con cambios morfológicos en el endotelio y en las láminas elásticas.

Para Muller-Schweinitzenei et al, el almacenamiento en nitrógeno líquido causaba al menos el 50% de la denudación endotelial [6,7,20]. En nuestra experiencia con aortas de cerdo almacenadas en fase gaseosa y observadas por microscopía óptica tras tinción con hematoxilina-eosina y orceína, se aprecia que el endotelio está afectado por el proceso de criopreservación, y se observa un aumento en el grado de despegamiento y de desprendimiento endotelial. Diferentes autores han indicado este daño en la zona endotelial tras el proceso de criopreservación. Así, Nataf et al, en la arteria carótida de una oveja, encontraron que, tras la criopreservación en fase gaseosa y la descongelación rápida, las células endoteliales estaban en su mayoría alteradas y separadas del lecho subendotelial [22]. Por otra parte, Bellón et al, en la arteria ilíaca de una rata, almacenada en fase líquida y descongelada rápidamente, observaron zonas amplias sin endotelio, y en las zonas en las que estaba presente esta capa era de una apariencia laminar y débilmente unida a la superficie subendotelial; no obstante, se apreciaron áreas muy puntuales de endotelio intacto [23]. Las propiedades inmunológicas del endotelio vascular son bien conocidas. El endotelio es una capa antigénicamente activa. El rechazo crónico del endotelio se ha sugerido como el mecanismo que redu-

ce el éxito a largo plazo de los aloinjertos criopreservados. Sin embargo, existe todavía cierta controversia sobre la importancia de la viabilidad endotelial en el éxito de los injertos criopreservados.

Por otra parte, en nuestro trabajo con aortas de cerdo criopreservadas y almacenadas en fase gaseosa se observó que el proceso de criopreservación también produce una alteración en la conservación de las láminas elásticas que forman la pared del vaso. No obstante, no hay diferencias significativas en el grado de fragmentación de las elásticas, aunque es algo mayor en el grupo de arterias congeladas.

Estos datos, no obstante, no están en concordancia con los que muestran algunos autores, como Eskew et al, quienes en la arteria femoral de un perro, criopreservada, almacenada en fase gaseosa y descongelada rápidamente, no observaron alteraciones en las fibras elásticas tras la criopreservación [24]; del mismo modo, Mesa et al tampoco apreciaron alteraciones en la conservación de la lámina elástica interna y externa de arterias femorales de conejo almacenadas a -80°C y descongeladas rápidamente [25]. Al contrario que estos autores, Nataf et al, en la arteria carótida de una oveja tras la criopreservación en fase gaseosa y la descongelación rápida, observaron una pérdida de la lámina elástica interna, principalmente en la parte externa de la media [26]. Aunque el resto de las fibras elásticas, contrariamente a lo que nosotros observamos, no se modificaban por la criopreservación ni por la descongelación.

Esta aparente discrepancia en algu-

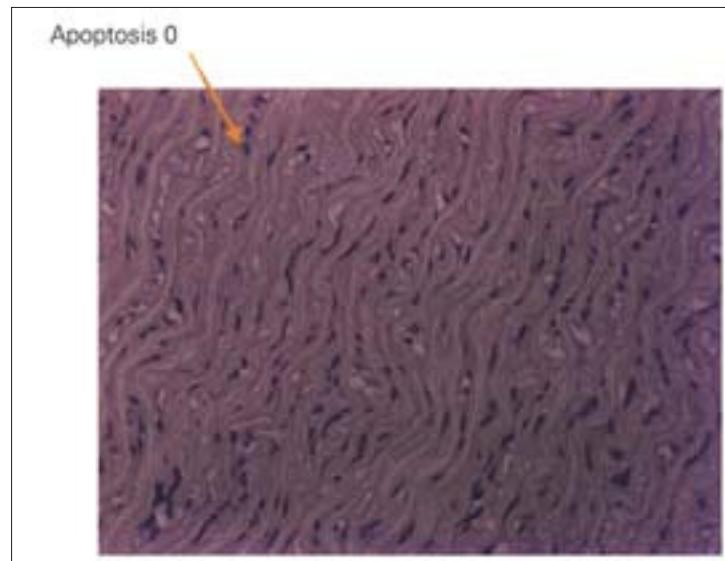


Figura 10. Apoptosis 0; revelado con peroxidasa; 400x.

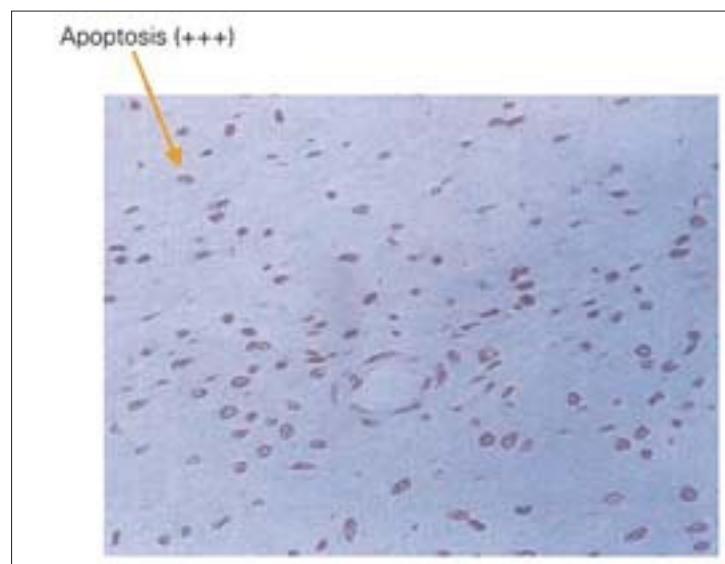


Figura 11. Apoptosis +++; revelado con peroxidasa; 400x.

nos de los resultados publicados frente a nuestro trabajo podría deberse a los diferentes tipos de arterias utilizadas, ya que la estructura de cada una de ellas presenta ligeras diferencias. Ello apunta a la necesidad de buscar protocolos de criopreservación y almacenamiento ajus-

tados a cada segmento arterial (aorta, femoropoplítea, etc.) [4,11,27].

En nuestro trabajo no se detectó la presencia de apoptosis después de seis meses de criopreservación.

De nuestros resultados podemos concluir que la criopreservación parece influir en la viabilidad de los segmentos vasculares y que estos daños se producen en toda la estructura de la pared, tanto en la zona endotelial como en las elás-

ticas tras el proceso de criopreservación. Las consecuencias de estos cambios histológicos tras la criopreservación para el éxito del injerto y el proceso del rechazo deberían evaluarse después del implante de estos alioinjertos arteriales.

En conclusión, es posible que los refinamientos de la metodología de criopreservación actual permitan una mejor recuperación funcional de las aortas de cerdo tras la descongelación.

Bibliografía

1. Stanke F, Riebel D, Carmine S, Cracowski JL, Caron F, Magne JL, et al. Functional assessment of human femoral arteries after cryopreservation. *J Vasc Surg* 1998; 28: 273-83.
2. Gournier JP, Favre JP, Gay JL, Barral X. Cryopreserved arteries allografts for limb salvage in the absence of suitable saphenous vein: Two-year results in 20 cases. *Ann Vasc Surg* 1995; 9: S7-14.
3. Wagstaff SA, Grigg MJ. Arterial homografts—possible solution to an infective dilemma. *Cardiovasc Surg* 1996; 4: 796-800.
4. Ku DD, Winn MJ, Grigsby T, Caulfield JB. Human coronary vascular smooth muscle and endothelium-dependent responses after storage at -75°C. *Cryobiology* 1992; 29: 199-209.
5. Nataf P, Hadjiisky P, Lechat P, Mougenot N, Peuchmaurd M, Gouezo R, et al. Effect of cold anoxia on cryopreservation on metabolic and contractile functions of human internal mammary artery. *Cryobiology* 1995; 32: 327-33.
6. Müller-Schweinitzer E, Mihatsch MJ, Schilling M, Haefeli W. Functional recovery of human mesenteric and coronary arteries after cryopreservation at -196°Cmedium. *J Vasc Surg* 1997; 25: 743-50.
7. Müller-Schweinitzer E, Stulz P, Striffeler H, Haefeli W. Functional activity and transmembrane signaling mechanisms after cryopreservation of human internal mammary arteries. *J Vasc Surg* 1998; 27: 528-37.
8. Müller-Schweinitzer E. Cryopreservation: A useful technique for storing tissues for pharmacological investigations. *Trends Pharmacol Sci* 1988; 9: 221-3.
9. Müller-Schweinitzer E. As for cryopreserved blood vessels in pharmacological research. *Cryobiology* 1994; 31: 57-62.
10. Ku DD, Willis WL, Caulfield JB. Retention of endothelium-dependent vasodilatory responses in canine coronary arteries following cryopreservation. *Cryobiology* 1990; 27: 511-20.
11. Elmore JR, Gловички P, Brockbank KGM, Miller VM. Cryopreservation affects endothelial and smooth muscle function of canine autogenous saphenous vein grafts. *J Vasc Surg* 1991; 13: 584-92.
12. Louagie YA, Legrand-Monsieur A, Lavenne-Pardon E, Remacle C, Delvaux P, Maldague P, et al. Viability of long term cryopreserved human saphenous veins. *J Cardiovasc Surg* 1990; 31: 92-100.
13. Passani SL, Angelini GD, Breckenridge IM, Newby AC. Endothelial function can be preserved during cryo-storage of human saphenous vein. *Eur J Cardio-Thorac Surg* 1988; 2: 233-6.
14. Carrel A. Heterotransplantation of blood vessels preserved in cold storage. *J Exp Med* 1907; 9: 226.
15. Carrel A. The preservation of tissues and its applications in surgery. *JAMA* 1912; 59: 523.
16. Weber TR, Dent TL, Lindenauer SM, Allen E, Weatherbee L, Spenc HH, Gleich P. Viable vein graft preservation. *J Surg Res* 1975; 18: 247.
17. Buján J, Pascual G, García-Hondurilla N, Gimeno MJ, Jurado F, Carrera-San Martín A, et al. Rapid thawing increases the fragility of the cryopreserved arterial wall. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000; 20: 13-20.
18. Hunt CJ, Song YC, Bateson EA, Pegg DE. Fractures in cryopreserved arteries. *Cryobiology* 1994; 31: 506-515.
19. Pegg DE, Wusteman MC, Boylan S. Fractures in cryopreserved elastic arteries. *Cryobiology* 1997; 34: 183-92.
20. Müller-Schweinitzer E, Tapparelli C. Functional

- studies on human veins after storage at -196°C . *J Pharmacol* 1986; 88: 685-687.
21. Pascual G, García-Hondurilla N, Gimeno MJ, Jurado F, Turégano F, Bellón JM, et al. El proceso de la descongelación lenta mantiene la viabilidad de la pared arterial criopreservada. *Angiología* 2000; 1: 25-32.
22. Nataf P, Hadjilisky P, Lechat P, Peuchmaurd M, Guettier C, Mougenot N, et al. Viability of cryopreserved arterial wall: enzyme-histochemical and physiological markers. *Cellular and Molecular Biology* 1994; 40: 803-10.
23. Bellón JM, Gimeno MJ, Pascual G, García-Hondurilla N, Domínguez B, Buján J. Arterial damage induced by cryopreservation is irreversible following organ culture. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1999; 17: 136-43.
24. Eskew TD, Ollerenshaw JD, Philpott JM, Dennis K, Dawson P, Sun YS, et al. Successful small diameter arterial grafting using cryopreserved allograft arteries. *ASAIO Journal* 1997; 43: M522-6.
25. Mesa F, Serra JM, Herreros J. Vascular cryopreservation in microsurgery. *Journal of reconstructive microsurgery* 1997; 13: 245-50.
26. Nataf P, Guettier C, Bourbon A, Nappi F, Lima L, Dorent R, et al. Influence of arterial allograft preparation techniques on chronic vascular rejection: a histological study. *Transplant Proc* 1996; 28: 2890-2.
27. Stanke F, Pharm D, Riebel D, Carmine S, Czakowski JL, Caron F, et al. Functional assessment of human femoral arteries after cryopreservation. *J Vasc Surg* 1998; 28: 273-283.

EFFECTO DEL ALMACENAMIENTO EN FASE GASEOSA SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR, LA APOPTOSIS Y LA ACTIVIDAD FUNCIONAL EN AORTAS DE CERDO CRIOPRESERVADAS. ESTUDIO PRELIMINAR

Resumen. Objetivos. Analizar las consecuencias del protocolo de congelación y del método de almacenamiento utilizado sobre la actividad funcional, la estructura anatomo-patológica y el grado de apoptosis de las aortas abdominales de cerdo criopreservadas durante seis meses, tras la descongelación. Materiales y métodos. Se obtuvieron injertos arteriales de cerdos y cada aorta se dividió en dos fragmentos. Grupo 1: segmentos en fresco o bien fijados en formaldehído tras la toma de la muestra (grupo control). Grupo 2: segmentos fijados tras incubación antibiótica y criopreservación durante seis meses para un estudio anatomo-patológico y de apoptosis, o bien utilizados directamente tras su descongelación para un estudio funcional. La incubación antibiótica se realizó en medio de un cultivo RPMI suplementado con antibióticos. Después de la incubación antibiótica, la criopreservación se llevó a cabo en medio RPMI con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). La tasa de enfriamiento fue de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, y el posterior almacenamiento se realizó en fase gaseosa. Resultados. No

EFEITO DO ARMAZENAMENTO EM FASE GÁS SOBRE A VIABILIDADE CELULAR, APOPTOSE E ACTIVIDADE FUNCIONAL NA AORTA DE PORCO CRIOPRESERVADA. ESTUDO PRELIMINAR

Resumo. Objectivo. Analisar as consequências do protocolo de congelação e do método de armazenamento utilizado sobre a actividade funcional pós-descongelação, a estrutura anatomo-patológica e o grau de apoptose das aortas abdominais de porco criopreservadas durante seis meses. Materiais e métodos. Obtenção de enxertos arteriais de porco. Cada aorta divide-se em dois fragmentos. Grupo 1: segmentos em fresco ou bem fixados em formaldeído após a colheita da amostra (grupo de controlo). Grupo 2: segmentos fixados após incubação antibiótica e criopreservação durante seis meses para um estudo anatomo-patológico e de apoptose, ou ainda, utilizados directamente após a sua descongelação para um estudo funcional. A incubação antibiótica realizou-se no meio de uma cultura RPMI com suplemento de antibióticos. Depois da incubação antibiótica, a criopreservação realizou-se em meio RPMI + 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), e o grau de arrefecimento foi de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e posterior armazenamento em fase gás. Resultados. Não há diferença quanto ao

hay diferencia en cuanto al grado de apoptosis en los dos grupos, ni diferencias significativas en el grado de fragmentación de las elásticas (algo mayor en el grupo 2). Se observa un aumento tanto del grado de despegamiento como del desprendimiento endotelial en el grupo congelado con respecto al grupo control. Despues de la descongelación, las máximas respuestas a los vasoconstrictores probados (KCl y noradrenalina) fueron del 13 y el 24% de las respuestas de las aortas que se obtuvieron en fresco. Las respuestas relajantes independientes del endotelio al nitroprusiato sódico estaban reducidas y se produjo una importante reducción de las respuestas de relajación dependientes del endotelio a la acetilcolina. Conclusiones. El método de criopreservación que se empleó disminuyó las respuestas de contracción y relajación a los seis meses y produjo cambios morfológicos importantes en cuanto a la conservación del endotelio y de las elásticas, pero no alteró el grado de apoptosis. [ANGIOLOGÍA 2004; 56: 107-21]

Palabras clave. Actividad funcional. Apoptosis. Contracción. Relajación. Segmentos vasculares. Viabilidad.

grau de apoptose nos dois grupos, nem diferenças significativas no grau de fragmentação das fibras elásticas (algo maior no grupo 2). Observa-se um aumento tanto no grau de descolamento como do desprendimento endotelial no grupo congelado comparativamente ao grupo de controlo. Após a descongelação, a resposta máxima aos vasoconstritores testados (KCl e noradrenalina) foi de 13 e 24% das respostas das aortas que se obtiveram em fresco. As respostas de relaxamento independentes do endotélio, ao nitroprussiato sódico estavam reduzidas, além de que se produziu uma importante redução das respostas de relaxamento dependentes do endotélio à acetilcolina. Conclusões. O método de criopreservação utilizado diminuiu as respostas de contracção e relaxamento aos seis meses, assim como produziu alterações morfológicas importantes quanto à conservação do endotélio e das fibras elásticas, mas não alterou o grau de apoptose. [ANGIOLOGÍA 2004; 56: 107-21]

Palavras chave. Actividade funcional. Apoptose. Contracção. Relaxamento. Segmentos vasculares. Viabilidade.