Estudio ultraestructural del comportamiento de xenoinjertos vasculares sometidos a dietas hiperlipídicas

M.J. Vallina-Vázquez, F.J. Mateos-Otero, M.V. Diago, V.M. Gutiérrez-Alonso, C. Vaquero-Puerta

ULTRASTRUCTURAL STUDY ABOUT THE EFFECT OF THE HIPERLIPIDIC DIETS ON CRIOPRESERVED VASCULAR XENOGRAFTS

Summary. *One proceeds to the ultrastructural analysis of the wall of the native aorta and the criopreserved xenografts, implanted in Wistar-Lewis rats submitted to aterogenic diets. For this, different groups of study are established, in equal number and with a distribution of the individuals at random. It is a question of determining if the injuries induced by the hiperlipidic nourishment are identical in both types of arterial vessels or if they present significant differences. Once the period of investigation is finished, the obtained results suggest that the heterologous grafts are more sensitive to the pathogenic action of the diets rich in fats. The application of the electronic microscopy, both of transmission and of sweep, has allowed to value the behaviour of the implants in a suitable form. [ANGIOLOGÍA 2003; 55: 7-20]*

Key words. *Atherogenic. Bioprosthesis. Hiperlipidics diets. Microscopy electron. Transplantation heterologous. Xenografts.*

Introducción

En las últimas décadas, dado el desarrollo de la medicina, más específicamente de la cirugía y, en concreto, de la cirugía vascular, se han incrementado las posibilidades de poder paliar los efectos derivados de la patología arterial periférica, tanto en las lesiones oclusivas como en las aneurismáticas [1]. El tratamiento quirúrgico se basa en el concepto de que la aterosclerosis es un proceso sistémico, pero con una afectación local o regional y con una localización segmentaria dentro del sistema vascular arterial. En la mayoría de los casos existen segmentos arteriales proximales y distales a la lesión suficientemente permeables y libres de afectación ateromatosa que permiten la realización de una derivación o *bypass*, en el que un segmento arterial sirve como dador y otro como receptor [2].

Es evidente que aún no se ha encontrado el sustituto arterial ideal para la realización de estas derivaciones. Los productos plásticos, de amplio uso y muy perfeccionados desde el punto de vista del desarrollo de los materiales, son de elección en la reparación de los segmentos arteriales de gran calibre y alto flujo,

Unidad de Investigación Angiológica. Departamento de Cirugía Experimental. Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid. Valladolid, España.

Correspondencia:
Dr. Manuel Javier Vallina Vázquez. Co rín Tellado, 8, 5.º B. E-33204 Gijón. E-mail: mjvallina@terra.es

Este trabajo de investigación ha recibido una ayuda para el desarrollo de proyectos de investigación por el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) Nº Exp. 00/0104.

© 2003, *ANGIOLOGÍA*

como el sector aortoilíaco, donde ofrecen unos buenos resultados. En sectores más distales, los resultados son peores, tanto por las características del injerto como por las condiciones hemodinámicas del sector arterial donde se actúa quirúrgicamente [3].

La utilización de material biológico está indicada preferentemente en sectores como el femoropoplíteo, o en operaciones derivativas venosas [4]. Presenta, como limitaciones, el problema del escaso calibre ocasional del injerto y, fundamentalmente, su escasa disponibilidad, al no ser posible su obtención del paciente receptor si se ha extraído previamente para otros usos, como en el caso de la vena safena y la cirugía coronaria, o si está afectado por ciertos tipos de patología, como la enfermedad varicosa o tromboembólica [5].

El banco de vasos fue una idea que tuvo vigencia hace unas décadas, pero que fracasó, posiblemente, por lo inadecuado del método de preservación o por no contemplar de factores fisiopatológicos del material conservado [6]. En el momento actual, con el progreso de las técnicas y métodos criogénicos y el mayor conocimiento de la evolución de los materiales biológicos homólogos 'en caliente', se ha retomado la idea de emplear materiales conservados de este tipo, obtenidos al mismo tiempo que los órganos para trasplante. Las bases conceptuales de esta línea de actuación están en la certeza de que el mejor sustitutivo de un órgano o tejido es otro con idénticas características pero sano [7].

La finalidad del presente estudio es valorar el comportamiento biológico de sustitutivos vasculares de material heterólogo crioconservado, es decir, procedente de otras especies animales, como alternativa en la sustitución vascular. En un futuro, cada vez más cercano, es posible que se llegue a emplear el citado material heterólogo para la sustitución de los vasos dañados por la aterosclerosis, o incorporados a los injertos en los trasplantes de órganos. Sin embargo, resta por resolver la incógnita sobre la reacción de los citados vasos frente a los factores de riesgo típicos de la especie humana.

El objetivo principal de este trabajo es valorar experimentalmente los efectos que tiene un factor de riesgo aterogénico –una dieta hiperlipídica– sobre el desarrollo de lesiones en la pared arterial y en los sustitutivos arteriales previamente implantados. El fin es saber si el material injertado resistirá los efectos de este factor nosológico de la misma forma que los vasos autólogos o si, por el contrario, se van a desencadenar fenómenos metabólicos *in situ*, con una mayor incidencia de patología local en el vaso trasplantado.

La aplicación de los resultados del estudio en el área de la salud puede ser muy relevante si podemos llegar a ofrecer un sustitutivo vascular biológico con altas tasas de permeabilidad, exento de complicaciones tardías y de un coste posiblemente inferior. Se estaría recuperando la antigua idea de emplear injertos vasculares procedentes de otras especies animales, pero con nuevos tratamientos técnicos desde el punto de vista metodológico y de preservación, como es el tratamiento con crioconservación.

Material y método

Para realizar este trabajo de investigación se utilizó la rata –*Rattus norvegicus albinus*– como material biológico receptor. Se emplearon 72 ratas macho de la raza Wistar-Lewis, cuyo peso al inicio del experimento estaba comprendido entre los 275 y los 300 g. En el diseño experimental los animales se repartieron al azar en seis grupos, uno de ellos control. Se reemplazaron los animales que fallecían durante el estudio, para obtener un número de 12 y conseguir que todos los grupos fueran homogéneos. Se estabularon los animales a lo largo de todo el proceso en jaulas metabólicas –un animal en cada jaula– y se mantuvo la temperatura dentro del animalario entre 22 y 24 °C, con una humedad relativa del aire del 45-55% y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas cada uno. Se procedió a realizar una limpieza semanal de las citadas jaulas. El trabajo se desarrolló siguiendo las directrices del Consejo de Europa y de la Legislación Española para la utilización de animales de laboratorio para fines científicos.

Protocolo experimental

Los grupos de estudio, cada uno de ellos con 12 ratas, son los siguientes:

- *Grupo I:* implantación de un injerto aórtico criopreservado a –30 ºC.
- *Grupo II:* implantación de un injerto aórtico criopreservado a –196 ºC.
- *Grupo III:* injerto criopreservado a –30 ºC y dieta aterogénica.
- *Grupo IV:* injerto criopreservado a –196 ºC y dieta aterogénica.
- *Grupo V:* aterogénico.
- *Grupo VI:* control.

Técnica quirúrgica

Extracción de los injertos

El animal donante elegido fue el hámster. Para la anestesia se empleó el clorhidrato de ketamina en dosis de 60 mg/kg de peso corporal por vía intraperitoneal. Se rasuró la parte ventral del tórax y el abdomen y se realizó el abordaje del vaso por toracolaparotomía, con una incisión en el quinto espacio intercostal y de la línea media en el abdomen. Se disecó la aorta toracoabdominal desde su nacimiento hasta su porción más caudal, y se procedió a la preparación del vaso con la ligadura de las ramas colaterales. Tras la sección proximal y distal de la aorta y sus ramas colaterales, se extrajo un segmento vascular de unos 10 cm de longitud. La luz de la aorta se lavó perfundiendo una solución de Krebs-Ringer lactato, mediante la utilización de un catéter de teflón n.º 16. A continuación se incluyó la preparación en el método de criopreservación, utilizando como crioprotector el dimetil sulfóxido.

En el caso de la conservación a –30 ºC, se introdujo el segmento arterial extraído en un congelador de enfriamiento rápido y progresivo hasta alcanzar la citada temperatura. Para la criopreservación a –196 ºC, se colocó el injerto en un contenedor, que se introdujo en nitrógeno líquido durante 20 segundos. Posteriormente se mantuvo en un congelador a –196 ºC.

Los injertos permanecieron conservados en este medio 15 días, y se descongelaron de forma lenta y progresiva para su implantación.

Implantación de los injertos

El animal receptor –la rata– se anestesió de igual modo que el donante, usando clorhi-

drato de ketamina en dosis de 60 mg/kg de peso corporal y manteniendo la respiración espontánea. Se rasuró el animal, fijándolo en decúbito supino sobre una mesa operatoria para pequeños animales. La apertura de la cavidad abdominal se realizó mediante una incisión xifopubiana y con métodos de cirugía limpia. Tras rechazar y humedecer el paquete intestinal, se disecó la aorta abdominal infrarrenal y se separó de la vena cava a lo largo de un trayecto de 2 cm. Una vez que se aseguró la oclusión temporal de un segmento del vaso con la colocación de un*clamp* aproximador de Acland, y previa sección de la aorta de la rata, se implantó un segmento de injerto aórtico criopreservado de hámster de 1 cm de longitud y se practicaron las anastomosis en término-terminal con una sutura entrecortada de seis puntos de nylon 8/0 en ambos extremos. Se constató la permeabilidad del injerto y se cerró la laparotomía en dos planos, uno profundo con una sutura continua de ácido poliglicólico de 4/0, y la piel en sutura discontinua. El animal se mantuvo en una caja de recuperación postoperatoria hasta comprobar su completo despertar; posteriormente, se trasladó a las jaulas de alojamiento.

Pautas alimenticias

Los tiempos de experimentación y pautas alimenticias se realizaron de la siguiente forma:

1. *Grupo control:* el tiempo de estudio fue de 30 días. Se les suministró agua y dieta sólida de mantenimiento (Panlab ®, A04) *ad libitum*.
2. *Grupo aterogénico:* el tiempo de experimentación fue el mismo. Se les suministró agua y un pienso aterogénico *ad libitum.* El pienso se prepara según el protocolo de Viver y Huguet modificado, con las siguientes mezclas:
   - Colesterol: 25,5 g.
   - Tiouracilo: 1,5 g.
   - Ac. cólico: 10,0 g.
   - Mantequilla: 200,0 g.
   - Vitamina D: 5,0 mg.
   - Agua destilada para mezclar.
   - Polvo del pienso, que se mezcla con el resto de los componentes, para dar consistencia y forma cilíndrica a este alimento –similar al de la casa distribuidora–, en proporción de unos 200 g por kilo de mezcla.

Una vez finalizado el tiempo de experimentación, se realizó el pesaje de los animales en la misma balanza de precisión que se utilizó al comienzo del estudio, para valorar el incremento o disminución del peso según los grupos. Se practicó asimismo una exploración externa *de visu*, buscando identificar las alteraciones que se produjeron en el pelaje, etc. En este momento se aplicó el tratamiento programado para cada grupo, con la implantación de los diversos injertos en aquellos animales a los que les había correspondido recibir un sustitutivo vascular de uno u otro tipo.

Evaluación de los animales

Se practicó una evaluación de los animales, la mitad de cada grupo al mes y la otra mitad a los tres meses, tras haberlos mantenido en cada caso con el mismo tipo de alimentación que habían recibido antes del inicio del tratamiento.

Se realizaron estudios ultraestructurales. Para ello se procesaron las muestras

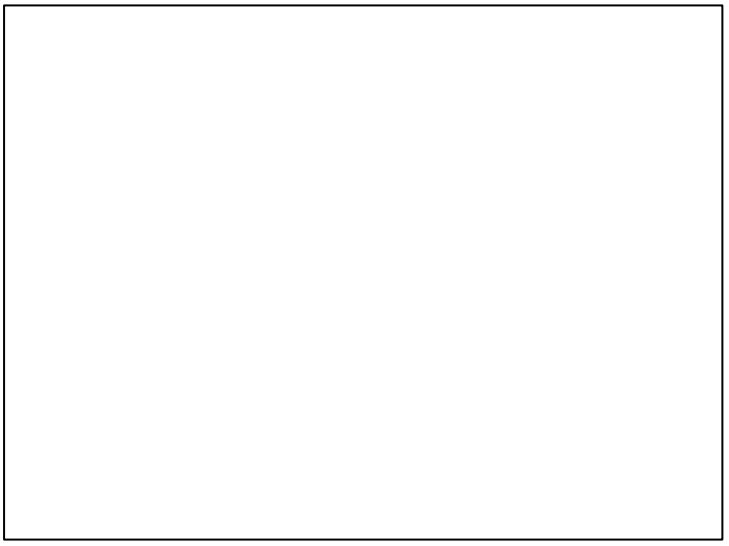

Figura 1. Imagen ultraestructural de la capa íntima en el endotelio de un xenoinjerto criopreservado a –30 ºC, donde se aprecia gran cantidad de tejido conectivo en la capa muscular (12.500×).

según un protocolo estándar y se observaron mediante el microscopio electrónico de transmisión y el de barrido.

Resultados

Microscopía electrónica de transmisión

La valoración mediante microscopía electrónica de transmisión con pocos aumentos nos ha permitido observar fundamentalmente la íntima, región intimal o parte más interna del injerto. Es de destacar la gran cantidad de tejido conectivo existente en todas las preparaciones observadas de los xenoinjertos vasculares. Los implantes han presentado al mes una región intimal cubierta de una lámina endotelial, con una disposición más o menos irregular y células haciendo protrusión en la luz del vaso. Estas células endoteliales han mostrado una membrana celular muy irregular, con múltiples entrantes y salientes y la emisión de lo que podríamos denominar como pseudópodos. El núcleo ha ocupado prácticamente el 50% de la célula y, a semejanza de la misma, ha mostrado un contorno muy irregular. El contenido citoplasmático ha sido muy escaso, y los orgánulos difícilmente reconocibles en las preparaciones. La membrana basal ha perdido su disposición habitual, se ha mostrado muy irregular y ha desaparecido en muchas ocasiones; otro tanto podemos decir de la membrana limitante interna. En la capa media se han conservado las fibras musculares, con el núcleo en su interior; sin embargo, han ido infiltrando esta capa formaciones de tejido conjuntivo, que separaban entre sí las formaciones musculares (Fig. 1). En los animales de los grupos criopreservados a –196 ºC se han conservado mejor las estructuras parietales.

A los tres meses, los xenoinjertos, sobre todo los criopreservados a –30 ºC, presentaron una pérdida endotelial en la capa más interna, cuyo tejido conectivo tomó contacto con el contenido hemático. Se observó una corrugación de dicha capa y aparecieron formaciones onduladas constituidas fundamentalmente por el tejido conectivo. Ocasionalmente irrumpían en esta región parte de las fibras musculares, haciendo desaparecer la membrana limitante interna. En algún caso se han visto estas fibras musculares muy cercanas a la luz del vaso (Fig. 2).

El grupo de injertos conservados a –30 °C y aterogénico, tratado con dieta hiperlipídica, es el que presenta las alteraciones más llamativas; son además muy uniformes tanto en la aorta abdominal como en el injerto, por lo que se describen conjuntamente.

Se ven acúmulos de lípidos en las células endoteliales y en la membrana basal, que además se encuentra engrosada y presenta calcio. Ha sido posible apreciar la fragmentación y las duplicaciones frecuentes de la lámina elástica interna, a través de las cuales se exponen a la luz arterial células musculares lisas muy modificadas, con acumulaciones de lípidos y presencia de calcio en su interior.

Sin embargo, los cambios más llamativos se manifiestan en la capa media. que aparece extraordinariamente desorganizada: hay una degeneración de las fibras musculares, acúmulos de lípidos intracelulares y extracelulares, aumento de fibras de colágeno y tejido conjuntivo, calcificación, metacromasia y zonas de necrosis, así como auténticas placas ateroscleróticas.

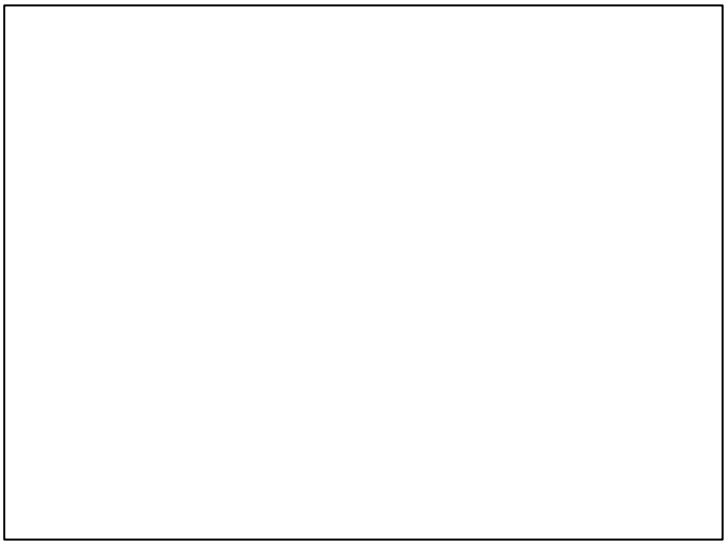

Figura 2. Imagen ultraestructural, a los tres meses de su implantación, de la pared de un xenoinjerto extraído de un animal que no ha recibido dieta aterogénica su implantación (12.500×).

No hubo regresión en la evaluación a los tres meses de los cambios aterogénicos referidos al mes. Las alteraciones inflamatorias del injerto, tanto al mes como a los tres meses, han sido muy intensas, con la aparición de células de rechazo e infiltración linfocitaria, lesiones que se han sumado a las propiamente aterogénicas y que han mostrado un claro perfil de rechazo del injerto.

Con referencia a los injertos conservados a –196 °C y sometidos a dieta aterogénica, las células endoteliales, que se definen bien, presentan gran cantidad de digitaciones que se dirigen hacia la luz arterial, como en la aorta receptora. A diferencia de las arterias nativas, las células endoteliales del injerto no acumulan grandes gotas de lípidos, que tampoco se almacenan entre la célula endotelial y la membrana basal. Más bien parece que estos lípidos se localizan presumiblemente en forma de multitud de microvesículas, en el interior de las células del endotelio (Fig. 3).

Frente a lo que sucedía en la aorta, en el injerto ha sido frecuente encontrar células mononucleadas adheridas al endotelio, con unas partículas electrón-densas intermedias que no hemos podido identificar. Este tipo de partículas también se ha visto en otras ocasiones próximo al endotelio, pero sin que aparezcan en su proximidad células mononucleadas.

Asimismo se han observado en el injerto zonas de disrupción del endotelio, que coincidían en general con engrosamientos de la membrana basal, que adquiere un aspecto diferente al que presenta en la aorta –similar al del plasma–; muestra una estructura más definida, en la que pueden verse con nitidez las fibras elásticas.

Si bien se han podido apreciar ocasionalmente duplicaciones de la lámina elás-

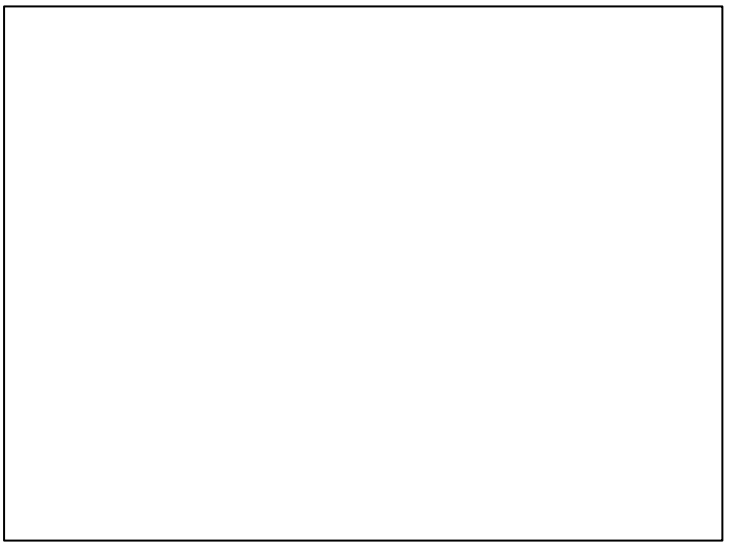

Figura 3. Imagen de la pared vascular en la zona intimal, en la que se aprecian los acúmulos lipídicos en la parte endotelial en un grupo aterogénico (15.000×).

tica interna, la característica más importante es el engrosamiento manifiesto que se puede observar, ya que tiene un grosor doble que el de la elástica interna de la aorta receptora. En ningún caso se han observado roturas.

Pese a todo lo expuesto anteriormente, las alteraciones más llamativas se presentan en la capa media, donde, si bien existe un claro predominio de células musculares con enormes vacuolas en su interior, y relativamente bien organizadas, existe un aumento del tejido conjuntivo y de las fibras colágenas.

Es de destacar el predominio en el injerto de un cierto componente inflamatorio evaluado en los diferentes tipos de estudios.

A los tres meses se han mostrado más manifiestas las alteraciones del injerto; así, la íntima, bien definida, presenta un comportamiento intermedio entre las lesiones observadas al mes y las de la aorta del grupo aterogénico a los tres meses, de manera que, junto a múltiples acúmulos de lípidos intracelulares, se añaden agrupaciones aisladas subendoteliales. La membrana basal se presenta muy engrosada y en la lámina elástica interna se observan agudas alteraciones. No aparece en numerosas zonas, en las que se ha sustituido por auténticos estallidos de la media sobre las células endoteliales, tanto de las fibras musculares como del tejido conjuntivo y las fibras de colágeno. Existe una importante desorganización de la capa media, con un predominio del tejido conjuntivo y las fibras de colágeno sobre las células musculares, que se encuentran muy modificadas, con calcificaciones y, ocasionalmente, grandes vacuolas de lípidos. Como ya se ha referido, se produce un aumento de tejido conjuntivo y, sobre todo, de fibras de colágeno, que se disponen formando numerosos haces de pequeño tamaño.

En la evaluación al mes del grupo aterogénico, las células endoteliales de la aorta abdominal, que se encuentran bien definidas, presentan numerosas digitaciones citoplásmicas hacia la luz arterial, en la que puede distinguirse el plasma con hematíes apilados, plaquetas aisladas y grandes gotas de lípidos. Estas digitaciones citoplásmicas tienen tamaños y formas muy diversos y se disponen predominantemente en la zona de la célula donde se encuentra el núcleo. Las células endoteliales, que se encuentran llenas de acúmulos de lípidos dispuestos en vacuolas, adoptan configuraciones dispares y parecen apoyarse directamente sobre la membrana basal, que aparece engrosada de forma irregular y con un aspecto muy

similar a como se distingue el plasma en la preparación. En ninguna de las fotografías estudiadas hemos podido observar células mononucleadas adheridas al endotelio. Sin embargo, se ha podido apreciar repetidamente que las gotas de grasa libres en el plasma tienden a situarse espontáneamente paralelas al endotelio, que se incorporan en éste y bajo el mismo, es decir, entre la célula endotelial y sobre la membrana basal, sin que medie ningún tipo celular en su transporte, sino por la apertura de las uniones entre las células endoteliales o por emisión de pseudópodos por parte de las mismas, que terminan englobando la gota de grasa y constituyendo una vesícula. Posteriormente eliminan por exocitosis la grasa, que se sitúa entre la célula endotelial y la elástica interna, sobre la membrana basal.

Ocasionalmente hemos podido observar una afectación de la elástica interna, en forma de roturas e invasión por tejido conectivo y digitaciones de fibras musculares que se dirigen hacia el endotelio. Ha sido frecuente comprobar, sin embargo, la duplicación de la membrana elástica interna, que viene a tener de forma constante un grosor medio de casi dos veces el de las aortas del grupo control.

En la media se produce una importante desestructuración; las fibras musculares adoptan morfologías aberrantes, se adelgazan y emiten múltiples digitaciones citoplásmicas. Además, se presenta un gran aumento de tejido conjuntivo y fibras de colágeno, que predominan sobre las fibras musculares en las fotografías estudiadas.

No se han distinguido modificaciones relevantes de la adventicia, y en las preparaciones observadas a los tres meses han persistido en mayor o menor cuantía las alteraciones estructurales citadas.

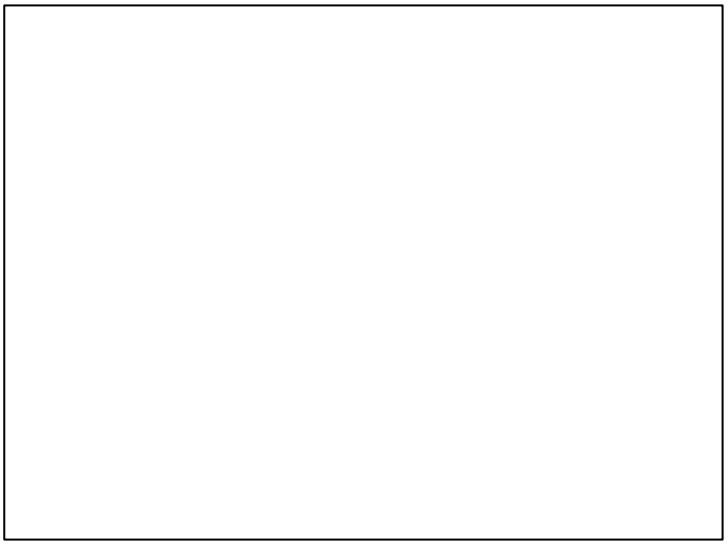

Figura 4. Imagen de microscopía electrónica de barrido de un xenoinjerto (–196 ºC) al mes de su implantación, donde se aprecia la parte intimal del mismo en un grupo que no ha sufrido ningún proceso aterogénico (2.500×).

Los hallazgos observados en el grupo control son uniformes en las diferentes muestras de la arteria aorta abdominal. Se distingue nítidamente la íntima, constituida por una sola capa de células endoteliales que aumentan de volumen en la zona correspondiente al núcleo, con una forma siempre alargada. Esta capa de células se encuentra separada de la membrana elástica interna por un espacio subendotelial muy fino que tiene un aspecto muy similar al del plasma, del que se encuentra separado por la íntima, constituido por tejido conectivo con múltiples microfibrillas.

La elástica interna se aprecia claramente en todas las preparaciones observadas, de color blanco y con un aspecto relativamente homogéneo. No se han encontrado habitualmente fenestraciones ni duplicaciones.

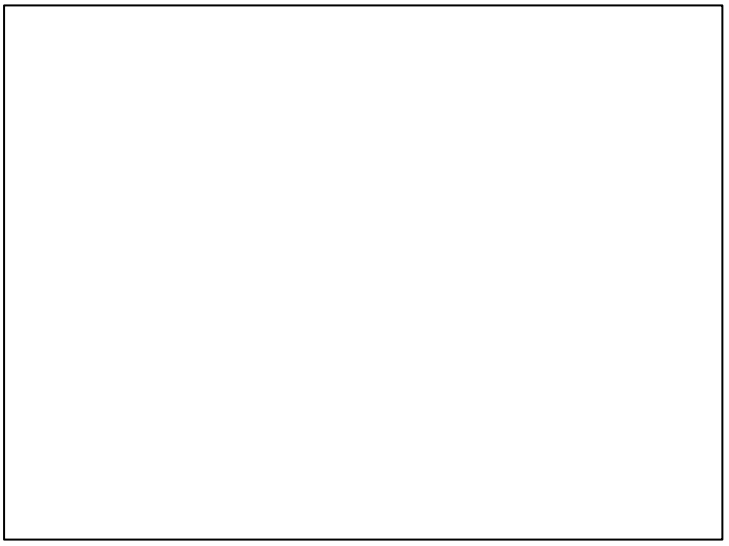

Figura 5. Imagen bajo microscopía electrónica de barrido de la cara intimal de un xenoinjerto (conservado a –30 ºC) a los tres meses de su implantación, donde ha desaparecido la cubierta endotelial (2.000 ×).

Por fuera de la lámina elástica interna se encuentra la capa media, constituida por fibras musculares lisas bien definidas en su núcleo y orgánulos, separadas entre sí por un escaso tejido conectivo que contiene múltiples microfibrillas y, frecuentemente, numerosos gránulos densos.

En la parte exterior de esta capa muscular se dispone la lámina elástica externa que, si bien se define con aceptable nitidez, no alcanza la de la elástica interna.

Finalmente se dispone la adventicia, constituida por tejido conectivo, fibras colágenas, células mononucleadas y ocasionalmente linfocitos. Inmersas en esta matriz, más o menos definida, se aprecian numerosas formaciones vasculares y nerviosas.

Esta uniformidad se ha mantenido al mes y a los tres meses en el estudio.

Microscopía electrónica de barrido

La observación con esta técnica de las superficies internas de las prótesis e injertos implantados nos ha permitido valorar fundamentalmente la cubierta endotelial, cuando ésta estaba presente, o, en su defecto, las formaciones situadas en estas zonas del vaso. Hemos podido evidenciar una gran cantidad de células hemáticas en la mayoría de los injertos evaluados al mes, generalmente leucocitos adheridos a esta zona. También ha sido frecuente observar formaciones de trombocitos, con presencia a menudo de pseudópodos. La cubierta endotelial de los xenoinjertos se ha mostrado más o menos conservada, pero con grandes superficies de descamación en muchas ocasiones (Fig. 4).

A los tres meses se ha podido captar en los xenoinjertos la presencia de un entramado conjuntivo en la superficie interna del vaso, que ha aparecido desprotegido de toda cubierta endotelial (Fig. 5). En el interior de esta red también se han podido observar células sanguíneas atrapadas. Sobre el tejido conjuntivo hemos visto gran cantidad de fibrina, más o menos organizada, y la disposición plaquetaria ocupando algunos vasos, a veces formando parte de microtrombos. Se ha podido apreciar una capa de células endoteliales de morfología bastante atípica, y generalmente unidas entre sí por pseudópodos sin lograr una cubierta de toda la superficie, en los xenoinjertos vasculares implantados en animales sometidos a dietas aterogénicas. La fibrina y las plaquetas suelen hacer acto de presencia y ocupar los espacios que dejan entre sí las células endoteliales. Asimismo, es frecuente observar otras células sanguíneas adheridas a la pared y formando conglomerados, como leucocitos o hematíes.

Las valoraciones con microscopía electrónica de barrido de las preparacio-

nes que procedían de xenoinjertos tratados a temperaturas de –30 y –196 ºC mostraban imágenes muy semejantes.

Tampoco mostraron diferencias las imágenes de las preparaciones tomadas de los grupos a los que se implantó un xenoinjerto tratado a –30 o–196 ºC, y posteriormente se sometió a dietas aterogénicas. Las alteraciones que se detectaron fueron muy similares: se observaron cambios morfológicos en la superficie interna intimal, con concreciones y desestructuraciones del endotelio, superponibles a los detectados con este mismo método de imagen en la aorta abdominal del grupo aterogénico (Fig. 6).

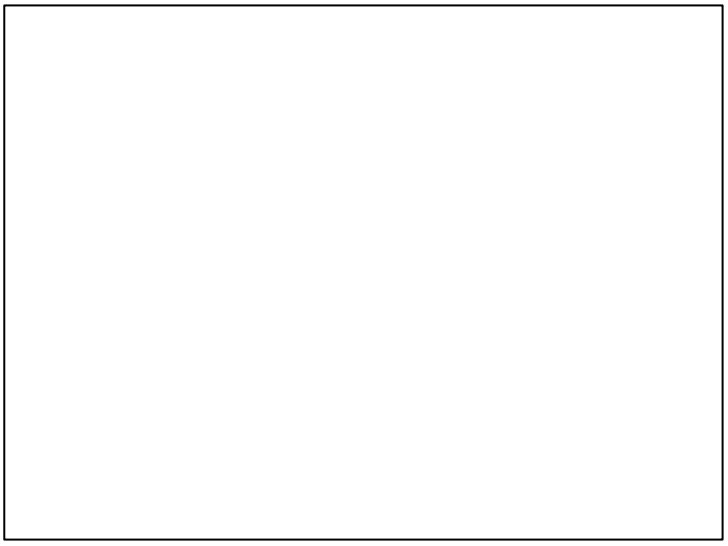

Figura 6. Imagen de la capa interna de la pared de un xenoinjerto (–196 ºC), parcialmente cubierto de células endoteliales, de un animal tratado con dieta aterogénica, al mes de su implantación (2.500 ×).

Discusión

Hemos considerado idónea la utilización de la aorta en el modelo experimental por ser precisamente este sector uno de los más afectados, desde el punto de vista del proceso asistencial normal [8]. Sin embargo, hay que reconocer que no es de los más empleados según la literatura. Esto puede deberse, en primer lugar, a que existen otros sectores, como el carotídeo, de más fácil acceso y menor dificultad técnica, por lo que requieren una menor infraestructura investigadora [9]. Sin embargo, en nuestro caso, y una vez adecuado el modelo experimental, que previamente se ha aplicado en otros estudios, ha resultado de muy fácil acceso y cómodo aislamiento. Se ha escogido para el presente estudio la rata macho albina de laboratorio, pues es un animal ya utilizado previamente por otros autores en trabajos experimentales de características similares [10,11], por su coste reducido de obtención y mantenimiento y porque requiere un sencillo alojamiento, manejo y toma de muestras biológicas [12]. Este animal alcanza el estado adulto en relativamente poco tiempo, pues la rata es una especie de vida corta (esto permite extender el tratamiento hasta abarcar una parte significativa de su vida) y muestra lesiones en todo equivalentes a las de los seres humanos. Es bien conocido que la incidencia de la enfermedad aterosclerosa es más alta en el hombre que en la mujer [13].

Si bien la rata se considerado generalmente como un animal muy resistente a la aterosclerosis, son muy numerosos los autores que han referido la aparición de lesiones en sus arterias completamente similares a las que aparecen en el ser humano, cuando se las somete a una dieta que contiene colesterol, un ácido biliar y un antitiroideo [14-16]. A los componentes de la dieta mencionados anteriormente se han asociado en este estudio dosis masi-

vas de vitamina D, pues ésta agrava el efecto aterotóxico de la hipercolesterolemia, tanto en la rata como en otros animales [17-19].

Desde el punto de vista macroscópico [20], nos han llamado la atención dos tipos de observaciones: el moteado difuso amarillento sobre la superficie rojiza del hígado que presentaban las ratas sometidas a dieta aterogénica, que sin duda ha tenido que ser observado también por otros autores, aunque no lo hemos encontrado descrito, y la ausencia de calcificación aparente de las arterias pertenecientes a las ratas de los grupos aterogénicos, pues los animales de ambos grupos también se trataron con dosis de vitamina D [21,22].

La utilización de la microscopía electrónica ha permitido valorar alteraciones ultraestructurales en los grupos estudiados, especialmente en los experimentales [17]. En lo que se refiere a la microscopía electrónica de transmisión, la investigación se ha centrado sobre todo en la íntima, más concretamente en el endotelio, puesto que es la capa que, a nuestro juicio, ofrece unos hallazgos más interesantes. Sin embargo, también se ha realizado, por sus interesantes aportaciones, la valoración del conjunto con bajos aumentos, con objeto de evidenciar cambios en la capa media y externa o adventicia. Con la microscopía electrónica de barrido se han obtenido imágenes muy llamativas de la cara interna o intimal, pues se visualizaban los procesos de neoendotelización sobre el estroma conjuntivo en las bioprótesis. Existe un hecho que ha llamado la atención en la primera observación de las preparaciones estudiadas: aparentemente, cada uno de los vasos arteriales valorados –aorta autóloga e injerto– presentan peculiaridades lesionales características. No se observaron, por tanto, lesiones equivalentes, pese a que se localizaron en la misma rata, sometidas a la misma dieta (colesterol, ácido cólico, tiouracilo y vitamina D), y que se extrajeron al mismo tiempo para su estudio. Así, en los grupos ateromatosos, mientras que los injertos presentan acúmulos endoteliales y subendoteliales de lípidos, desorganización de la media y gran aumento de colágeno y tejido conjuntivo, la arteria aorta nativa los acumula en forma de microvesículas y con un dato característico: la intensa alteración de la elástica interna.

Con respecto a los hallazgos encontrados en las arterias de las ratas sometidas a dieta aterogénica, debemos señalar que concuerdan con los que se han publicado en la literatura [23,24], salvo en lo referente a que en este estudio sólo hemos podido observar células mononucleadas adheridas al endotelio en la arteria aorta, mientras que este hecho es común en todas las arterias según otros autores [11,25].

Asimismo, conviene poner de manifiesto otros hechos observados. Así, mientras que, según algunos autores [17], la rotura de la elástica interna, la separación entre las fibras musculares y su vacuolización constituyen lesiones tardías, en nuestro estudio se hacen manifiestas ya a los 20 días en todos los cortes de la aorta abdominal de las ratas sometidas a dieta aterogénica. De acuerdo con otros estudios [11], se han podido observar unas estructuras densas esféricas, dispuestas entre las células mononucleadas y el endotelio, pero también las hemos podido

ver adheridas al endotelio, sin que existieran en sus proximidades células mononucleadas [9]. Por otro lado, debido a que no se ha podido apreciar la existencia de células mononucleadas cargadas de lípidos, la acumulación de lípidos subendoteliales y en la media sólo puede explicarse por un fenómeno de 'insudación' de los mismos desde la sangre.

La aparición en nuestro estudio de placas calcificadas en el xenoinjerto no ha sido detectada en investigaciones similares [26,27], aunque se ha señalado que suele aparecer de forma constante cuando se emplea material biológico, y sobre todo si éste tiene un origen heterólogo [28]. Esta placa de calcio, más o menos organizada, sí que ha conferido cierta rigidez a la prótesis, aunque no ha llegado a perder del todo su capacidad de distensión. No se apreciaba fácilmente con la simple observación del injerto, sino que su presencia se constataba en el momento de la ablación del mismo para su posterior examen ultraestructural. Su existencia no dependía directamente del estado de permeabilidad del injerto, y se ha dado la circunstancia de que sustitutivos vasculares totalmente permeables, congruentes con el vaso receptor, han presentado una calcificación de la pared en un mayor período de observación, en tanto que los injertos obstruidos no la han presentado o ha sido de escasa cuantía. Podemos pensar, a la luz de estas observaciones, que la influencia del grado de calcificación sobre la permeabilidad del vaso es muy escasa a corto plazo. Resultaría lógico concluir, sin embargo, que este acúmulo de material cálcico en la pared del vaso ha de distorsionar su estructura y, por lo tanto, debería cambiar sus propiedades funcionales desde el punto de vista biológico.

Podríamos afirmar que el comportamiento histológico de los injertos heterólogos implantados ha sido aceptable, pues la reacción generada en el hospedador ha sido muy baja. Consideramos que esto se debe, en parte, a que no hemos empleado medios de fijación como el alcohol, ni otros compuestos químicos como el glutaraldehído [29]. Estos productos posiblemente determinan la aparición de procesos microinflamatorios en el receptor, que a la larga tienden a 'cicatrizar' el injerto y hacerlo mucho más rígido, lo que desencadena una fibrosis de la media e hiperplasia de la íntima que conduce finalmente a la trombosis.

El tratamiento por el frío se puede considerar un método eficaz [30], que logra disminuir las tasas de antigenidad del injerto y consigue asegurar su conservación [31]. El tratamiento con nitrógeno líquido a –196 ºC (–195,8 ºC) consigue un enfriamiento rápido en el tejido. A pesar de que se reconoce la producción de finos acúmulos de cristales, sobre todo en la zona intracelular, su pequeño tamaño parece no desencadenar ninguna lesión importante, por lo que es factible alcanzar, tras su descongelación, una buena recuperación funcional del tejido [32].

Anteriormente ya se ha hecho referencia a la importancia que tiene el mantenimiento de la cubierta endotelial [33]. Se puede considerar que el xenoinjerto aporta esta cubierta durante el tiempo necesario para impedir la aparición de procesos trombóticos. Las funciones que tiene el endotelio son importantes; interfiere fun-

damentalmente en fenómenos como la agregación plaquetaria, la formación de trombina o la propia fibrinolisis [34]. Por ello, se le da una importancia vital, ya consignada, a la integridad de esta cubierta para la preservación de fenómenos trombóticos [35]. Quedan por tratar aspectos que, evidentemente, tienen una gran relevancia en lo que se refiere a la incorporación de tejidos extraños, muy especialmente los que proceden de otras especies animales, que sin dudan representan la clave de la posible utilización de estos injertos biológicos en el futuro [36,37].

Bibliografía

1. TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC). Management of peripheral arterial disease. Eur J Vasc Surg 2000; 19 (Suppl. A): S1-250.
2. Landry GJ, Moneta GL, Taylor LM, Edwards JM, Yeager RA, Porter JM. Long-term outcome of revised lower-extremity bypass grafts. J Vasc Surg 2002; 35: 56-63.
3. Reed AB, Conte MS, Belkin M, Mannick JA, Whitemore AD, Donaldson MC. Usefulness of autogenous bypass grafts originating distal to the groin. J Vasc Surg 2002; 1: 48-55.
4. Mamode N, Scott RN. Graft type for femoropopliteal by-pass surgery. (Chocrane Review). In Chocrane Database Syst Rev. Oxford: Update Software; 2001.
5. Walker PJ, Mitchell RS, McFadden PM; James DR, Mehigan JT. Early experience with cryopreserved saphenous vein allografts as a conduit for complex limb-salvage procedures. J Vasc Surg 1993; 18: 561-8.
6. Szilagyi DE, Mc Donald RT, Smith RF, Whitcomb JG. Biologic fate of human arterial homografts. Arch Surg 1957; 75: 506-29.
7. Callow AD. Arterial homografts. Eur Vasc Endovasc Surg. 1996; 12: 272-81.
8. Clowes AW, Ryan GB, Breslow JL, Karnovsky MJ. Absence of enhanced intimal thickening in the response of the carotid arterial wall to endothelial injury in hypercholesterolemic rats. Lab Invest 1976; 35: 6-17.
9. Kris Etherton PM, Cooper AD. Studies on the etiology of the hyperlipemia in rats fed an atherogenic diet. J Lipid Res 1980; 21: 435-42.
10. Joris I, Zand T, Nunnari JJ, Krolikowski FJ, Magno G. Studies on the pathogenesis of atherosclerosis. I. Adhesion and emigration of mononuclear cells in the aorta of hypercholesterolemic rats. Am J Pathol 1983; 113: 341-58.
11. Jadot G. Le rat de laboratoire. Paris: Masson; 1981.
12. Freedman DS, Jacobsen SJ, Barboriak JJ, Sobocinski KA, Anderson AJ, Kissebah AH, et al. Body fat distribution and male/female differences in lipids and lipoproteins. Circulation 1990; 81: 1498-506.
13. Etherton KPM, Fosmire MA, Mela DJ, Etherton TD. Studies on the etiology of increased tissue cholesterol concentration in cholesterol fed hypothyroid rats. J Nutr 1982; 112: 2324-32.
14. Murase T, Yamada N, Uchimura H. Accumulation of intermediate density lipoprotein in the plasma of cholesterol fed hypothyroid rats. Metabolism 1983; 32: 146-50.
15. Rogers KA, Karnovsky MJ. A rapid method for the detection of early stages of atherosclerotic lesion formation. Am J Pathol 1988; 133: 541-55.
16. Still WJS, O'Neal RM. Electron microscopic study of experimental atherosclerosis in the rat. Am J Pathol 1962: 40: 21-35.
17. Jokinen MP, Clarkson TB, Prichard RW. Animals models in atherosclerosis research. Exp Mol Pathol 1985; 42: 1-28.
18. Bajwa GS, Morrison LM, Ershoff BH. Induction of aortic and coronary athero-arteriosclerosis in rats fed a hypervitaminosis D, cholesterol containing diet. Proc Soc Exp Biol Med 1971; 138: 975-82.
19. Altman RF. A simple method for the rapid production of atherosclerosis in rats. Experientia 1973; 29: 256.
20. Davies PF. Vascular cell interactions with special reference to the pathogenesis of atherosclerosis. Lab Inves 1986; 55: 5-24.
21. Peng SK, Taylor CB. Probably role of excesses of vitamin D in genesis of arteriosclerosis. Paroi Arterielle 1980; 6: 63-7.
22. Kunitomo M, Kinoshita K, Bando Y. Experimental atherosclerosis in rats fed a vitamin D, cholesterol-rich diet. J Pharmacobiodyn 1981; 4: 718-23.
23. Hess R, Loustalot P. Short term aortic lipoidosis in the rat. J Atheroscler Res 1963; 3: 280-7.
24. Mironov P, Athanasov K, Nikolov N, Solov, K. Experimental atherosclerosis in the rat. Folia Med 1962; 4: 250-6.

25. Shankar R, Sallis JD, Stanton H, Thomson R. Influence of probucol on early experimental atherogenesis in hypercholesterolemic rats. Atherosclerosis 1989; 78: 91-7.
26. Banzet P, Bricout B, Lorenceau B, Gross P, Brunais B, Arrouvel C. Etude expérimentale d'une prothèse vasculaire hétérologue sur des vaisseaux de petit calibre. Chirurgie 1982; 108: 487-91.
27. Akoum A, Morois Y, King M, Guidoin R, Verreault J, Von Maltzhan W, et al. A vascular graft with impervious wall. An exploratory evaluation in dogs. Research in Surgery 1992; 4: 1-11.
28. Perloff LJ, Christie BA, Ketharanathan V, Field PL, Milne PY, MacLeish DG, et al. A new replacement for small vessels. Surgery 1981; 89: 31-41.
29. Guidoin R, Benichoux R, Blais P, Marois M, King M, Gosselin C. New alternatives in the preparation of chemically fixed human umbilical veins as arterial substitutes. Biomater Med Devices Artif Organs 1982; 10: 173-85.
30. Bank HL, Schmenhl MK, Warner R, Pratt MF, Albbernaz MS, Metcalf JS, et al. Transplantation of cryopreserved canine venous allografts. J Surg Res. 1991; 50: 57-64.
31. Kim M, Loubet R, Pestre Alexandre M, Lakar M. The freeze preserved venous allografts. 96 implantations results. Chirurgie 1981; 107: 263-74.
32. L'Italien GJ, Maloney RD, Abbott -WM. The preservation of the mechanical properties of venous allografts by freezing. J Surg Res 1979; 27: 239-43.
33. Cazenave JP, Klein-Soyer C, Beretz A. The vascular endothelium. An important site of blood-tissue exchanges. Inter Angio 1984; 3: 27-32.
34. Lechèche G, Castier Y, Petit MD, Bertrand P, Kitzis M, Mussor S, et al. Long-term results of cryopreserved arterial allografts reconstruction in infected prosthetic grafts and mycotic aneurysms of the abdominal aorta. J Vasc Surg 2001; 4: 616-22.
35. Teebken OE, Haverich A. Tissue engineering of small diameter vascular grafts. Eur J Vasc Endovasc Surg 2002; 23: 475-85.
36. Cooper DK. Xenoantigens and xenoantibodies. Xenotransplantation 1998; 5: 6-17.
37. Miralles M, Ysa A. Respuesta biológica frente a aloinjertos y xenoinjertos vasculares. Arch Cir Vasc 2002; 1: 16-22.

ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DEL COMPORTAMIENTO DE XENOINJERTOS VASCULARES SOMETIDOS A DIETAS HIPERLIPÍDICAS

Resumen. *Se ha procedido al análisis ultraestructural de la pared de la aorta nativa y de xenoinjertos criopreservados implantados en ratas de la raza Wistar-Lewis sometidas a dietas aterogénicas. Para ello se han establecido distintos grupos de estudio, iguales en número y con una distribución al azar de los individuos. Se trata de determinar si las lesiones ateromatosas inducidas por la alimentación hiperlipídica son idénticas en ambos tipos de vasos arteriales o presentan diferencias significativas. Una vez finalizado el período de investigación, los resultados obtenidos sugieren que los injertos heterólogos son más sensibles a la acción patógena de las dietas ricas en grasas. La aplicación de la microscopía electrónica, tanto de transmisión como de barrido, ha permitido valorar de forma idónea el comportamiento de los implantes. [ANGIOLOGÍA 2003; 55: 7-20]*

Palabras clave. *Aterogénesis. Bioprótesis. Dietas hiperlipídicas. Injertos heterólogos. Microscopía electrónica. Xenoinjertos.*

ESTUDO ULTRA-ESTRUTURAL DO COMPORTAMENTO DOS XENOENXERTOS VASCULARES SUBMETIDOS A DIETAS HIPERLIPÍDICAS

Resumo. *Procede-se à análise ultra-estrutural da parede da aorta nativa e de xenoenxertos criopreservados, implantados em ratos da raça Wistar-Lewis submetidas a dietas aterogénicas. Para o efeito estabeleceram-se grupos de estudo distintos, iguais em número e com uma distribuição aleatória dos indivíduos. Trata-se de determinar se as lesões ateromatosas induzidas pela alimentação hiperlipídica são idênticas em ambos os tipos de vasos arteriais ou se apresentam diferenças significativas. Uma vez concluído o período de investigação, os resultados obtidos sugerem que os enxertos heterólogos são mais sensíveis à acção patogénica das dietas ricas em gorduras. A aplicação da microscopia electrónica, tanto de transmissão como de varredura, permitiu avaliar adequadamente o comportamento dos implantes. [ANGIOLOGÍA 2003; 55: 7-20]*

Palavras chave. *Aterogénese. Bioprótese. Dietas hiperlipídicas, Enxertos heterólogos. Microscopia electrónica. Xenoenxertos.*