

## ORIGINALES

# Análisis del comportamiento de los aloinjertos arteriales crioconservados y sembrados con células endoteliales autólogas<sup>(1)</sup>

## Analysis of the performance of arterial criopreserved homografts seeded with autologous endothelial cells

Andrés Zorita Calvo\* - M.<sup>a</sup> Victoria Diago Santamaría\*\* - Eladio González González\*\* -  
Carlos Vaquero Puerta\*\*

Servicio de Cirugía Vascular\*  
Departamento de Cirugía Experimental\*\*  
de la Facultad de Medicina de  
Valladolid (España)

### RESUMEN

**Introducción:** El empleo en la clínica de los aloinjertos vasculares se remonta a la década de 1950, pero la aparición de grandes complicaciones y el desarrollo de las prótesis sintéticas contribuyeron a que se desistiera en su utilización. Las prótesis sintéticas están lejos de ser el sustituto ideal, y el sembrado endotelial en las mismas no es efectivo. La necesidad de nuevos sustitutos vasculares es muy evidente. Diseñamos nuestro estudio en base a los mejores métodos actuales de extracción y preservación de los vasos, teniendo en cuenta que las superficies vasculares nativas son el sustrato ideal para el sembrado endotelial.

**Objetivo:** Estudio del efecto conjunto de la criopreservación y el recambio del endotelio donante por endotelio del receptor en la disminución del rechazo en el trasplante de arterias.

**Material y Métodos:** A 24 perros beagle adultos repartidos en cuatro grupos, que fueron anestesiados con tiopental sódico (30mg/Kg/IV), intubados y mecánicamente ventilados, se les transplantaron en la aorta infrarrenal segmentos de 1,5 cms de las aortas de otros perros, crioconservados a temperaturas de +4°C(A), -30°C(B), -80°C(C) y -196°C(D) durante 30 días, desnudados de su endotelio y sembrados con

endotelio del receptor, procedente de la vena safena interna. A 6 perros de un 5º grupo control(Co) se les transplantó, con la misma técnica, segmentos de aorta frescos. A 6 perros de un 6º grupo testigo(T) se les realizó una operación simulada. Se evaluó el estudio clínico, angiográfico, de trombogenicidad y los animales fueron sacrificados según el protocolo, a los 3 y los 6 meses para la valoración mediante los estudios macroscópicos, y de microscopía óptica y microscopía electrónica, así como el test de trombogenicidad.

**Resultados:** La mortalidad se elevó al 11 %. La permeabilidad fue del 100 % para los grupos D y T, de un 66,6 % para los grupos B y C, y de un 33,3 % para el grupo A, tanto a 3 como a 6 meses. En contraposición, el grupo Co tuvo una permeabilidad del 33,3 % y 0 % a 3 y 6 meses. No se observaron reacciones de rechazo en los grupos B, C y D.

**Conclusiones:** Los aloinjertos arteriales nativos criopreservados y endotelizables pudieran llegar a ser una alternativa a las prótesis sintéticas tradicionales. El proceso de sembrado con alta densidad de células endoteliales autólogas inhibe la trombosis precoz del injerto.

**Palabras clave:** Aorta; homoinjerto; criopreservación; sembrado endotelial.

### SUMMARY

**Introduction:** The use of vascular homografts in human medicine started in the 50s, but it ended soon because of arterial homografting complications, and synthetic graft development. Furthermore, the synthetic prosthesis are far from the ideal vascular substitute, and there is no effective

<sup>(1)</sup> Premio Gore-Sociedad Española de Angiología y Cirugía Vascular. Granada 1995

Trabajo realizado en el Laboratorio de Cirugía experimental de la Universidad de Valladolid.

*veness in its endothelial seeding. The necessity of new vascular substitute is for this reason evident.*

**Objective:** *We will try to know the effects of both arterial criopreservation and donor endothelium substitution by recipient endothelium to ameliorate the rejection reaction in arterial transplantation.*

**Methods, Design, Setting:** *Four groups of beagle dogs (A,B,C,D) with 6 animals 6 months old and 12 kgs in each group underwent 1,5 cms homograft aortic artery transplantation, criopreserved at +4°C (A), -30°C (B), -80°C (C) and -196°C (D) during 30 days and seeded with recipient greatest saphenous vein endothelium transplantation. In a fifth group (Co) with 6 animals fresh aortic transplantation was carried out. In a sixth group (T) with 6 animals sham operation was carried out.*

**Measurements:** *We evaluated mortality and permeability rates, doppler study, angiography, thrombogenicity. All the animals were sacrificed at 3 and 6 months, and the criopreserved aortic and fresh homografts, evaluated for the histological aspects with light scanning and electron microscopy.*

**Results:** *The overall mortality rate was 11 %, the permeability was 100 % in groups D and T, 66,6 % in groups B and C, 33,3 % in group A, at 3 ad 6 months. However the permeability in group Co was 33,3 %, and 0 % at 3 and 6 months respectively. There were no rejection reaction in groups B, C and D.*

**Conclusions:** *The criopreserved arterial homografts seeded with recipient endothelium would be an alternative to syntethic prostheses. The autologous endothelial sodding avoids early graft thrombosis.*

**Key words:** Aorta; homograft; criopreservation; endothelial seeding.

## Introducción

Muy próximos al final del siglo XX, ha aumentado el nivel y expectativa de vida de la población en los países desarrollados, y esta circunstancia, entre otras, ha movido a conseguir enormes progresos en el ámbito de las Ciencias en general y de la Medicina y de la Cirugía Vasculat en particular, y entre ellos el trasplante de órganos aparece como una actividad por excelencia.

El gran avance en el conocimiento de las reacciones inmunitarias nos permite transplantar diferentes tipos de tejidos y de órganos. Este principio, que ha

sido puesto en práctica con éxito en las sustituciones sanguíneas, en los trasplantes de riñón, corazón, hígado, pulmón, etc., sorprendentemente no ha sido aplicado de forma sistemática a la sustitución de las arterias.

Las consideraciones por lo cual esto ocurre tienen su origen en hechos del pasado, que se identifican, en algunos casos, con acontecimientos importantes del desarrollo histórico de la Cirugía Vasculat, pero es obvio que las posibilidades actuales permiten renacer la esperanza de la utilización de las arterias de un donante de la misma especie para sustituir las arterias enfermas del receptor.

La Cirugía Vasculat y los trasplantes de órganos han tenido un origen común, en los primeros años de este siglo. Carrel (1) describió los principios técnicos actuales de las anastomosis vasculares a través de los trasplantes de órganos, y Goyanes (2) utiliza en 1906 un autoinjerto vascular venoso para tratar un aneurisma de la arteria poplitea. Pero estos primeros pasos no dieron lugar a una aplicación clínica inmediata, debido a la falta de desarrollo en otros campos de la Medicina y de las Ciencias. En efecto, estos principios no pudieron ser utilizados hasta que no se desarrolló la angiografía, las transfusiones sanguíneas, los anticoagulantes, los antibióticos, la anestesia, etc.

No es hasta 1947, cuando Gross (3) y posteriormente en 1951 Oudot (4) y Dubost (5) comienzan la utilización en la clínica de los homoinjertos arteriales procedentes del cadáver en el tratamiento de las enfermedades vasculares de la especie humana, seguidos inmediatamente por DeBakey y Cooley (6). A pesar de este gran avance técnico, en los años siguientes aparecieron publicaciones que describían importantes alteraciones degenerativas en los injertos trasplantados -oclusiones precoces, dilataciones aneurismáticas, roturas, calcificaciones extensas, etc-, que hicieron abandonar este tipo de tratamiento.

Ante la necesidad de usar un sustituto arterial se comienza entonces paralelamente, con la búsqueda de una prótesis arterial sintética; y con Voorthes, Jaretski y Blakemore (7) se inicia la nueva era de las prótesis arteriales que, coincidiendo con el desarrollo industrial, han hecho de éstas que su utilización sea fácil y muy difundida. Es por tanto, en nuestra opinión, el momento en que la Cirugía Vasculat se separa de la cirugía de los trasplantes.

Después de cuatro décadas de experiencia acumulada con las prótesis vasculares sintéticas, deben reconocerse tanto sus múltiples ventajas, como son, por citar algunas, la tolerancia biológica, la disponibilidad, la versatilidad, la resistencia y la estabilidad; como obviamente, sus grandes inconvenientes al ser inertes desde el punto de vista biológico –falta de elasticidad, formación de falsos aneurismas anastomóticos, degradación del tejido protésico, facilidad para las infecciones y cuando éstas se presentan con implicaciones vitales, etc–, la falta de endotelización, y la hiperplasia intimal en los lugares de las anastomosis –que dan lugar, a un alto índice de oclusiones en los vasos de mediano y pequeño calibre–. Se puede afirmar, por tanto, que las prótesis arteriales sintéticas se encuentran muy lejos, sin duda, de poder asumir el título de «sustituto ideal» de las arterias del hombre.

Por otro lado, un análisis del comportamiento biológico de las prótesis sintéticas actuales determina la conclusión alarmante de la concepción del papel anatómo-fisiológico de las arterias, en aquellos años, como sencillos conductos pasivos destinados a la circulación de la sangre.

El concepto con el que nosotros nos sentimos identificados es substancialmente distinto, ya que como consideran algunos investigadores (8) las arterias son órganos acreedores de una intensa actividad funcional y participan activamente en el mantenimiento del equilibrio homeostático de la circulación sanguínea, de la coagulación y de la fisiología de la propia pared arterial, siendo el endotelio un elemento esencial.

Es muy evidente, por todo lo expuesto en lo que a las prótesis sintéticas respecta, que con los materiales plásticos los resultados son bastante deficientes cuando se usan en sectores de pequeño diámetro.

Es obvio, por tanto, que el material biológico del propio paciente más usado –la vena safena– se reserva actualmente para ser utilizado en sectores como el fémoro-poplíteo, distal, coronario, pero tiene el inconveniente de su pequeño calibre y, en algunos pacientes, no puede ser obtenido al estar alterado por algún tipo de enfermedad, como la enfermedad varicosa, tromboembólica, o haber sido extraído previamente.

Los aloinjertos vasculares han sido una idea antigua que tuvo incluso vigencia clínica hace 4 décadas,

pero que fracasó posiblemente por los inadecuados métodos de extracción y de preservación.

En el momento actual, con el desarrollo de las técnicas y métodos criogénicos, mejores métodos para evitar el rechazo inmunológico y, sobre todo, la mayor disponibilidad de injertos obtenidos de cadáveres «en caliente», a la vez que se obtienen los órganos para trasplante, debido a los avances legislativos y a los cambios de mentalidad social, es lo que hace retomar la idea de que el mejor sustituto de un órgano o tejido es otro de idénticas características, y dando lugar por tanto, a lo que podemos denominar los «*bancos de vasos*» al origen de una nueva era en la terapia vascular.

En nuestro estudio se intenta aportar soluciones a dos problemas que pensamos son claves en el trasplante de arterias, como son la *trombogenicidad* y la *antigenicidad*, mediante el tratamiento con el frío y el recambio del endotelio donante por el receptor, que facilitaría la sustitución natural del tejido transplantado por tejido del receptor.

## Material y Métodos

### Animal de experimentación

Para el presente trabajo experimental se ha considerado idóneo el perro de raza beagle de ambos sexos, de 6 meses de edad y de un peso aproximado, al inicio de la experimentación, de entre 12 y 15 Kg. No existía relación de parentesco entre los animales donantes y receptores.

### Diseño experimental

#### A) Los grupos de animales

El estudio se basó en la valoración de 36 animales distribuidos en seis grupos –cuatro experimentales, uno control y uno testigo– de 6 animales cada uno.

Los 4 grupos experimentales los constituyeron los animales a los que se les implantó injertos arteriales homólogos, obtenidos 30 días antes de otros animales de la misma especie y raza, y que habían sido criopreservados a diferentes temperaturas hasta el momento de su implantación:

GRUPO A: Implantación de injertos arteriales conservados a +4 grados centígrados (+4°C).

GRUPO B: Implantación de injertos arteriales conservados a -30 grados centígrados (-30°C).



GRUPO C: Implantación de injertos arteriales conservados a -80 grados centígrados (-80°C).

GRUPO D: Implantación de injertos arteriales conservados a -196 grados centígrados en nitrógeno líquido (-196°C).

A estos injertos aórticos, previamente a su implantación en el animal receptor, se les *extrajo el endotelio nativo y se les realizó una siembra de células endoteliales* procedentes de la vena safena interna del animal receptor.

El grupo CONTROL lo constituyeron los animales a los que se les implantó una arteria homóloga fresca, sin ninguna manipulación del endotelio.

El grupo TESTIGO lo constituyeron animales a los que se les realizó una reimplantación autóloga con el segmento de aorta una vez seccionado y movilizado.

Todos los grupos anteriormente mencionados, tanto los experimentales como el control y el testigo, se subdividieron a su vez en dos subgrupos cada uno (n=3), en relación a las fases de evaluación histológica planeadas de 3 y 6 meses (denominados con subíndices 1 y 2, respectivamente).

El momento del sacrificio y los períodos de observación histológica fueron fijados partiendo de la observación confirmada de que los procesos de reparación de un daño vascular arterial, en esta especie, culminan en general, a los 3 meses de la manipulación quirúrgica, aproximadamente, y los cambios histológicos permanecen estables a los 6 meses.

#### B) La extracción. Protocolo de obtención del material biológico homólogo

Doce horas antes de la intervención quirúrgica, los tres animales que se seleccionaron para las extracciones de las aortas –cuyos segmentos sirvieron posteriormente como prótesis biológicas– fueron sometidos a dieta absoluta. Para la inducción anestésica se utilizó el Pentobarbital sódico (Nembutal) por vía endovenosa (abocath 22G en vena safena externa de pata delantera izquierda), a una dosis de 30mg/Kg de peso corporal; procediendo posteriormente –ayudados de un laringoscopio–, a su intubación orotraqueal con un tubo de Shiley (nº 6-8) que se conectó a un respirador volumétrico SF4 –para la respiración con ventilación asistida a una frecuencia de 15 respiraciones por minuto y a un volumen aproximado de 10 ml de aire/Kg de peso corporal, administrando una mezcla de aire ambiente y oxígeno al 40 %. Los animales fue-

ron monitorizados. En el mantenimiento anestésico de la intervención quirúrgica, se emplearon los gases de fluotane (Fig. 1).

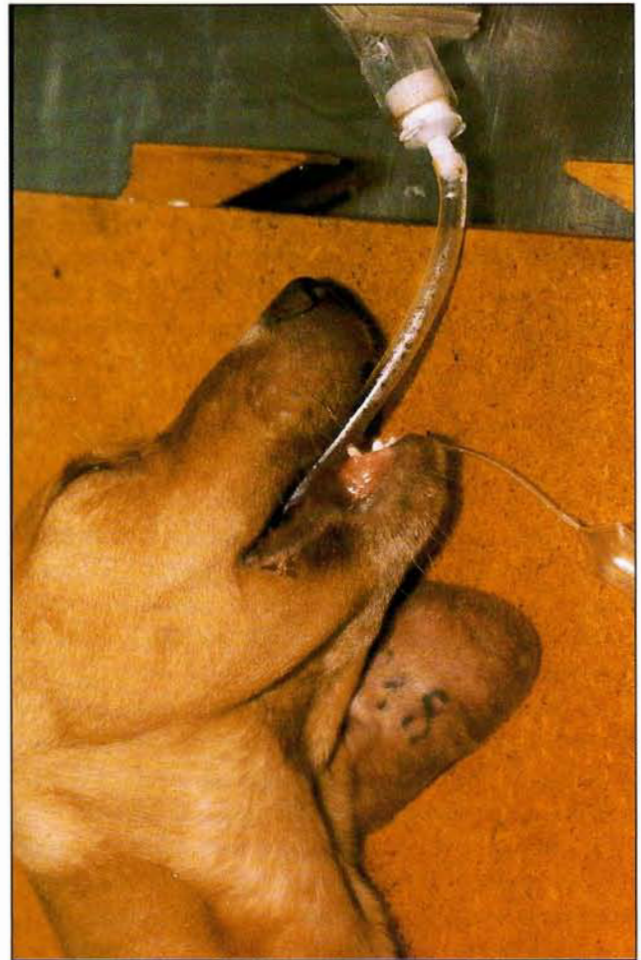


Fig. 1. Perro anestesiado, intubado y conectado a respirador volumétrico.

Se realizó una toracofrenolaparotomía media. Se extrajo la aorta toracoabdominal desde la trifurcación ilíaca hasta el tronco braquiocefálico, procediéndose al lavado en solución de Collins fría a +4°C y a la sección en segmentos de aproximadamente 1,5 centímetros de longitud (Fig.2), para a continuación introducirlos en cánister individuales sellados, sin solución de criopreservación ni antibióticos.

#### C) La Criopreservación

Los injertos fueron ultracongelados inmediatamente en pocos segundos, introduciéndolos en nitrógeno líquido. Fueron extraídos del nitrógeno líquido los cánister que contenían los segmentos aórticos que iban





Fig. 2. Segmentos de aorta procedentes del animal donante, dispuestos a ser criopreservados.

a ser conservados a temperaturas de  $-30^{\circ}\text{C}$  y  $-80^{\circ}\text{C}$ , y éstos fueron introducidos en congeladores programados a esas temperaturas. Los segmentos aórticos que debían conservarse a  $-196^{\circ}\text{C}$ , se dejaron en el nitrógeno líquido.

Los injertos que se conservaron a  $+4^{\circ}\text{C}$  no fueron ultracongelados y fueron guardados con suero fisiológico en un refrigerador convencional.

Así se conservaron los injertos de los grupos de animales experimentales durante los 30 días, hasta breves momentos antes de su implantación en el animal receptor.

#### D) La descongelación de los injertos

Los injertos conservados a  $-30^{\circ}\text{C}$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$  y  $-196^{\circ}\text{C}$  se descongelaron en baño de agua a  $37^{\circ}\text{C}$  con continua agitación, con la suficiente antelación antes de su implantación en el animal receptor.

#### E) La obtención de las células endoteliales

La recolección de las células endoteliales de los animales receptores, que se sembraron en los injertos biológicos, se obtuvieron de las venas safenas internas a nivel inguinal de los perros, en el mismo proceso quirúrgico de la implantación de la bioprótesis y momentos antes de la apertura del abdomen.

Los animales fueron anestesiados en la forma antes descrita, siendo anticoagulados por vía sistémica (100u/kg de heparina). A través de una incisión longi-

tudinal a nivel inguinal derecho, se disecaron –en los 24 animales que componían los grupos experimentales–, las venas safenas internas en un trayecto de 10 centímetros, que se extrajeron con la mínima manipulación, preservando la adventicia. La vena así obtenida se evertió sobre un catéter o varilla de acero de 16 G<sup>2</sup>, para excluir la superficie adventicial. La superficie endotelial de las venas se bañó en 10 ml de solución de colagenasa estéril al 0,2 % (50 mgr de colagenasa estéril de 600 U/mg, en 20 cc de solución buffer salino-fosfatada con calcio y magnesio) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y se incubó durante 20 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Durante este tiempo se procedió al raspado del endotelio venoso mediante una hoja de bisturí y al suave agitado de la solución de colagenasa con la vena. El resultante –la solución con las células endoteliales–, se recogió en un tubo cónico (50ml) y se centrifugó a 200 giros durante 10 minutos. A continuación el sobrenadante fue eliminado y el pellet celular resuspendido en suero salino fosfatado.

#### F) La eliminación del endotelio propio en los segmentos arteriales criopreservados

El proceso de eliminación del endotelio de los injertos criopreservados, también llamado «denudación endotelial», fue realizado mediante una técnica mecánica y química, consistente en el raspado del endotelio con una espátula de goma, después de bañar el injerto en solución de colagenasa. Este proceso se realizó una vez descongelado el injerto criopreservado y momentos antes de iniciarse la laparotomía para su colocación en la aorta del animal receptor.

#### G) El sembrado de las células endoteliales

Hemos utilizado una técnica de sembrado con alta densidad de células endoteliales para recubrir toda la superficie del injerto (sodding), dado la gran área endotelial de la vena extraída (cilindro de 4 mm de diámetro y 100 mm de altura=12,56 cm<sup>2</sup>), en relación a la superficie del injerto a sembrar (cilindro de 10 mm de diámetro y 15 mm de altura=4,71 cm<sup>2</sup>), permitiendo que las células se adhieran y dispersen, sin necesidad de que estas células endoteliales sembradas deban de proliferar como sucede cuando en el sembrado de prótesis sintéticas de gran longitud se usa un corto segmento de vena.

El pellet de células endoteliales se mezcló con 5 ml



de sangre total obtenida del propio animal donde se sumergieron los injertos correspondientes criopreservados –previamente deendotelizados–. Se dejó coagular esta mezcla de sangre y células endoteliales que bañaba la bioprótesis con el objetivo de incrementar la adherencia celular al injerto al beneficiarnos de los altos niveles de fibronectina del coágulo. Se incubaron los injertos de esta forma con las células endoteliales durante 20 minutos a temperatura de 37°C. Se realizó, posteriormente, un estudio histológico de una muestra de cada grupo de los crioinjertos sembrados para confirmar la eficacia del sembrado endotelial.

#### *H) Protocolo de implantación del bioinjerto arterial en el animal de experimentación*

A través de una laparotomía media xifo-pubiana: Se procedió a la disección la aorta abdominal infrarrenal (Fig.3), colocándose un clamp aproximador tipo Biemer en la aorta. Se seccionó la aorta extrayéndose un segmento de 1,5 cm. y se colocó en termino-terminal un injerto criopreservado o fresco de 1,5 cm de longitud, según correspondiera a la pauta del grupo experimental, control o testigo. La sutura de los vasos fue continua con material no absorbible (polipropileno de 6/0). Tras efectuar las anastomosis correspondientes, se retiró el clamp y se comprobó la permeabilidad del injerto, y se cerró la laparotomía en dos planos con sutura continua (catgut atraumático 3/0 y seda 3/0).

Una vez finalizada la intervención quirúrgica, se comprobó la permeabilidad del injerto mediante la palpación de los pulsos femorales bilaterales a nivel inguinal y la realización de una velocimetría ultrasónica Doppler. Seguidamente, se desintubó al animal cuando presentaba respiración espontánea y se le retiró el suero.

En el postoperatorio inmediato los animales fueron ubicados en cubículos especiales, donde se les aportó calor hasta su total recuperación anestésica, y durante 12 horas estuvieron sometidos a dieta absoluta, al cabo de las cuales se les administró alimentación sólida (pienso para cachorros puppy Chow –Purina–) y líquida «ad libitum». Durante una semana se les administró Tobramicina como profilaxis postoperatoria, a dosis de 3 mg/kg de peso corporal en una única dosis diaria, por vía intramuscular en una pata posterior.



Fig. 3. Disección de aorta abdominal en el animal receptor.

#### *I) La evaluación y el sacrificio de los animales*

Cuando se cumplieron las fechas indicadas (3 y 6 meses), fue necesario proceder a reintervenir a los animales correspondientes y a su sacrificio, para completar los estudios invasivos e histológicos. Los animales fueron nuevamente anestesiados y, tras llevar a cabo las diferentes evaluaciones que pasaremos posteriormente a describir, hubimos de proceder al sacrificio de los mismos. En la evaluación de los resultados se han considerado las siguientes técnicas y métodos de estudio:

**Tasa de mortalidad**, excluyéndose totalmente del estudio a todos aquellos perros en que se consideró que los procesos que causaron su muerte no tenían relación con el experimento, siendo restituidos por otros. A todos los animales fallecidos se les practicó sistemáticamente una necropsia de las principales cavidades orgánicas, en estado fresco.



**Tasa de permeabilidad**, mediante criterios macroscópicos en el campo quirúrgico, sondaje aórtico en casos concretos, medición de presiones arteriales por encima y por debajo del injerto, estudios de velocimetría ultrasónica Doppler y estudios angiográficos.

**Valoración clínica**, que se centró en dos aspectos fundamentalmente, el estado general de los animales y en la valoración de las extremidades posteriores (valoración funcional, valoración del desarrollo morfológico de las patas y de sus extremos, su crecimiento, su tono muscular y masa de los grupos musculares, pulsos y de la claudicación de la marcha).

**Velocimetría ultrasónica Doppler**, utilizando un aparato bidireccional Parks modelo 1050 y sonda de 10 MHz con microceptor incorporado. Se ha registrado la señal Doppler en papel milimetrado a dos velocidades, 5 mm por seg. y 25 mm por seg. Se practicó un primer estudio Doppler femoral previo a la cirugía para ser usado como control, después de la intervención quirúrgica y semanalmente en el postoperatorio. Previo al sacrificio, también se practicó un tercer estudio ultrasonográfico Doppler a nivel aórtico, proximal y distal al lugar del injerto implantado.

**Estudio angiográfico**. Se practicó en todos los animales previo al sacrificio. Se efectuó manteniendo el animal laparotomizado en decúbito supino. Se utilizó un aparato Radiología 50, se dispararon dos placas de 20 x 15 centímetros con los siguientes parámetros: 45 kw, 20 amperios y 0,2 seg. de tiempo de exposición. Se inyectaron por cada placa disparada 20 ml de contraste yodado Radialar 280. Los clichés se revelaron con una reveladora automática, según procedimiento standard.

**Estudio macroscópico**, valorándose la reacción del segmento estudiado con otras vísceras vecinas, el grado de reacción fibrosa y de integración del injerto, las alteraciones histológicas macroscópicas de la zona, como por ejemplo la presencia de material mucoide, líquido, edema, infiltración inflamatoria o material purulento, que nos pudiera hacer sospechar una reacción de rechazo o infección; la transmisión de la pulsación, la distensibilidad y la flexibilidad del injerto. Una vez concluida esta valoración «in situ», se procedió a la extracción del injerto, clampano la aorta, proximal y distalmente al injerto, y se practicó la apertura longitudinal del injerto una vez extraído con el objeto de valorar la superficie endoluminal y observar la permeabilidad u obstrucción del mismo. A conti-

nuación, se procedió a tallar los segmentos que iban a destinarse a los estudios morfológicos de microscopía óptica, microscopía electrónica de transmisión y microscopía electrónica de barrido, incluyendo para todos ellos porciones de la parte media del injerto.

La **Microscopía óptica**, la **Microscopía electrónica de transmisión**, y la **Microscopía electrónica de barrido**, se realizaron según las directrices de la Facultad de Medicina de Valladolid.

**Test de trombogenicidad**, se utilizó el protocolo de Yates, consistente en la medición comparativa del tiempo que tardó en coagularse una gota de sangre del animal receptor sobre la superficie del injerto y la superficie aórtica nativa.

**Análisis estadístico**, los datos obtenidos de la permeabilidad en los grupos a estudio durante los períodos experimentales definidos (3 y 6 meses) fueron introducidos como matriz de datos en el programa estadístico comercial SPSS/PC+ para windows. Calculamos para el parámetro de los diferentes grupos y subgrupos la media y la desviación estándar, lo que nos permitió analizar diferentes relaciones entre las mismas. Seguidamente, emparejamos las medias obtenidas en los diferentes grupos con igual tiempo de evolución comparándolas con la prueba estadística de la «t» de Student que nos permite hallar si las diferencias encontradas son estadísticamente significativas.

## Resultados

Los resultados obtenidos en relación a los distintos parámetros han sido los siguientes:

### 1. Tasa de Mortalidad

Durante el experimento se intervinieron 42 animales, 36 correspondían a los cuatro grupos experimentales (+4°C, -30°C, -80°C, -196°C), al grupo control y al grupo testigo, y 3 que fueron excluidos del estudio y repuestos ya que sus muertes debido a la Parvovirus no tenían relación directa con el experimento. Por otro lado, 3 animales sanos fueron sacrificados para la obtención del material aórtico homólogo.

Se produjeron los siguientes fallecimientos: Cuatro animales fueron sacrificados al sufrir trombosis aguda del injerto y de la aorta abdominal, en diferentes momentos del postoperatorio; dos de estos ani-

males pertenecían al grupo control (trasplante de injertos frescos), cada uno a un subgrupo (3 meses y 6 meses), las trombosis se presentaron a las 24 horas y a los 21 días, otro animal pertenecía al grupo de +4°C subgrupo programado para sacrificio a los tres meses, la trombosis se presentó a los 6 días. El animal restante, pertenecía al grupo de -30°C, subgrupo programado para sacrificio a los 6 meses y la trombosis se produjo a los 43 días. Estos animales debutaron de forma brusca con parálisis de las patas traseras y la necropsia corroboró la trombosis de la aorta infrarrenal.

Por tanto, la tasa de mortalidad se elevó al 11,1 %.

## 2. Tasa de permeabilidad

Referida a los períodos de 3 meses y 6 meses, -períodos marcados para el sacrificio de los animales de los diferentes subgrupos-. Prácticamente la mayor parte de las oclusiones se han producido en el período comprendido dentro de las primeras 14 semanas.

Los resultados obtenidos en este aspecto de la permeabilidad del injerto se encuentran representados en la Tabla I y en la Fig. 4.

Permeabilidad			
% de permeabilidad en los distintos grupos en relación al tiempo de experimentación			
Grupos	3 meses	6 meses	Global
+4°C (A)	33,3	33,3	33,3
-30°C (B)	66,6	66,6	66,6
-80°C (C)	66,6	66,6	66,6
-196°C (D)	100	100	100
Control (Co)	33,3	0	16,6
Testigo (T)	100	100	100

Permeabilidad en tiempo global  $\chi^2=28,09$ .  $p \leq 0,05$

Tabla I

Los grupos con menor tasa de permeabilidad han sido el Control (33,3 %, y 0 % a 3 y 6 meses) y el grupo A (+4°C) (33,3 % a 3 y 6 meses). En el primero (grupo Control) observamos reacciones inmunitarias (un importante infiltrado linfoplasmocitario a nivel de las capas del injerto) en los implantes de los dos animales

que hubieron de sacrificarse precozmente y, en el segundo (A), una pérdida de las células endoteliales sembradas, dejando una superficie denudada y trombógena.

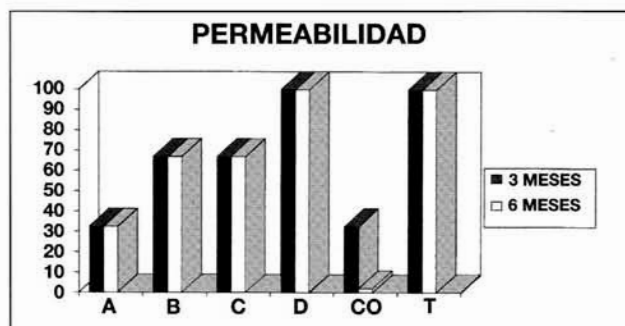


Fig. 4. Permeabilidad

La permeabilidad obtenida en el grupo de injertos conservados a -196°C (D) ha sido excelente, pues no se ha registrado ninguna oclusión, al igual que en el grupo Testigo.

Los datos registrados por los grupos conservados a -30°C y -80°C (B, C) ha sido óptima, al alcanzar cifras del 66,6 % en todos los subgrupos.

Todos los grupos de animales que recibieron trasplantes de vasos ultracongelados (B, C, D) y la conservación a temperaturas por debajo de -29°C han mostrado una permeabilidad global del 77,7 % a 3 y a 6 meses, claramente superior a la registrada por el grupo A (+4°C), sin ultracongelación del 33,3 % (Fig.5).

La permeabilidad de todos animales que recibieron los implantes crioconservados ha sido superior a

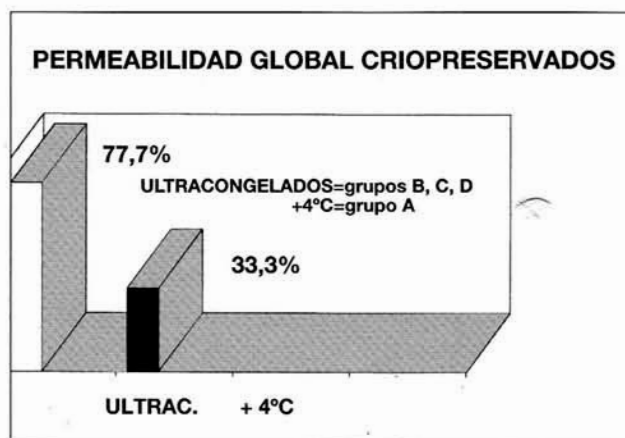


Fig. 5. Permeabilidad global criopreservados



aquellos que recibieron los trasplantes de aloinjertos frescos ( grupo Control ) (Fig.6).

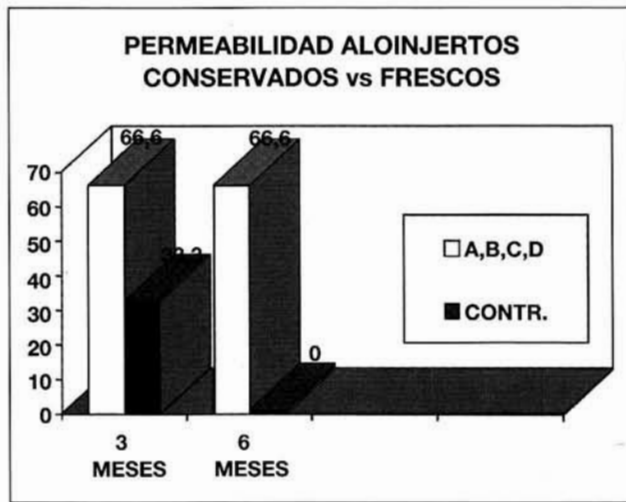


Fig. 6. Permeabilidad aloinjertos conservados vs frescos

### 3. Valoración clínica

No hemos detectado durante todo el estudio alteraciones clínicas que diferenciasen a los diferentes grupos de animales.

Se detectaron 13 oclusiones de los injertos aórticos, de las cuales 4 se manifestaron con una parálisis de las extremidades posteriores del animal, de instauración brusca. La distribución de estos 4 animales dentro de los grupos y subgrupos fue la siguiente: 2 animales pertenecían al grupo control (trasplante de injertos frescos), cada uno a un subgrupo (Cont.<sub>1</sub> y Cont.<sub>2</sub>), las trombosis se presentaron a las 24 horas y a los 21 días. Otro animal pertenecía al grupo A (+4°C) subgrupo A<sub>1</sub>, la trombosis se presentó a los 6 días. El último pertenecía al grupo B (-30°C) subgrupo B<sub>2</sub> y la trombosis se produjo a los 43 días. Se procedió a su sacrificio, naturalmente al final de la intervención quirúrgica de revisión, donde se objetivó en todos los casos una trombosis de la aorta abdominal infrarrenal y de ambos ejes ilíacos que impidió la suplencia sanguínea a través de las arterias lumbares y viscerales. Se tomaron las muestras pertinentes de los injertos para su estudio anatomopatológico.

El resto de los animales con obstrucción del injerto aórtico (9 casos) mostraron una acusada impotencia funcional los primeros días de acontecida la oclusión, con discretas parálisis de los miembros posteriores e inestabilidad a la marcha. Perdieron fuerza segmenta-

ria y mostraron una piel más húmeda. A medida que pasaban los días, los animales iban recuperando su actividad, y solamente se podía detectar una claudicación de la marcha cuando el animal era paseado a paso ligero por el cuidador. No se detectaron lesiones tróficas ni agudas ni crónicas a nivel del recubrimiento cutáneo, pelo, ni sobre los pulpejos ni las uñas. Tampoco se detectaron importantes atrofas musculares o anquilosis articulares.

Los 23 animales restantes, evolucionaron favorablemente, sin incidencias reseñables.

En la Tabla II hemos representado gráficamente la semana del postoperatorio en que se efectuó la detección clínica de la oclusión del injerto. Posteriormente, en el momento del sacrificio, se observó una correlación absoluta entre la clínica y los hallazgos arteriográficos y macroscópicos.

Como se puede observar en la Tabla II, las obstrucciones más precoces se detectaron en los subgrupos A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> pertenecientes al grupo A (+4°C) y en los subgrupos Cont.<sub>1</sub> y Cont.<sub>2</sub> pertenecientes al grupo Control, y las más tardías a los subgrupos B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>, pertenecientes al grupo B, y a los subgrupos C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> pertenecientes al grupo C.

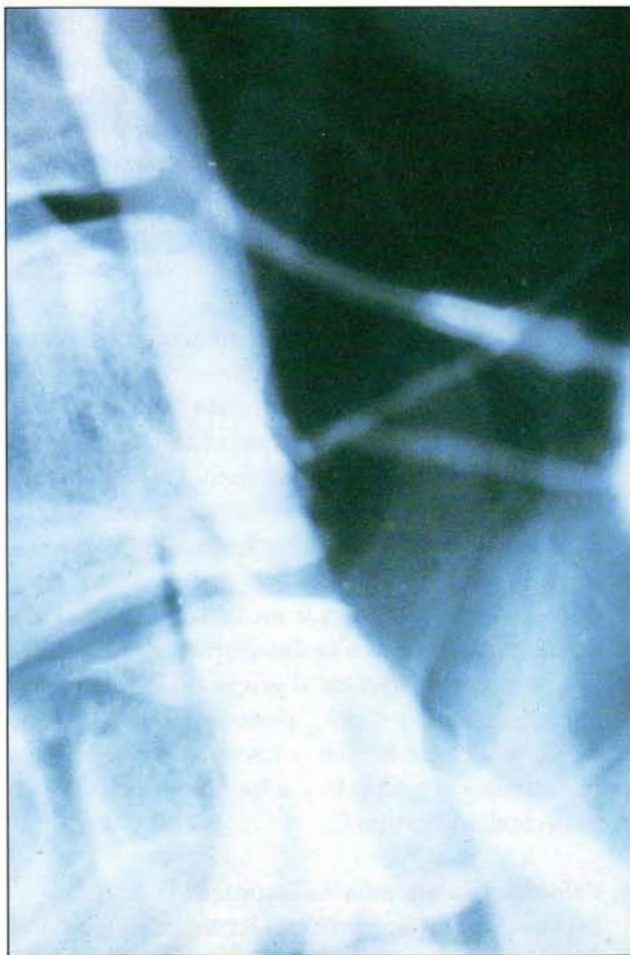
### 4. Velocimetría ultrasónica Doppler

Esta evaluación instrumental ha servido para hacer una valoración instrumental complementaria a la exploración física vascular de los animales, y no tenía otra utilidad, en el postoperatorio, que la de detectar las oclusiones arteriales y la de evaluar el grado de compensación vascular en las extremidades posteriores de los animales con injerto aórtico ocluido.

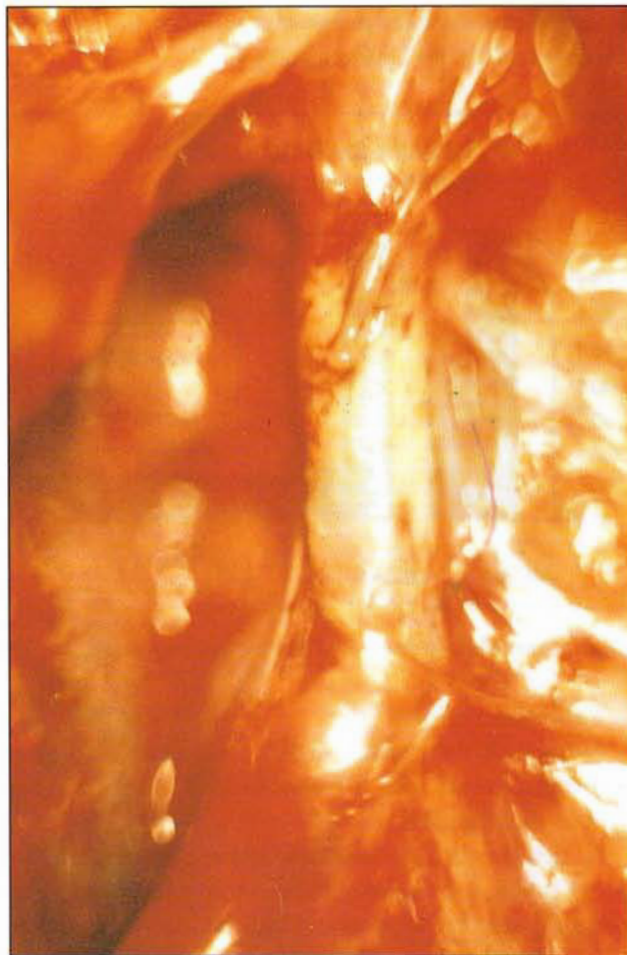
Cuando el Doppler se ha realizado en el campo quirúrgico, en la intervención de la implantación del injerto, ha servido para dar el visto bueno al funcionamiento de las anastomosis vasculares aórticas.

Cuando el estudio velocimétrico se ha realizado en el campo quirúrgico, previo al sacrificio, tenía la función de correlacionar el flujo sanguíneo detectado en las aortas ocluidas o estenosadas con la imagen arteriográfica obtenida inmediatamente después.

Esta evaluación instrumental no aportó ningún aspecto discriminativo referente al tipo de bioprótesis empleado, pero nos ofreció curvas y valores velocimétricos que nos indicaron el estado hemodinámico de la aorta infrarrenal en relación con la situación del injerto.



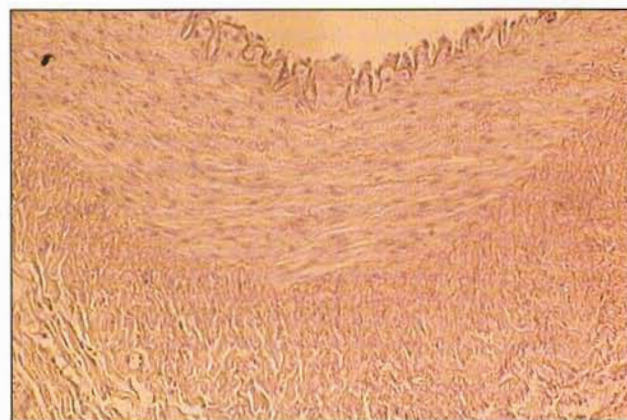
**Fig. 7.** Arteriografía previa al sacrificio del animal, mostrando el perfecto estado de un injerto ultracongelado y preservado a  $-196^{\circ}\text{C}$ . A los 6 meses de la implantación



**Fig. 8.** Fotografía operatoria mostrando un injerto ultracongelado y criopreservado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , a los 3 meses de la implantación.



**Fig. 9.** Segmento aórtico criopreservado a  $-196^{\circ}\text{C}$  extraído después de 6 meses de su implantación en el animal receptor.



**Fig. 10.** Fotomicrografía de un injerto aórtico conservado a  $-30^{\circ}\text{C}$ , a los 3 meses de su implantación. Se visualizan sus capas histológicas, existiendo infiltrado linfocitario adventicial y algunos hematíes en el endotelio. (H.E.400X)



Momento de la detección clínica (en semanas) de la oclusión del injerto en los animales de los diferentes subgrupos																									
		Semanas																							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A <sub>1</sub>	1		1																						
A <sub>2</sub>		1		1																					
B <sub>1</sub>											1														
B <sub>2</sub>							1																		
C <sub>1</sub>										1															
C <sub>2</sub>													1												
D <sub>1</sub>																									
D <sub>2</sub>																									
CO <sub>1</sub>	1			1																					
CO <sub>2</sub>			1		1				1																
T <sub>1</sub>																									
T <sub>2</sub>																									

**subgrupos**

**Total oclusiones = 13**

Subgrupos A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>: Injertos conservados a +4°C, denudados y sembrados. Sacrificio 3 y 6 meses

Subgrupos B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>: Injertos ultracongelados y conservados a -30°C, denudados y sembrados. Sacrificio 3 y 6 meses

Subgrupos C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub>: Injertos ultracongelados y conservados a -80°C, denudados y sembrados. Sacrificio 3 y 6 meses

Subgrupos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>: Injertos ultracongelados y conservados a -196°C, denudados y sembrados. Sacrificio 3 y 6 meses

Subgrupos CO<sub>1</sub> y CO<sub>2</sub>: Injertos frescos, no denudados ni sembrados. Sacrificio 3 y 6 meses

Subgrupos T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub>: Injertos de propio segmento aórtico (Sham operation)

Tabla II

## 5. Estudio angiográfico

Nos ha aportado datos fundamentalmente en relación a la permeabilidad del injerto, a la presencia de estenosis y grado de las mismas, al desarrollo de circulación colateral y al estado de las anastomosis del injerto con el vaso huésped.

En términos generales podemos decir que las imágenes observadas mostraban lo siguiente: En 23 animales un injerto permeable, de paredes lisas (Fig. 7). De estos 23 animales, en 18 angiografías se apreciaba una adecuada congruencia con el vaso nativo, aunque en algún caso se podía distinguir una pequeña impronta a nivel de la anastomosis distal. En 4 angiografías de los 23 animales permeables, pudimos ver estenosis moderadas en torno al 50-60 %. En una angiografía observamos una pequeña dilatación aneurismática. En 13 angiografías se mostraba una

oclusión completa o una estenosis crítica (mayor del 70-80 %).

Las imágenes angiográficas no han permitido diferenciar el tipo de bioprótesis implantada, sin embargo las obstrucciones con gran desarrollo colateral han correspondido a los grupos A (+4°C), B (-30°C), C (-80°C) y Control.

Las angiografías tampoco permitieron diferenciar si se trataba de un período de evaluación de 3 ó 6 meses, aunque el mayor porcentaje de estenosis moderadas se han producido en los subgrupos que se sacrificaron a los 6 meses.

La distribución de los animales en relación a los diferentes subgrupos y los hallazgos angiográficos se encuentran representados en la Tabla III.

## 6. Estudio macroscópico

Los injertos implantados a simple vista no mostraron diferencias apreciables significativas entre los diferentes grupos.

En todos los grupos la integración de las bioprótesis con los tejidos circundantes fue muy buena, habiendo sido muy difícil detectar los límites del injerto de no haber existido la referencia de la sutura vascular de polipropileno de color azulado que resaltaba en la superficie externa del vaso (Fig.8).

Los injertos una vez disecados mostraban un color blanquecino, siendo su calibre uniforme, a excepción de una pequeña dilatación encontrada en un animal perteneciente al subgrupo Cont.<sub>1</sub> perteneciente al grupo Control. En el resto de los animales no se detectaron formaciones ectasiantes aneurismáticas del propio injerto ni de la zona de la anastomosis.

<b>Distribución de los animales según hallazgos angiográficos</b>				
	<b>Nor.Est.&lt;50 %</b>	<b>Est. 50-60 %</b>	<b>Onclu.Est.&gt;70 %</b>	<b>Aneurisma</b>
A <sub>1</sub>	1		1-1*	
A <sub>2</sub>		1	2	
B <sub>1</sub>	2		1	
B <sub>2</sub>	1	1	1*	
C <sub>1</sub>	2		1	
C <sub>2</sub>	2		1	
D <sub>1</sub>	3			
D <sub>2</sub>	2	1		
Co <sub>1</sub>			1-1*	1
Co <sub>2</sub>			2-1*	
T <sub>1</sub>	3			
T <sub>2</sub>	2	1		
<b>Total</b>	<b>18</b>	<b>4</b>	<b>13</b>	<b>1</b>
<b>N=36</b>				
<b>Asterisco * = Oclusiones sin circulación colateral</b>				
<b>Nor.Est.&lt;50 % = Angiografía normal o con estenosis del 50 %</b>				
<b>Est.50-60 % = Angiografía con estenosis moderadas</b>				
<b>Oclu.Est.&gt;70 % = Angiografía con oclusión o estenosis severa</b>				
<b>Aneurisma = Dilatación mayor del diámetro del vaso nativo sano</b>				
Subgrupos A <sub>1</sub> y A <sub>2</sub> : Injertos conservados a +4°C, denudados y sembrados. Sacrificio 3 y 6 meses				
Subgrupos B <sub>1</sub> y B <sub>2</sub> : Injertos ultracongelados y conservados a -30°C, denudados y sembrados. Sacrificio 3 y 6 meses				
Subgrupos C <sub>1</sub> y C <sub>2</sub> : Injertos ultracongelados y conservados a -80°C, denudados y sembrados. Sacrificio 3 y 6 meses				
Subgrupos D <sub>1</sub> y D <sub>2</sub> : Injertos ultracongelados y conservados a -196°C, denudados y sembrados. Sacrificio 3 y 6 meses				
Subgrupos Co <sub>1</sub> y Co <sub>2</sub> : Injertos frescos, no denudados ni sembrados. Sacrificio 3 y 6 meses				
Subgrupos T <sub>1</sub> y T <sub>2</sub> : Injertos de propio segmento aórtico (Sham operation)				

**Tabla III**

Tampoco se han apreciado morfológicamente calcificaciones de la pared de los injertos trasplantados. La flexibilidad de los injertos permeables medida por la palpación manual fue buena y similar al vaso nativo y sin diferencias con los diferentes grupos de animales.

No hemos detectado en ninguno de los animales zonas con colecciones hemáticas, formaciones quísticas, comunicaciones fistulosas entre el injerto y la Vena Cava o el intestino. Tampoco se detectaron abscesos,

reacciones inflamatorias, formaciones a cuerpo extraño o reacciones de rechazo del material implantado.

Una vez extraído el injerto en bloque para dañar lo menos posible el endotelio, con parte del vaso nativo proximal y distalmente, se procedió a abrir longitudinalmente las piezas obtenidas para visualizar el interior (Fig. 9). La parte interna de los injertos permeables presentaba una capa brillante azulada nacarada de superficie lisa, que cubría en las zonas de las anastomosis los hilos de sutura que se veían por transparencia. En algunos injertos con estenosis el engrosamiento estenótico parecía originarse en la anastomosis distal y muy raramente en el nivel de la sutura proximal. En el injerto permeable pero con dilatación se podía observar parte de la superficie interna recubierta por trombo organizado.

### 7. Microscopía óptica

La valoración bajo microscopía óptica se ha realizado después de someter a los especímenes seleccionados a las tinciones de Hematoxilina-Eosina (Fig. 10) para poder observar la estructuración de las diferentes capas de la pared. La tinción Tricrómica de Mason se ha utilizado para tener una visualización más precisa del tejido conjuntivo del injerto.

Desde el punto de vista general, los injertos permeables estudiados han ofrecido unas imágenes en las que siempre se han podido diferenciar las tres capas: la íntima con una adecuada organización estructural, la media con su doble capa de fibras musculares circulares y longitudinales y la adventicia que ha incrementado en espesor, sobre todo a expensas de la aportación fibrosa producida por la reacción retroperitoneal al injerto. Cuando el vaso ha estado obstruido de forma crónica la desorganización estructural de las capas ha sido un hallazgo habitual.

A nivel de las anastomosis existía una cierta desorganización en la estructuración de las tres capas, imbricándose el tejido de la aorta huésped con el injerto trasplantado. El material de polipropileno de 6/0 utilizado en las suturas, de color azulado en las preparaciones de hematoxilina-eosina y más amarillento si la tinción era el tricrómico de Mason, nos ha mostrado una escasa reacción hística. La fibrosis por tejido conjuntivo constituido por fibras elásticas y algunas fibras musculares a este nivel de la sutura ha sido la norma.



Se han visualizado en general muy pocas células linfáticas de reacción a cuerpo extraño.

Las características de la microscopía óptica han sido muy similares en los diferentes grupos de animales y en los períodos de tiempo señalados, no obstante han podido apreciarse algunas diferencias.

A los tres meses todos los injertos permeables han conservado la estructura de su pared. En la capa media el número de fibras musculares era inferior que en los vasos observados en fresco, aunque con una disposición normal, pero con una infiltración de tejido conjuntivo, a veces sin imbricarse con las fibras musculares. Las fibras musculares se encontraban muy disminuidas en los injertos conservados a +4°C. Prácticamente no existían diferencias a este nivel entre los injertos ultracongelados y conservados a -30°C, -80°C, y -196°C. El único injerto del grupo control que estaba permeable presentaba en esta capa media muy pocas fibras musculares. A nivel de la íntima se observaban células endoteliales y a nivel de la adventicia un importante engrosamiento por tejido fibroso de granulación con células histiocíticas y algún miofibroblasto y discretas disrupciones de este tejido conjuntivo por células musculares lisas modificadas, en el que se podían distinguir abundantes vasa-vasorum neoformados.

Con respecto a la aparición de células plasmáticas -índice de reacciones de rechazo-, prácticamente no se han identificado células linfoides en ninguno de los animales pertenecientes a los grupos experimentales. Se han visualizado de forma aislada algunas células plasmáticas a nivel de la capa media y adventicia, que podían indicar que hubo cierta reacción de cuerpo extraño y, en algún caso, como en el único injerto del grupo control permeable perteneciente a un animal que debía sacrificarse en este período de tres meses, algunos nódulos linfoides bien organizados.

Es importante señalar que se ha podido apreciar cierta hiperplasia o engrosamiento intimal, formado por células endoteliales y musculares lisas mezcladas con macrófagos, y con más intensidad a nivel de la anastomosis distal y que ha afectado a animales pertenecientes a todos los grupos, incluido el grupo testigo.

Sin embargo, los hallazgos histológicos encontrados en los 4 animales que hubieron de ser sacrificados por sufrir una trombosis aguda eran bastante

distintos y significativos. En los 2 animales pertenecientes al grupo control, tanto el correspondiente al subgrupo Co<sub>1</sub> -sacrificado a las 24 horas-, como el correspondiente al subgrupo Co<sub>2</sub> -sacrificado a los 21 días-, se podía observar las características de un fenómeno de rechazo agudo caracterizado por un engrosamiento intimal, infiltración linfocitaria subendotelial con abundantes macrófagos, alteraciones de la lámina elástica interna y reacción inflamatoria perivascular. El correspondiente al subgrupo Co<sub>2</sub> del mismo grupo control, además presentaba ruptura de las fibras elásticas y necrosis de la media con abundantes macrófagos y grandes zonas con ausencia de endotelio. Por contra, en el animal del subgrupo A<sub>1</sub> -sacrificado a los 6 días- nos encontramos con una ausencia casi total de endotelio con una superficie interna cubierta de fibrina. En el animal del subgrupo B<sub>2</sub> -sacrificado a los 43 días- una leve infiltración linfoplasmocitaria, pero un importante engrosamiento intimal de tipo hiperplásico que ocluía en vaso.

A los 6 meses, los injertos trasplantados han seguido conservando su estructura. A nivel de la íntima se ha observado en todos los grupos, excepto en el control donde todos los injertos se habían ocluido, distintos grados de hiperplasia intimal a nivel de las anastomosis distales formada por células musculares lisas. A nivel de la capa media o en el subendotelio, prácticamente no se han observado células linfoides, por lo que podemos afirmar, que no existía rechazo de los injertos trasplantados, aunque posiblemente había menos células musculares lisas que en los vasos nativos, siendo reemplazadas por tejido conjuntivo. A nivel de la adventicia, se seguía observando la neovascularización dentro del tejido fibroso que formaba parte de esta estructura.

En ninguna de las preparaciones pudimos detectar calcificaciones.

El estudio microscópico de los injertos trasplantados de los distintos grupos experimentales evidenció la mejor estructuración y conservación en los ultracongelados y criopreservados, -30°C, -80°C, siendo óptima la conservación a -196°C. La conservación a +4°C mostró más zonas de retracción tisular.

## 8. Microscopía electrónica de transmisión.

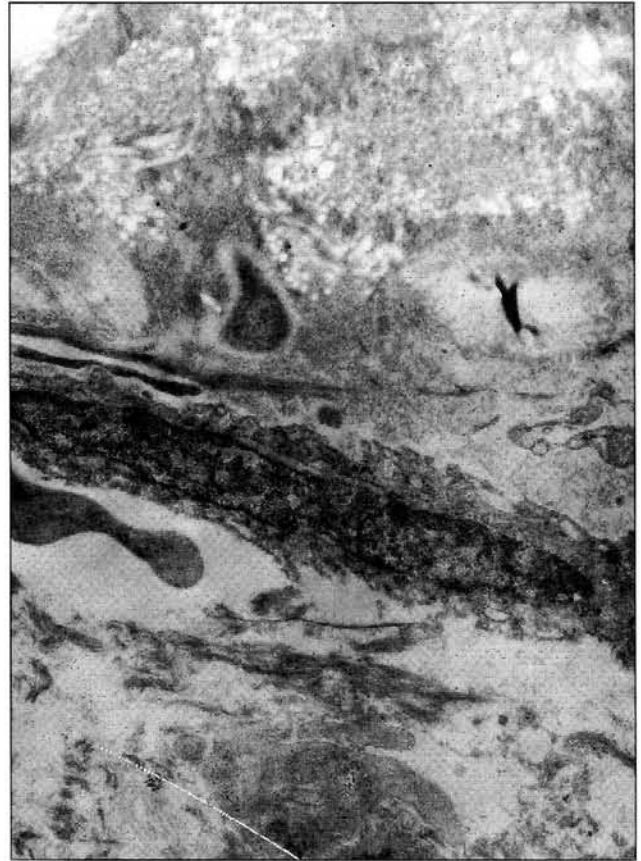
La microscopía electrónica de transmisión ha permitido detallar con más precisión las observaciones

obtenidas por medio del microscopio óptico y que han sido reseñadas precedentemente, aunque ha sido centrado el mayor interés en las imágenes de la íntima y del endotelio.

A los 3 meses, en los injertos permeables su estructura vascular se ha visualizado con nitidez. En la adventicia se ha observado el típico engrosamiento por tejido conjuntivo y vasos neoformados. En la media se han visualizado las células musculares lisas y tejido conjuntivo, y en la íntima se han observado las células endoteliales que la tapizan en su cara interna y en algunas zonas se podían ver hematíes aislados y fibrina.

En los animales ocluidos que precisaron ser sacrificados hemos visto que en el injerto correspondiente al animal del subgrupo A<sub>1</sub> (grupo +4°C) existía una gran cantidad de tejido conjuntivo en la media y prácticamente una ausencia de endotelio a nivel de la íntima, que tenía el tejido conjuntivo en contacto con la luz interna del vaso y al cual se habían adherido fibrina y hematíes. En el injerto correspondiente al animal del subgrupo B<sub>2</sub> (grupo -30°C), se ha visualizado un gran engrosamiento intimal formado a expensas de células musculares lisas mezcladas con macrófagos. En los injertos pertenecientes a los animales de los subgrupos Co<sub>1</sub> y Co<sub>2</sub> (grupo control) se ha observado nítidamente la necrosis de la media, alteraciones de la lámina elástica interna, reacción inflamatoria perivascular, engrosamiento intimal e infiltración linfocitaria subendotelial por macrófagos en el ocluido a las 24 horas y vacuolización de las células endoteliales con linfocitos y macrófagos que se encontraban en la proximidad a las células endoteliales dañadas, y la denudación parcial del endotelio con deposición de fibrina en el ocluido a los 21 días (Fig. 11).

A los 6 meses la estructura de los injertos trasplantados permeables mostraba gran abundancia de tejido fibroso a nivel de las tres capas. A nivel de la media la fibrosis era muy manifiesta, encontrándose las células musculares lisas más dispersas rodeadas de abundante tejido conjuntivo. A nivel de la íntima se observaba un recubrimiento completo de células endoteliales. En las zonas endoteliales correspondientes a las anastomosis distales se podía observar, en los injertos que habían desarrollado diversos grados de estenosis, engrosamientos formados a expensas de células musculares lisas.



**Fig. 11.** Imagen obtenida con microscopía electrónica de transmisión que muestra la pared de un injerto fresco trasplantado (grupo control), ocluido a las 24 horas. Obsérvese la vacuolización dentro de las células endoteliales (10.000X)

## 9. Microscopía electrónica de barrido

Esta técnica histológica ha sido una técnica especialmente útil para estudiar la superficie interior de los injertos trasplantados, debido a que es posible la visualización de las preparaciones a grandes aumentos.

Por este método se ha podido no solamente constatar la presencia o ausencia de las células endoteliales, sino también las características morfológicas de las células endoteliales y su organización o desorganización, datos estos últimos que proporcionan al explorador una idea clara de la funcionalidad del endotelio. Así, también hemos confirmado, por medio del estudio histológico de una muestra de cada grupo de los crioinjertos sembrados previa a la implantación, la eficacia del sembrado endotelial.

A los tres meses, la superficie interna de los injertos permeables estaba recubierta de una monocapa

de células endoteliales redondeadas o más o menos alargadas y unidas entre sí perfectamente adheridas, pudiendo observarse aisladamente algún hematíe o conglomerados de fibrina.

En los animales que hubieron de ser sacrificados precozmente en relación a los períodos programados, debido a la trombosis aguda de la aorta, se observó lo siguiente: en el animal del subgrupo Co<sub>1</sub>, sacrificado a las 24 horas, y del subgrupo Co<sub>2</sub>, sacrificado a los 21 días, pertenecientes al grupo control, existía una desorganización del endotelio, las células endoteliales formaban islotes de forma dispersa con grandes lagunas o superficies no endoteliales entre ellos, en las que se encontraban linfocitos, plaquetas, hematíes y células musculares lisas. A esta situación se asemejaban las preparaciones del animal del subgrupo A<sub>1</sub>, perteneciente al grupo A (+4°C), sacrificado a los 6 días, donde además se observaba una red filamentosa formada por fibras colágenas con oquedades en su interior donde se encontraban hematíes, fibrina. En el animal del subgrupo B<sub>2</sub> perteneciente al grupo B (-30°C), sacrificado a los 43 días, se podía observar gran cantidad de células musculares lisas y macrófagos mezclados con las células endoteliales.

A los 6 meses, las imágenes de los injertos permeables eran muy semejantes a las observadas en el período de los 3 meses, aunque, si cabe, podía apreciarse que las células endoteliales mostraban pseudópodos para adherirse a la capa subyacente o a otras células endoteliales vecinas (Fig. 12).

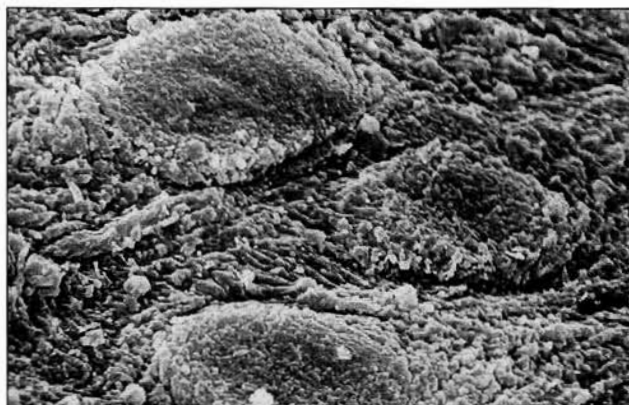


Fig. 12. Imagen obtenida al microscopio electrónico de barrido donde se observa la superficie endoluminal de un implante ultracongelado y conservado a -196°C, denudado de su endotelio y sembrado con células endoteliales venosas del receptor, después de 3 meses de la implantación. Se observa las células endoteliales (15.000X).

## 10. Test de trombogenicidad

Como se puede ver en la en la Tabla IV, la trombogenicidad de todos aloinjertos crioconservados que estaban permeables ha sido muy similar y no mostraba casi diferencias con el grupo testigo, como cabía esperar de unas superficies endotelizadas.

Trombogenicidad según test de Yates		
Subgrupos y nº de injertos permeables testados		
	3 Meses	6 Meses
A <sub>1</sub> (1 injerto)	0,7	
A <sub>2</sub> (1 injeto)		0,8
B <sub>1</sub> (2 injertos)	0,8	
B <sub>2</sub> (2 injertos)		0,8
C <sub>1</sub> (2 injertos)	0,8	
C <sub>2</sub> (2 injertos)		0,8
D <sub>1</sub> (3 injertos)	0,8	
D <sub>2</sub> (3 injertos)		0,9
Co <sub>1</sub> (1 injerto)	0,7	
Co <sub>2</sub> (0 injertos)		no injertos
T <sub>1</sub> (3 injertos)	1	
T <sub>2</sub> (3 injertos)		1

Subgrupos A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>: Injertos conservados a +4°C, denudados y sembrados. Sacrificio 3 y 6 meses

Subgrupos B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>: Injertos ultracongelados y conservados a -30°C, denudados y sembrados. Sacrificio 3 y 6 meses

Subgrupos C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub>: Injertos ultracongelados y conservados a -80°C, denudados y sembrados. Sacrificio 3 y 6 meses

Subgrupos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>: Injertos ultracongelados y conservados a -196°C, denudados y sembrados. Sacrificio 3 y 6 meses

Subgrupos Co<sub>1</sub> y Co<sub>2</sub>: Injertos frescos, no denudados ni sembrados. Sacrificio 3 y 6 meses

Subgrupos T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub>: Injertos de propio segmento aórtico (Sham operation)

Tabla IV

## 11. Análisis estadístico

Los datos relativos al parámetro permeabilidad están reflejados en la Tabla I y en la Fig. 4. La valoración de los datos de los distintos grupos de estudio, al tiempo de experimentación de tres y seis meses utilizando el test del Chi cuadrado, no fueron significativos con una X<sup>2</sup>=12 y g.l.=10 para el período de los tres meses y una X<sup>2</sup>=18 y g.l.=15 para los seis meses. Sin embar-



go, considerando los grupos estudiados en un conjunto de tiempo global, los valores sí se mostraron estadísticamente significativos ( $p \leq 0,05$ ) con  $X^2 = 28,09$  con g.l.=15. Es decir, que la distribución de los diferentes valores y las diferencias entre ellos no se debieron al azar.

Si en el estudio se excluye en la comparación el grupo Testigo, los datos fueron  $X^2 = 23,33$  con  $p \leq 0,05$ ; es decir, con significación estadística. Por otro lado, excluyendo en el estudio los grupos Control y Testigo, el conjunto de animales restante se mostró con  $X^2 = 16$  con  $p \leq 0,05$  y por tanto con significatividad estadística.

## Discusión

Una de las aportaciones terapéuticas más significativas de la Cirugía Vasculosa ha sido la creación y desarrollo de las prótesis sintéticas, y deben reconocerse las ventajas de este tipo de materiales, pero también es cierto que al ser inertes desde el punto de vista biológico no se ha conseguido alcanzar las características físicas y biológicas de las estructuras vasculares. Por lo tanto, se puede decir que las prótesis sintéticas están muy lejos de merecer el título de «sustituto arterial ideal».

Hay evidencias claras, a nuestro juicio, que sugieren la necesidad de otros sustitutos vasculares.

La Cirugía Vasculosa optó en un determinado momento por el empleo de las prótesis sintéticas y abandonó el trasplante de vasos, aún cuando es evidente que el éxito en los avances de los trasplantes de órganos ha sido progresivamente mayor, debido al mejor conocimiento de las reacciones inmunitarias y a la aparición de drogas inmunosupresoras más efectivas.

Por otro lado, han existido y existen actitudes que demuestran que un cierto sector de la Cirugía Vasculosa investigadora ha buscado superar los inconvenientes de las prótesis sintéticas. Durante los años 70 y 80 con soluciones para controlar el rechazo, ingeniosas pero simples y poco eficaces, como el desarrollo de las prótesis biológicas acelulares, provenientes tanto de individuos de la misma especie (9) como de otras (10). Más recientemente, en la década de los 80 (11), con el sembrado endotelial de las prótesis sintéticas, que ha demostrado un grado científico mayor, ya

que implica el reconocimiento del papel de órganos de las arterias sobre la simple idea clásica de conducto. A pesar de todos estos esfuerzos, los resultados clínicos no han mejorado.

La evidencia rotunda de la necesidad de un material biológico es la dependencia de la Cirugía Vasculosa de la Vena Safena autóloga (12), pero su empleo, desgraciadamente, está limitado por su diámetro y disponibilidad.

Existen tendencias clínicas actuales al empleo de los aloinjertos criopreservados en la Cirugía Vasculosa, bien usando las Venas Safenas, bien empleando las arterias. Sin embargo, los datos de permeabilidad ofrecidos en la literatura vasculosa empleando las venas conservadas en el tratamiento de las enfermedades arteriales que afectan a los sectores fémoro-poplíteo y distal, no han sido muy halagüeños ya que la permeabilidad primaria no supera el 20 % a un año y la secundaria el 40 % (13-15); muy inferiores a los obtenidos con el uso de la Vena Safena autóloga. También la formación de aneurismas de los aloinjertos venosos es un hecho cierto, ya que se citan cifras de un 25 % a los 5 años y un 50 % a los 10 años.

No obstante estos resultados deben ser matizados muy especialmente, ya que la gran mayoría de los pacientes en los que se emplean estos aloinjertos venosos han sufrido intentos fallidos previos de revascularización como consecuencia de un pobre lecho distal y en los cuales ya se ha usado la Vena Safena autóloga y las prótesis. Además, no solamente la influencia inmunológica es la responsable de la trombosis o la formación de aneurismas, pues cambios degenerativos de este tipo se han observado en venas autólogas transplantadas; por tanto, deben estar implicados quizá otros factores como la isquemia de la pared después de la movilización de la vena, los métodos de extracción y el componente varicoso de las venas extraídas.

El uso actual de las arterias criopreservadas en la clínica es prácticamente testimonial. *Edouard Kieffer* (16) los está utilizando con gran éxito para el reemplazo de prótesis aórticas infectadas. *Xabier Barral* (17) los está empleando en la clínica para el tratamiento de procesos isquémicos de los miembros inferiores y está obteniendo una permeabilidad primaria a 30 meses del 45 % y una permeabilidad secundaria del 70 % en el mismo período de tiempo. *Dinnis Da Gama* (18) utiliza los aloinjertos arteriales en los problemas isquémicos

micos de pacientes que están sometidos a terapia inmunosupresora por ser portadores de un órgano trasplantado, con buenos resultados preliminares.

Dados los problemas que presenta el empleo de los homoinjertos arteriales, derivados de la histocompatibilidad, hemos diseñado un estudio en el perro, que aborda experimentalmente una solución con dos vertientes, por un lado la criopreservación y, por otro, la eliminación del endotelio en el vaso donante y la sustitución del mismo por células endoteliales del receptor.

De esta forma tenemos un material de idénticas características físicas que la arteria a la que debe sustituir, al que se le ha disminuido su capacidad antigénica, tanto por el tratamiento con el frío como por la eliminación de su endotelio; y merced a la siembra endotelial con células del receptor tratamos de evitar, simultáneamente, el problema de la trombosis precoz y el desarrollo de la hiperplasia intimal, facilitándose por tanto los mecanismos de asimilación del injerto por el organismo receptor para un normal funcionamiento posterior.

Hemos utilizado como animal de experimentación el perro, puesto que es una especie que se ha comportado como la más parecida a la humana en el estudio de las prótesis sintéticas vasculares. Además, el proceso de degeneración arterial permite obtener ciertas similitudes, en cortos períodos de tiempo, con lo que sucede en nuestra especie en períodos más largos.

Muchos estudios de Cirugía Vascul, que emplean el perro como reactivo biológico, utilizan las arterias carótidas, debido por un lado a un riesgo muy bajo de accidentes isquémicos cerebrales, dada su musculatura cervical, que permite una excelente suplencia colateral en los momentos del clampaje carotídeo, y por otro, a que el mismo animal puede servir de control con la manipulación correspondiente en el eje carotídeo contralateral. A estas dos características, tremendamente interesantes, se suma la ventaja postoperatoria de evitar una laparotomía y naturalmente la necesidad de un menor número de animales.

La decisión del empleo del sector aórtico en nuestro estudio fue tomada, en primer lugar, porque deseábamos confirmar que el sembrado endotelial se producía en condiciones de elevado flujo sanguíneo,

adversas para la adherencia endotelial; en segundo lugar, por el gran calibre de la Aorta que permitiría anastomosis fáciles y rápidas y, de producirse defectos técnicos leves, éstos no influirían de manera decisiva en el experimento; en tercer lugar, porque consideramos que en la aorta podía existir un menor riesgo de trombosis en el caso de cambios hemodinámicos en el animal durante el postoperatorio, debido al elevado volumen sanguíneo/minuto de la aorta; y en cuarto lugar, porque sabíamos que los vasos de gran diámetro superficialmente denudados dejan una superficie idónea, con gran cantidad de colágeno, para la adherencia y dispersión de las células endoteliales al sembrarlas.

Los problemas esenciales a superar en el empleo de los aloinjertos en Cirugía Vascul son la inmunidad y la trombogenicidad del injerto donante, y ambos están íntimamente relacionados. Se sabe que las células endoteliales son el factor primordial responsable del inicio de la reacción de rechazo, que se manifiesta tanto por la oclusión del injerto como por la degeneración del mismo.

Centrándonos en los fenómenos trombóticos de los aloinjertos, se sabe que los fenómenos inmunológicos de rechazo dan lugar a alteraciones en los sistemas de la anticoagulación (trombomodulina (TM) y el sulfato heparínico antitrombina III-proteoglicano (HSPG-ATIII)) y de la fibrinólisis (Activador tisular del plasminógeno -tPA-) de la pared de los vasos transplantados (19, 21).

Estas alteraciones de la coagulación y de la fibrinólisis puestas en marcha por fenómenos inmunológicos, en las que está implicada la pared de los aloinjertos, refuerzan nuestro interés en la eliminación del endotelio donante.

Pero a diferencia de las soluciones clásicas del pasado tendentes a la eliminación celular manteniendo la membrana basal y la estructura de colágeno (9, 22-24), que dan lugar a una baja permeabilidad y un prohibitivo índice de aneurismas, nosotros hemos apostado por prótesis vivas mediante el sembrado con células endoteliales del receptor, ya que el endotelio «in vivo» inhibe la coagulación de muy diversas formas. Además, también es asumido que el sembrado endotelial puede ayudar a suprimir otros dos fenómenos, como son la hiperplasia fibrosa neointimal y la progresión de la arterioesclerosis.



Es sabido que las prótesis sintéticas y las células endoteliales no tienen una buena convivencia porque las propiedades físico-químicas de los materiales empleados en la fabricación de las prótesis, como son la carga negativa, la capacidad de impermeabilización, o la porosidad, que confieren las características antitrombóticas, dificultan la adherencia de las células endoteliales en el proceso de la siembra, y en la mayoría de los simposios se pone especial énfasis en la mejora de la fijación y retención de las células sembradas, mediante proteínas adhesivas (25). Pero, aún así, existen otras causas que dificultan la adhesión, como la rotura de la fuerza adhesiva del sustrato proteico producida por las proteasas tanto de la fibrinólisis del trombo luminal como de los leucocitos –al ser activados por los mecanismos de defensa corporal (coagulación y sistema del complemento) puestos en marcha por los sustratos artificiales (26, 27)– que conllevan, posteriormente, a la desintegración de la capa de células endoteliales sembradas.

La fibronectina es una molécula importante de unión celular y, probablemente, es la clave para que la unión de las células endoteliales a cualquier sustrato se realice con éxito (28). Sin embargo, no hemos considerado oportuno utilizar la fibronectina, cuyas propiedades son evidentes en cuanto a la adherencia celular se refiere, por tres motivos fundamentalmente. En primer lugar, porque los vasos nativos poseen cantidades más que suficientes de fibronectina para garantizar la adherencia celular, sobre todo los vasos de gran calibre, como así lo señalan los estudios del Hospital de Bethesda de Indianápolis. En segundo lugar, porque ejerce un efecto tóxico sobre la célula endotelial cuando ésta se añade al cultivo celular, como se ha demostrado en la Universidad de Alcalá de Henares (29). Y en tercer lugar, porque hemos mezclado las células endoteliales recolectadas de la Vena Safena interna del perro con sangre, ya que sabemos que el coágulo tiene niveles altos de fibronectina (11).

Es muy evidente, que los vasos nativos, a diferencia de las prótesis sintéticas, son el sustrato ideal para el sembrado endotelial (30, 31).

A pesar de que el método de recolección enzimática del endotelio de las venas produce muchas menos células para el sembrado que otros métodos, hemos preferido éstas como fuente de células endoteliales sobre la recolección del endotelio microvascular de

la grasa, ya que las células obtenidas son células virtualmente puras (32). La grasa, es cierto que genera por lo menos 10 veces más de endotelio que la vena, pero estas células endoteliales están muy contaminadas por fibroblastos (33, 35) y, como es sabido, el sembrado de estas células no endoteliales puede originar un desarrollo de las capas subendoteliales, disminuyendo el diámetro de los injertos sembrados (36).

En los estudios de la Universidad de Indiana (37) se dice que, en el ambiente experimental, una vena de 3 mm de diámetro y de 1 cm de longitud puede dar suficientes células endoteliales para sembrar un injerto de 5 mm de diámetro y 60 centímetros de largo, y se apunta a que quizás el área donante venosa deba medir al menos el 5,25 % de la superficie del injerto a sembrar, pero la completa endotelización sucede a las 4-6 semanas, ya que las células deben proliferar.

Obsérvese, para comparar, que en este experimento que presentamos el área donante venosa (cilindro de 4 mm de diámetro x 100 mm de alto) era el 260 % de la superficie del injerto (cilindro de 10 mm de diámetro x 15 mm de alto).

Dos aspectos que deben ser tenidos en cuenta, y así lo hemos hecho en nuestro estudio, son el momento ideal del sembrado endotelial y la densidad celular a sembrar.

Se puede realizar el sembrado de una forma inmediata a la extracción de las células endoteliales (38), o bien más tardíamente procedentes de subcultivos para poder obtener una mayor cantidad de células endoteliales (39). No obstante, las células endoteliales cultivadas se pueden alterar para adaptarse a las condiciones del nuevo medio en el que se desarrolla y, así, se han descrito cambios en la expresión de sus proteínas antigénicas, secreción de ciertas enzimas, etc. Por esa razón, hemos preferido un sembrado inmediato.

La disparidad de resultados de efectividad del sembrado endotelial (35,40) en las prótesis sintéticas en ensayos experimentales pueda, quizás, ser explicada por los distintos grados en la densidad celular del sembrado endotelial.

La técnica del recubrimiento con células endoteliales (41) o «sodding» en términos anglosajones, consiste en colocar una alta densidad de células endoteliales en contacto con la superficie del injerto permitiéndose

que se adhieran y dispersen. El endotelio así conseguido no requiere proliferar. De esta forma se evita el riesgo de que las células endoteliales en proliferación pueden modularse fenotípicamente, adquiriendo naturaleza procoagulante (42, 43).

Es evidente que hemos considerado la densidad de sembrado celular como un aspecto importante a tener en cuenta en este experimento, por lo que nuestros injertos criopreservados y desnudos han sido sembrados con alta densidad de células endoteliales para un total recubrimiento –debido a la gran área endotelial venosa usada en comparación con la superficie del injerto–, justo inmediatamente a la obtención de las células endoteliales, que no implica-se la proliferación celular.

En perros se ha estimado que se requieren 90 células endoteliales por  $\text{mm}^2$  de injerto para que se produzca una endotelización efectiva «in vivo» (44), pero es preciso proliferación celular posterior. Jarrel (41) ha constatado que para producir una cobertura completa de injertos de Dacron sin necesidad de crecimiento endotelial –que es lo que nosotros pretendemos, para minimizar los riesgos de trombosis–, es preciso al menos  $7,7 \times 10^4$  células endoteliales/ $\text{cm}^2$ .

Según estas cifras, en nuestro experimento necesitábamos en torno a los 376.000 células endoteliales, para recubrir el injerto aórtico. Si el vaso nativo contiene aproximadamente  $1 \times 10^5$  células endoteliales por  $\text{cm}^2$  (32), nosotros podríamos disponer en el segmento de Safena extraído de 1.250.000 células endoteliales, desde el punto de vista teórico. No obstante –aunque algunos autores señalan una recolección de  $5,3 \pm 2,8 \times 10^4$  células por  $\text{cm}^2$  de endotelio venoso con el método enzimático (45)–, si suponemos incluso, que nuestro rendimiento de recolección de células endoteliales de la vena es inferior y alcance solamente el 30 %, aportamos alrededor de los 375.000 células endoteliales necesarias para el «sodding».

El sembrado endotelial pudiera ser utilizado, también, para reendotelizar tanto prótesis como los vasos después de procedimientos tales como las angioplastias o las aterectomías, o los stents. Además, es posible que a través de mecanismos de ingeniería genética estas células puedan ser manipuladas para que produzcan proteínas que puedan modificar la trombogenicidad y, quizás también, disminuir la tasa de estenosis recurrente mediante la influencia sobre la hiperplasia intimal.

Desde el punto de vista teórico, se abre un futuro prometedor y fascinante para el tratamiento de otras enfermedades no vasculares. El contacto de estas células endoteliales con la sangre circulante las hace especialmente idóneas para la producción de proteínas y, de esta forma, corregir condiciones tales como la deficiencia de la insulina que se produce en la diabetes mellitus.

En nuestro experimento hemos querido establecer una comparación histológica entre los diferentes grupos de aloinjertos arteriales que han sido criopreservados durante un mes a diferentes temperaturas y a los que se les ha retirado el endotelio y se los ha sembrado con células endoteliales de origen venoso del receptor, ya que lo que pretendemos es estudiar la interacción de estas dos variables juntas –criopreservación y desnudo endotelial– para disminuir las posibilidades de rechazo y, por tanto, de formación de aneurismas y de trombosis, sin perder las ventajas del endotelio, manteniendo un injerto vivo de características físicas ideales.

No se ha considerado de una forma consciente la identidad antigénica de los animales, de tal forma que pudiéramos valorar de la mejor manera posible el efecto conjunto del frío y la retirada del endotelio donante en la reducción de la antigenicidad al constatar la permeabilidad y los estudios histológicos, además de simplificar el experimento.

El hecho de conocer el momento del postoperatorio en que se produce la oclusión puede servir en cierta medida para intuir la causa de la misma, en el caso de que las obstrucciones tengan una distribución regular dentro de los distintos grupos y subgrupos, como ha sucedido en este estudio.

Aún no siendo el aspecto de la permeabilidad uno de los más importantes de este trabajo, nuestros resultados muestran que la mayor parte de las oclusiones se han sucedido en el período comprendido dentro de las primeras 14 semanas del postoperatorio; y deducimos que las obstrucciones más precoces han podido deberse tanto a reacciones de rechazo como a la ineficacia del sembrado endotelial, y las más tardías a la hiperplasia intimal.

En efecto, los grupos con menor tasa de permeabilidad han sido el grupo Control y el grupo A (+4°C), y curiosamente las oclusiones se han producido precozmente, en las primeras semanas del postoperatorio.



rio. Sospechamos que en el primero (grupo Control) las reacciones inmunitarias han llevado a la trombosis del injerto (manifestado de forma aguda en 2 animales), ya que se observó un importante infiltrado linfoplasmocitario a nivel de las capas de los implantes de estos dos animales sacrificados precozmente, antes de sus períodos de evaluación correspondientes; y en el segundo (grupo A), quizás las oclusiones tengan alguna relación con una pérdida de las células endoteliales sembradas, dejando una superficie desnuda de endotelio y trombógena. Estos resultados de permeabilidad registrados por todos los subgrupos del grupo de injertos conservados a +4°C (A) nos sorprendieron, ya que las previsiones eran de una permeabilidad superior, incluso cercana a la de los injertos conservados a -196°C (D).

La permeabilidad obtenida en el grupo de injertos conservados a -196°C (D) ha sido excelente, pues no se ha registrado ninguna oclusión, al igual que en el grupo Testigo.

Los datos registrados por los grupos conservados a -30°C y -80°C (B, C), ha sido óptima. En general, si se tiene en cuenta todos los grupos de animales que recibieron un implante ultracongelado y conservado a temperaturas por debajo de los -29°C (B, C, D), han mostrado una permeabilidad global claramente superior a la registrada por los grupos que recibieron un implante alogénico no ultracongelado (grupos A y Control).

Por otro lado, la permeabilidad de todos los grupos criopreservados ha sido superior a la del grupo control que recibió implantes alogénicos frescos.

En contraposición a estas oclusiones más precoces, pensamos que las oclusiones más tardías producidas en los subgrupos B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>, pertenecientes al grupo B, y en los subgrupos C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> pertenecientes al grupo C, pudieran estar en relación con el desarrollo de hiperplasia intimal y no con fenómenos de rechazo.

Existe una convicción general, aunque no científicamente probada, de que las arterias son más antigénicas que las venas (46, 47). Pero lo que si se ha demostrado por algunos autores es la reducción de la antigenicidad de los aloinjertos mediante el tratamiento con el frío (48, 49) y la desaparición completa del rechazo a los 3 meses de realizado el trasplante, aunque el mecanismo íntimo de este fenómeno no ha sido explicado (50).

El desarrollo de la criobiología permite hoy en día la preservación de tejidos vivos durante largos períodos de tiempo, manteniendo sus características morfológicas y capacidad funcional, como ha sido claramente demostrado. La asociación de un crioprotector como el dimetil-sulfóxido a técnicas de preservación con el empleo del vapor del nitrógeno líquido parece hoy día ser el método más ventajoso (51, 52). No obstante, es posible que no todas las capacidades funcionales, como puedan ser la vasodilatación o vasoconstricción (53), se mantengan.

En el proceso del rechazo juega un papel preponderante la antigenicidad de las células endoteliales y existen, según *Todd* (54), 4 diferentes estados: un estado inicial de reconocimiento, un período caracterizado por fenómeno de reacción, fenómeno de reparación y un estado final de organización; y parece que, después de 100 días, el proceso de rechazo finaliza, al ser sustituido el endotelio donante por el del receptor, según *Smith Rixen* (55).

Sin embargo, la capacidad y el índice de repoblación endotelial es directamente proporcional a la histocompatibilidad con el receptor, de acuerdo con los datos experimentales de *Williams* (56). Es más, algunos autores opinan que la compatibilidad ABO entre donante y receptor ha mejorado los resultados.

Debemos poner de manifiesto que la tendencia actual, en los métodos de criopreservación de vasos, se orienta hacia la utilización de crioprotectores, generalmente el dimetil sulfóxido. *Boren* (57) los considera útiles para la conservación del endotelio y para la viabilidad celular en general, debido a que evita la formación de cristales de hielo intracelulares y, además, en su opinión, es posible que tengan un efecto beneficioso en la reducción de la capacidad antigénica del vaso. En sentido opuesto, para *Weber* (52), estos crioprotectores quizá no ejercen una influencia decisiva en el resultado,

El almacenamiento de nuestras arterias criopreservadas ha sido realizado sin emplear soluciones crioprotectoras. Si bien es cierto que, aunque los estudios preliminares actuales (17) sobre la criopreservación con agentes como el dimetil sulfóxido han demostrado la presencia de células endoteliales en los vasos criopreservados, no se ha demostrado que estas células tengan una actividad normal. Además, los datos comunicados en los últimos Congresos, por los autores franceses que emplean estos métodos de conser-

vacación, todavía no publicados, señalan que a los pocos días del trasplante las células endoteliales desaparecen casi en su totalidad, por lo que debemos suponer que existe un daño endotelial. A este respecto, es posible que este daño endotelial sea producido por la toxicidad celular del dimetil sulfóxido, dado que aunque se usa a concentraciones del 15 % seguramente la distribución del agente crioprotector no es uniforme en todos los segmentos del vaso. Aunque es evidente que pueden existir otras variables que influyan negativamente sobre el endotelio, como por ejemplo el uso de los antibióticos en estas soluciones, e incluso una mala técnica de extracción de los vasos, dado que la extracción de las arterias se realiza en el contexto de una extracción multiorgánica, y el turno de obtención de los vasos queda relegado al último lugar, cuando los cirujanos están cansados después de 6 horas de intervención.

En nuestro estudio, basados en la posibilidad del daño de los antibióticos sobre los vasos (58), tampoco han sido usados. Por otro lado, existen publicaciones donde no se consideran necesarios al no haberse encontrado gérmenes en los aloinjertos crioconservados (24).

Si bien es cierto que en nuestro experimento la preservación endotelial «donante» no es un objetivo primordial, y que su destrucción nos ofrecería ventajas, ya que lo sustituimos por endotelio receptor, y por tanto no deberíamos poner objeciones al empleo de productos tóxicos endoteliales, sin embargo lo hacemos en base a que es importantísimo preservar tanto las células endoteliales de los «vasa vasorum» adventiciales, que evitarán estados de hiponutrición del vaso, como las células musculares lisas, evitándose en nuestra opinión los riesgos de degeneraciones.

Como se puede observar, en nuestra casuística no han aparecido degeneraciones aneurismáticas ni calcificaciones, sin embargo sí se ha producido una dilatación aneurismática en el único vaso control permeable.

Existen dos técnicas opuestas en cuanto a la forma de alcanzar la ultracongelación, bien de forma paulatina, bien de forma inmediata. Nosotros hemos escogido la forma inmediata por ser un método más sencillo y, dado que aunque es posible que con la rápida congelación se pierda un cierto número de células, quizá sea ésta una de las razones en la reducción de

la antigenicidad propugnada por ciertos investigadores.

Con la ultracongelación rápida en nitrógeno líquido a muy bajas temperaturas hemos obtenido unos excelentes resultados de permeabilidad y prácticamente ningún problema de degeneración. Con las temperaturas de mantenimiento de  $-30^{\circ}\text{C}$  y  $-80^{\circ}\text{C}$ , más elevadas, que permiten más alteraciones metabólicas así como citológicas con trasiego de electrolitos y acumulación de líquidos en el espacio extracelular (59) que las temperaturas por debajo de los  $-140^{\circ}\text{C}$ , los resultados han sido ligeramente inferiores con respecto a los mantenidos a  $-196^{\circ}\text{C}$ , pero superiores a los conservados en refrigerador a temperaturas de  $+4^{\circ}\text{C}$ . No obstante, todos los métodos de criopreservación se han mostrado muy superiores con respecto al grupo control de animales receptores de injertos frescos.

El rechazo de los aloinjertos vasculares puede ser considerablemente atenuado mediante la administración de agentes inmunosupresores, como la ciclosporina dando a la pared arterial la posibilidad y oportunidad de regeneración en relación a la agresión a que es sometida, y esto mejora su comportamiento biológico. No obstante, pueden dar complicaciones trombóticas (60).

Es importante destacar, a nuestro juicio, el papel preventivo que pueden desempeñar ciertos fármacos en el tratamiento de arterioesclerosis post-trasplante de arterias, ya que los efectos secundarios son de menor relevancia, quizás, que los desencadenados por los inmunosupresores (61).

Es conveniente señalar, cuando se habla de trasplantes de órganos o tejidos, el peligro existente con la transmisión de procesos infecciosos o neoplásicos. En el caso especial del virus de la inmunodeficiencia adquirida (HIV) todavía existe un mayor riesgo, si cabe, de que se produzca el contagio, ya que aunque es política obligada el estudio mediante pruebas de detección del virus de todos los tejidos y órganos para trasplante, se sabe que después de la infección por este agente infeccioso hay una «ventana» de seronegatividad en el organismo infectado, y este es posiblemente, además, el período de máxima infectividad (62).

Nos encontramos en un momento en que se están

dando grandes pasos en el conocimiento de las reacciones de rechazo y su control. En otro orden, es evidente que en el desarrollo de las prótesis sintéticas parece que se ha alcanzado una meseta y que las posibilidades del empleo del material autólogo, bien la vena safena, bien las arterias, es limitada. Todos estos factores nos inclinan a considerar que la opción del uso de los aloinjertos es muy adecuada en estos momentos.

La finalidad de este trabajo experimental ha sido hacer un ensayo inicial con una bioprótesis celular de características físicas y bioquímicas semejantes a las arterias sanas, que pueden ser almacenadas en bancos de vasos, y a la que se le disminuye su poder antigénico por dos mecanismos: la ultracongelación y el recambio endotelial.

## Conclusiones

1. Todos los aloinjertos arteriales ultracongelados y crioconservados a diferentes temperaturas y, en particular a  $-196^{\circ}\text{C}$ , desnudados de su endotelio y sembrados con células endoteliales autólogas han mostrado buenos resultados, expresados en términos de permeabilidad, trombogenicidad y degeneraciones hísticas, cuando han sido implantados en la aorta abdominal del perro receptor.

2. Los aloinjertos ultracongelados y preservados a temperaturas de  $-30^{\circ}\text{C}$  y  $-80^{\circ}\text{C}$ , desnudados de su endotelio y sembrados, han mostrado unos resultados muy aceptables.

3. La aceptación por el receptor de los aloinjertos arteriales ultracongelados criopreservados y sembrados ha sido muy buena desde el punto de vista de la tolerancia tisular, sin problemas de rechazo.

4. No se han detectado complicaciones degenerativas en los crioinjertos implantados, tales como los pseudoaneurismas, los aneurismas verdaderos y las calcificaciones, durante el período de observación experimental.

5. La valoración final del éxito de la criopreservación y de la siembra y recubrimiento celular endotelial autólogo, en los aloinjertos arteriales, se basa tanto en los criterios de permeabilidad como en las

modificaciones histológicas en el propio injerto. Por ello, nuestros resultados señalan que la eliminación de las células endoteliales del injerto y la siembra de células endoteliales autólogas, junto a la ultracongelación y criopreservación, han aminorado la antigénicidad de los injertos y, por tanto, ha influido decisivamente en la preservación de la bioprótesis frente a una posible trombosis precoz, posibilitando así los procesos de asimilación del injerto por el organismo receptor.

6. Los vasos nativos son el substrato natural para las células endoteliales, que favorece su fijación y extensión de éstas.

7. Los aloinjertos arteriales en el área de la aorta abdominal del perro pueden ser un modelo valioso para el estudio del proceso de adherencia de las células endoteliales sembradas en vasos nativos.

8. El proceso de sembrado con alta densidad de células endoteliales autólogas inhibe el proceso de coagulación y la trombosis precoz del injerto.

9. El sembrado endotelial autólogo se puede considerar como un tratamiento útil para los vasos desnudados de endotelio al producir su reendotelización y mejorar su permeabilidad. Se abre así la posibilidad de utilizar esta técnica para disminuir la trombogenicidad de las endarterectomías y de las angioplastias.

10. Los aloinjertos arteriales nativos endotelizables pudieran llegar a ser una alternativa a las prótesis sintéticas tradicionales.

## BIBLIOGRAFIA

1. CARREL, A.: La technique opératoire des anastomoses vasculaires et la transplantation des viscéres. *Lyon Med*, 1902; 98:859-63.
2. GOYANES, J.: Nuevos trabajos de Cirugía Vascular, sustitución plástica de las arterias por las venas o arterioplastia venosa, aplicada como nuevo méto-



- do al tratamiento de los aneurismas. *El Siglo Médico*, 1906; 53:446-56.
3. GROSS, R. E.; HURWITT, E. S.; BILL, A. H.; PEIRCE, ECII.: Preliminary observations on the use of human arterial grafts in the treatment of certain cardiovascular defects. *N. Engl. J. Med.*, 1948; 239:578-9.
  4. OUDOT, J.: La greffe vasculaire dans les thromboses du carrefour aortique. *Presse Med.*, 1951; 59:234-36.
  5. DUBOST, C.; ALLARY, M.; OECONOMOS, N.: Á propos du traitement des anéurismes de l'aorte. Ablation de l'anéurisme, rétablissement de la continuité par greffe de l'aorte humaine conservée. *Mem. Acad. Chir.*, (Paris) 1951; 77:381-83.
  6. DEBAKEY, M. E.; COOLEY, A.: Surgical treatment of aneurysms of abdominal aorta by resection and restoration of continuity with homograft. *Surg. Gyn. Obst.*; 1953; 97:253-7.
  7. VOORTHEES, A. B.; JARETSKI, A.; BLAKEMORE, A. H.: Use of tubes constructed of Vinyon-N cloth in bridging arterial defects. *Ann. Surg.*, 1952; 135: 332-9.
  8. CALLOW, A. D.: Presidential address: the microcosm of the arterial wall- a plea for research. *J. Vasc. Surg.*, 1987; 5:1-18.
  9. DARDIK, H.; IBRAHIM, I. M.; SPRAYREGEN, S.; DARDIK, Y.: Clinical experience with modified umbilical cord vein for arterial by-pass. *Surgery*, 1976; 79: 618-22.
  10. ROSEMBERG, N.; THOMPSON, J. E.; KESHISHIAN, J. M.; WANDER WERF B. A.: The modified bovine arterial graft. *Arch. Surg.* 1976; 111:222-26.
  11. HERRING, M.; GARDNER, A.; GLOVER, J. A.: Single-staged technique for seeding vascular grafts with autogenous endothelium. *Surgery*, 1978; 84:498-508.
  12. VEITH, F. J.; GUPTA, S. K.; ASCER, E., et al.: Six year prospective multicenter randomized comparison of autologous saphenous vein and expanded polytetrafluorethylene grafts in infrainguinal arterial reconstructions. *J. Vasc. Surg.* 1986; 3:104-14.
  13. SCHRÖDER, A.; IMIG, H.: Biological Grafts, an alternative in peripheral reconstructions?. 14<sup>th</sup> *World Congress International Union Angiology, Munich*, 1986; p369-371.
  14. WALKER, P. J.; MITHCELL, R. S.; MACFADDEN, P. M.; JAMES, D. R.; MEHIGAN, J. T.: Early experience with cryopreserved saphenous vein allografts as a conduit for complex limb-salvage procedures. *J. Vasc. Surg.*, 1993; 18(4):561-9.
  15. HARRIS, R. W.; SCHNEIDER, P. A.; ANDROS, G.; OBLATH, R. W.; SALLES CUNHA, S.; DULAWA, L.: Allograft vein bypass: is it an acceptable alternative for infrapopliteal revascularization? *J. Vasc. Surg.*, 1993; 18(4):553-60.
  16. KIEFFER, E.; BAHERINI, F.; KOSKAS, C.; RUOTOLO, D.; LE BLEVER, D.; PLISSONNIER.: In situ allograft replacement of infected infrarenal aortic prosthetic grafts: results in forty-three patients. *J. Vasc. Surg.*, 1993; 17:349-56.
  17. GOURNIER, J. P.; ADHAM, M.; FAVRE, J. P.; RABA, M.; BANCEL, B.; LEPETIT, J. C.; BARRAL, X.: Cryopreserved arterial homografts: Preliminary study. *Ann. Vasc. Surg.*, 1993; 7:503-11.
  18. DINIS DA GAMA, A.; SARMENTO, C.; VIEIRA, T.; DO CARMO G. X.: The use of arterial allografts for vascular reconstruction in patients receiving immunosuppression for organ transplantation. *J. Vasc. Surg.*, 1994; 20:271-8.
  19. LABARRERE, C. A.; FAULK, W. P.: Microvascular perturbations in human allografts: analogies in preeclamptic placentae. *Am. J. Reprod. Immunol.*; 1992; 27(3-4):109-16.
  20. FAULK, W. P.; LABARRERE, C. A.: Vascular events in placentae and organ allografts. *Am. J. Reprod. Immunol.*; 1992; 28(3-4):176-80.
  21. LABARRERE, C. A.; PITTS, D.; HALBROOK, H.; FAULK, W. P.: Tissue plasminogen activator in human cardiac allografts. *Transplantation*, 1993; 55(5):1056-60.
  22. KIMOTO, S.: Experimental and clinical studies on arterial homo and heterografts preserved in alcohol. *Arch. Surg.*, 1954; 69:549-53.

23. VIDAL, V.; MUNCUNILL, J.; BERNAT, R.; MAÑOSA, J.; DELGADO, R.; MOGA, L. I.: Carótidas de ternera en Cirugía Vascular Experimental. *Angiología*, 1992; 4:131-5.
24. DAVIES, A. H.; PARUMS, D. V.: Storage of donor long saphenous vein. *J. Cardiovasc. Surg.*, 1992; 33(1):92-7.
25. KESLER, K. A.; HERRING, M. B.; ARNOLD, M. P.; GLOVER, J. L.; PARK, H. M.; HELMUS, M. N.; BENDICK, P. J.: Enhanced strength of endothelial attachment on polyester elastomer and polytetrafluorethylene graft surfaces with fibronectin substrate. *J. Vasc. Surg.*, 1986; 3:58-64.
26. ZILLA, P.; FASOL, R.; PREIS, P., et al.: Use of fibrin glue as a substrate for in vitro endothelialization of PTFE vascular grafts. *Surgery*, 1989; 105:515-22.
27. EMERIK, S.; HERRING, M.; ARNOLD, M.; BAUGHMAN, S.; REILLY, K.; GLOVER, J.: Leukocyte depletion enhances cultured endothelial retention on vascular prostheses. *J. Vasc. Surg.*, 1987; 5:342-7.
28. VOHRA, R.; THOMPSON, G. L.; CARR, H. M.; SHARMA, H.; WELCH, M.; WALKER, M. G.: In vitro adherence and kinetics studies of adult human endothelial cell seeded polytetrafluorethylene and gelatin impregnated Dacron grafts. *Eur. J. Vasc. Surg.*, 1991; 5(1):93-103.
29. BELLÓN, J. M.; BUJÁN, J.; NAVLET, J.; GIANONATTI, M. C.; HERNANDO, A.; GARCÍA, N.; TURÉGANO, F.: Siembra de células endoteliales porcinas sobre un sustrato de politetrafluoroetileno (PTFE). Estudio experimental. *Angiología*, 1992; 3:95-101.
30. ETCHBERGER, K. J.; SHAREFKIN, J. B.; LALKA, S. G.; TAYLOR, M. W.: Detection of fibronectin on vascular flow surfaces by enzyme-linked immunosorbent assay. *Ann. Vasc. Surg.*, 1989; 3(2):118-22.
31. LALKA, S. G.; OELKER, L. M.; MALONE, J. M.; DUHAMEL, R. C.; KEVORKIAN, M. A.; RAPER, B. A.; NIXON, J. C.; ETCHBERGER, K. J.; DALSING, M. C.; CIKRIT D. F.; UNTHANK, J. L.; HERRING, M. B.: Acellular vascular matrix: a natural endothelial cell substrate. *Ann. Vasc. Surg.*, 1989; 3(2):108-17.
32. JARREL, B. E.; WILLIAMS, S. K.; ROSE, D. G.; PARK, P. K.; CARTER, T. L.: The use of endothelial cells for vascular grafts: will it ever be a clinical reality? In Veith FJ (ed): *Current critical problems in vascular surgery*. Vol 2. p. 21 Quality Medical Publishing. St. Louis MO, 1990.
33. SHARP, W. V.; SCHMITDT, S. P.; MEERBAUM, S. I. O.; RIPPERT, T. R.: Derivation of human microvascular endothelial cells for prosthetic vascular graft seeding. *Ann. Vasc. Surg.*, 1989; 3(2):104-107.
34. BELLON, J. M.; BUJAN, J.; HONDUVILLA N. G.<sup>a</sup>; MINGUELA, F.; HERNANDO, A.: Utilidad de las células mesoteliales obtenidas de epiplon humano para el recubrimiento de las prótesis vasculares de politetrafluoroetileno (PTFE). Estudio comparativo con células endoteliales de Vena Umbilical. *Angiología*, 1994; 2:44-48.
35. BEARN, P. E.; SEDDON, A. M.; MCCOLLUM, C. N.; MARSTON ABLOOMBSBURY.: Mesothelial seeding of knitted Dacron. *Br. J. Surg.*, 1993; 80(5):587-91.
36. STERPETTI, A. V.; HUNTER, W. J.; SCHULTZ, R. D.; SUGIMOTO, J. T.; BLAIR, E. A.; HACKER, K.; CHASAN, P.; VALENTINE, J.: Seeding with endothelial cells derived from the microvessels of the omentum and from the jugular vein: a comparative study. *J. Vasc. Surg.*, 1988; 7:677-84.
37. HERRING, M.; LEGRAND, D. R.: The histology of seeded PTFE grafts in humans. *Ann. Vasc. Surg.*, 1989; 3(2):96-103.
38. GRAHAM, L. M.; BURKEL, W. E.; FORD, J. W.; VINTER, D. W.; KAHN, R. H.; STANLEY, J. C.: Immediate seeding of enzymatically derived endothelium in Dacron vascular grafts. *Arch. Surg.*, 1980; 115:1289-94.
39. GRAHAM, L. M.; BURKEL, W. E.; FORD, J. W.; VINTER, D. W., KAHN, R. H.; STANLY, J. C.: Expanded polytetrafluoroethylene vascular prostheses seeded with enzymatically derived and cultured canine endothelial cells. *Surgery*, 1982; 91:500-9.
40. SICARD, G. A.; ALLEN, B. T.; LONG, J. A.; WELCH, M. J.; GRIFFIN, A.; CLARK, R. E.; ANDERSON, C. B.: Prostaglandin production and platelet reactivity

- of small-diameter grafts. *J. Vasc. Surg.*, 1984; 1:744-9.
41. JARREL, B. E.; WILLIAMS, S. K.; SOLOMON, L.; SPEICHER, L.; KOOLPE, E.; RADOMSKI, J.; GREENER, D.; CARABASI, R. A.; ROSATO, F. E.: Use of an endothelial monolayer on a vascular graft prior to implantation. Temporal dynamics and compatibility with the operating room. *Ann. Surg.*, 1986; 203:671-8.
  42. STERN, D. M.; BARK, Y.; NAWROTH, P. P.; CASSIMERIS, J.; KISIEL, W.; FENTON, J. W.; DINARELLO, C.; CHESS, L.; JAFFE, E. A.: Self regulation of procoagulant events on the endothelial cell surface. *J. Exp. Med.*, 1985; 162:1223-35.
  43. LIBBY, P.; BIRINYI, L. K.; CALLOW, A. D.: Functions of endothelial cells related to seeding of vascular prostheses: the unanswered questions. In: Herring M. B., Glover J. 8 eds. Endothelial seeding in vascular surgery. Orlando: Grune and Stratton. 1986; Pg 17-36.
  44. HERRING, M.; DILLEY, R.; CULLISON, T.; GARDNER, A.; GLOVER, J.: Seeding endothelium on canine arterial prostheses-the size of the inoculum. *J. Surg. Res.*, 1980; 28:35-8.
  45. WATKINS, M. T.; SHAREFKIN, J. B.; ZAJTCHUK, R.; MACIAG, T. M.; D'AMORE, P. A.; RYAN, U. S.; VAN WART, H.; RICH, N. M.: Adult human saphenous vein endothelial cells: Assessment of their reproductive capacity for use in endothelial seeding of vascular prostheses. *J. Surg. Res.*, 1984; 36:588-96.
  46. THIEDE, A.; ENGEMANN, R.; KORNER, H.; MULLER RUCHHOLTZ, W.: Comparison of immunologic reactions of arterial transplants in the arterial system and venous transplants in the venous system using inbred strains of rats. *Transplants. Proc.*, 1979; 11:603-6.
  47. FUJITANI, R. M.; BASSIOUNY, H. S.; GEWERTS, B. L.; GLAGOV, S.; ZARINS, C. K.: Cryopreserved saphenous vein allogenic homografts: an alternative conduit in lower extremity arterial reconstruction in infected fields. *J. Vasc. Surg.*, 1992; 15:519-26.
  48. OSCHNER, J. L.; LAWSON, J. D.; ESKIND, S. J.: Homologous veins as an arterial substitute: Long-term results. *J. Vasc. Surg.*, 1984; 1:306-13.
  49. SHOWALTER, D.; DURHAM, S.; SHEPPECK, R.: Cryopreserved venous homografts as vascular conduits in canine carotid arteries. *Surgery*, 1989; 106:625-9.
  50. KIRPATOVSKII, V. I.; BUROV, V. N.; KUDRIAVTSEV, LUV.: The use of cryopreserved arteries as arterial vascular prostheses. *Bull. Eksp. Biol. Med.*, 1992; 114(10):434 7.
  51. STIZMAN, J. V.; IBEMBO, A. L.; RICOTTA, J. J., et al.: Dymethyl-sulfoxide treated cryopreserved venous allografts in the arterial and venous system. *Surgery*, 1984; 95:154-9.
  52. WEBER, T. R.; LINDENAUER, J. M.; DEUT, T. L.: Long term patency of vein grafts preserved in liqued nitrogen in dimethyl sulfoxide. *Ann. Surg.*, 1976; 184:709-12.
  53. ELMORE, J. R.; GLOVICZKI, P.; BROCKBANK, K. G. M.; MILLER, V.: Cryopreservation effects endothelial and smooth muscle function of canine autogenous saphenous vein grafts. *J. Vasc. Surg.*, 1991; 13:584-92.
  54. TODD, I. A.; BOCTOR, Z. N.: Experimental homotransplantation of arteries. *Transplantation*, 1966; 4:123 30.
  55. SCHMITZ-RIXEN, T.; MEGERMAN, J.; COLVIN, R. B.: Immunosuppressive treatment of aortic allografts. *J. Vasc. Surg.*, 1988; 7:82-92.
  56. WILLIAMS G. M.; HAAR, A.; KRAJEWSKI, C.: Rejection and repair of endothelium in major vessel transplants. *Surgery*, 1975; 78:694-706.
  57. BOREN, C. H.; ROON, A. J.; MOORE, W. S.: Maintenance of viable arterial allografts by criopreservation. *Surgery*, 1978; 83:382-91.
  58. SCHMEHL, M. K.; BANK, H. L.; BROCKBANK, K. G.: Effects of antibiotics on the endothelium of fresh and cryopreserved canine saphenous veins. *Cryobiology*. 1993; 30(2):164-71.
  59. ARMAND, M. K.; SHLAFFER, M.: Ultrastructure function correlative studies for cardiac cryopre-



- ervation. I.V., Pre thaw ultrastructure of myocardium cooled slowly rapidly with or without DMSO. *Cryobiology*, 1975; 12:130-7.
60. COLLINS, P.; WILKIE, M.; RAZAK, K.; ABBOT, S.; HARLEY, S.; BAX, C.; ZAIDI, M.; BLAKE, D.; CUNNINGHAM, J.: Cyclosporine and cremaphor modulate von Willebrand factor release from cultured human endothelial cells. *Transplantation*, 1993; 56(5). P. 1218-23.
61. ATKINSON, J. B.; WUDEL, J. H.; HOFF, S. J.; STEWART, J. R.; FRIST, W. H.: Amlodipine reduces graft coronary artery disease in rat heterotopic cardiac allografts. *J. Heart Lung Transplant.*, 1993; 12(6):1036-43.
62. ASSELMEIER, M. A.; CASPARI, R. B.: A review of allograft processing and sterilization techniques and their role in transmission of the human immunodeficiency virus. *Am. J. Sports Med.*, 1993; 21(2):170-5.