

Ingeniería de tejidos: aplicaciones en el diseño de implantes cardiovasculares

Recibido el 4 de octubre de 2007

RAFFAELLA PAGANI^{1*}, M. CONCEPCIÓN SERRANO¹, JUAN V. COMAS², GRACIÁN TRIVIÑO³ Y M. TERESA PORTOLÉS¹

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid, España. ²Instituto Pediátrico del Corazón, Hospital Universitario «12 de Octubre», Madrid, 28040-Madrid, España.

³Departamento de Tecnología Fotónica, Universidad Politécnica de Madrid, 28710-Madrid; European Centre for Soft Computing, Edificio Científico-Tecnológico, 33600-Mieres, Asturias, España.

RESUMEN

El desarrollo de implantes biodegradables para Cirugía Cardiovascular mediante Ingeniería de tejidos es una de las áreas actualmente más prometedoras dentro de la investigación Biomédica para reparar patologías cardiovasculares congénitas

* Correspondencia:

Dra. Raffaella Pagani,

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Químicas, Ciudad Universitaria s/n, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid, España.

e-mail: rpaganib@quim.ucm.es

Abreviaturas: ePTFE, Politetrafluoroetileno expandido (*Teflon*); PET, Tereftalato de polietileno (*Dacron*); PGA, Ácido poliglicólico; PLA, Ácido poliláctico; PCL, Poli(ϵ -caprolactona); T_m , Temperatura de fusión; T_g , Temperatura de transición vítrea; NaOH, Hidróxido sódico; SFM, Microscopía de fuerza de barrido; PCL-NaOH, Láminas de PCL tratadas con NaOH 2N durante 2 horas; SEM, Microscopía electrónica de barrido; MTT, Tetrametil tetrazolio; EC, Células endoteliales; SMC, Células de músculo liso vascular; ROS, Especies reactivas de oxígeno; ATP, Adenosín trifosfato; $\Delta\psi_m$, Potencial de membrana mitocondrial; ΔpH , Gradiente de protones; HUVEC, Células endoteliales derivadas de vena umbilical humana; EPC, Células progenitoras de endotelio.

o adquiridas en pacientes neonatos y adultos. Estos implantes deberán estar formados por un material biodegradable adecuado recubierto de células cultivadas que permitan una sustitución progresiva y completa del tejido dañado. El diseño y la obtención de implantes biodegradables funcionales requiere una aproximación multidisciplinar y una investigación coordinada en las áreas de Cirugía Cardiovascular, Biomateriales, Bioquímica, Biología Celular y Bioingeniería.

Los grupos de investigación Biomédica de las Universidades Complutense (UCM), Rey Juan Carlos (URJC), Politécnica (UPM) y el Instituto Pediátrico del Corazón (IPC) - Cirugía Cardíaca Infantil del Hospital Universitario «12 de Octubre» de Madrid, desarrollan un proyecto coordinado y multidisciplinar para la obtención de implantes biodegradables autólogos y no trombogénicos, mediante técnicas de Ingeniería de tejidos, que puedan cumplir todas las características requeridas desde el punto de vista de adecuación del soporte, funcionalidad bioquímica y resistencia mecánica a las técnicas quirúrgicas habituales y que presenten una capacidad de crecimiento acorde con el desarrollo del paciente, evitando las reoperaciones que se requieren en la actualidad al utilizar prótesis artificiales.

El biopolímero poli(ϵ -caprolactona) (PCL), modificado para mejorar la adhesión y proliferación celular, se ha seleccionado como soporte para el cultivo de distintas poblaciones celulares (endotelio, músculo liso vascular, HUVEC y células mesenquimales) realizándose estudios de biocompatibilidad, biofuncionalidad *in vitro* y pruebas de resistencia mecánica para comprobar la viabilidad de los bioimplantes.

Palabras clave: biocompatibilidad, biomaterial, cultivos celulares, bioingeniería, cardiocirugía.

ABSTRACT

Tissue engineering: designing cardiovascular grafts

The development of biodegradable grafts for Cardiovascular Surgery by Tissue Engineering techniques is at present a promising research field in Biomedical research for repairing both congenital and acquired cardiovascular diseases in neonatal and adult patients. These grafts should be constituted by a suitable biodegradable material covered with cultured cells that allows a progressive and complete substitution of the damaged tissue. The design and preparation of functional biodegradable grafts requires a multidisciplinary approach and a coordinated research in Cardiovascular Surgery, Biomaterials, Biochemistry, Cell Biology and Bioengineering fields. The biomedical research groups of the Universidad Complutense (UCM), Rey Juan Carlos (URJC), Politécnica (UPM) and the Instituto Pediátrico del Corazón (IPC) – Cirugía Cardíaca Infantil of the Hospital Universitario «12 de Octubre» de Madrid, develop a multidisciplinary coordinated project for obtaining autologue, non trombogenic and biodegradable grafts, by Tissue Engineering techniques, that fulfill specific characteristics, from the point of view of scaffold's adequacy, biochemical function and mechanical resistance to the usual surgical techniques with growth capacity in agreement with the patient develop-

ment avoiding the successive operations that are necessary nowadays when artificial prosthesis are used.

The biopolymer poli(ϵ -caprolactona) (PCL), modified to improve the cell adhesion and proliferation, has been selected as scaffold for culturing different cells (endothelial, vascular smooth muscle, HUVEC and mesenchymal cells) carrying out *in vitro* biocompatibility, biofunctionality studies and mechanical assays to evaluate the grafts' viability.

Key words: biocompatibility, biomaterial, cell culture, bioengineering, cardio-surgery.

INTRODUCCIÓN

Las **enfermedades cardiovasculares** causan la muerte de cerca de 17 millones de personas al año, casi la tercera parte de la totalidad de las defunciones en el mundo, estimándose que el número de fallecimientos por estas causas ascenderá a 20 millones en el año 2020. En este contexto, la Cirugía Cardiovascular Pediátrica adquiere especial relevancia, dada la incidencia que las patologías cardiovasculares congénitas alcanzan entre la población neonatal e infantil. Según datos de la Sociedad Española de Cirugía Cardiovascular, en España nacen aproximadamente 5.000 niños al año con algún tipo de cardiopatía (1). Aunque en la mayoría de los casos se trata de dolencias leves que desaparecen con el tiempo, un porcentaje importante de los enfermos deben ser operados con urgencia porque su vida se encuentra gravemente comprometida. La estenosis pulmonar o aórtica, la comunicación interventricular o interauricular y la tetralogía de Fallot se encuentran entre las cardiopatías de mayor incidencia.

Así pues, la creciente prevalencia de las patologías cardiovasculares en los países industrializados ha incrementado la necesidad clínica de sustitutos apropiados que reemplacen el tejido vascular dañado. Este hecho ha obligado a buscar soluciones alternativas en el campo de la **Ingeniería de tejidos**, más allá de los implantes autólogos, heterólogos y sintéticos, convirtiéndose en los últimos años en una disciplina de futuro prometedor capaz de desarrollar sistemas que puedan ser utilizados para reemplazar vasos sanguíneos alterados (2). Este área multidisciplinar, de reciente desarrollo, incorpora los principios de la Ingeniería y la Química de polímeros

a las Ciencias de la vida con el propósito de desarrollar sustitutos biológicos de tejidos y órganos dañados (3). El principio básico de este novedoso campo de investigación radica en el aislamiento de células de un organismo donante, su cultivo sobre soportes de naturaleza polimérica y su posterior implantación en el receptor (Figura 1). Los implantes desarrollados mediante estas técnicas deben conservar la capacidad de crecimiento, reparación y remodelación dentro del paciente (4), con el propósito de restaurar, mantener y/o mejorar la función del tejido u órgano dañado (5). En este contexto surge el concepto de **biomaterial**, que incluye todos aquellos materiales biológicos o sintéticos que se emplean como parte de un dispositivo médico y que interactúan con sistemas biológicos (6). Para satisfacer las necesidades que plantea este nuevo campo de la Biomedicina, en las últimas décadas se han desarrollado materiales que reúnen una gran variedad de propiedades físicas, químicas y mecánicas en función de la aplicación perseguida. Estas características específicas serán en gran medida las responsables del éxito de un implante.

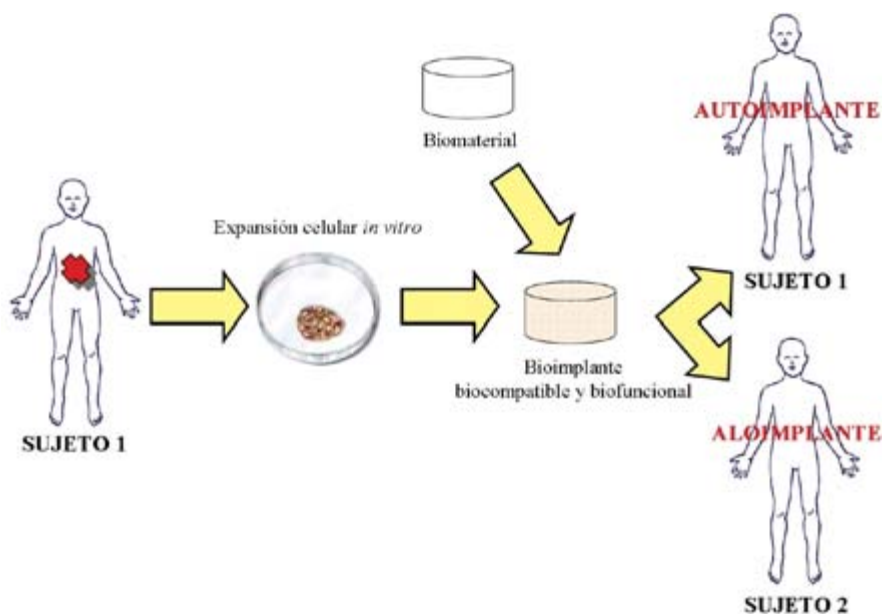


FIGURA 1. *Fundamento de las técnicas de Ingeniería de tejidos.*

INGENIERÍA DE TEJIDOS VASCULAR: APROXIMACIÓN HISTÓRICA Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

La obtención de un **implante vascular biodegradable** mediante la utilización de técnicas de Ingeniería de tejidos requiere la selección de un material biocompatible adecuado y el cultivo de tipos celulares específicos sobre dicho soporte, con el propósito de reproducir las características del tejido vascular (biomimetismo) (Figura 2). El uso de poblaciones celulares derivadas de tejidos del receptor posibilita el desarrollo de un implante autólogo y reduce las complicaciones derivadas del rechazo inmunológico del injerto. De esta manera, se hace posible la sustitución progresiva del tejido original dañado a expensas del crecimiento en paralelo del propio tejido del paciente.

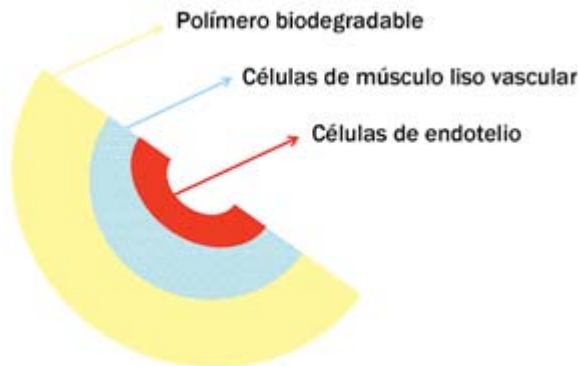


FIGURA 2. *Esquema de un implante vascular biodegradable y biomimético.*

En 1912, Carrel fue el primero en describir el uso de tubos de vidrio o metal para corregir defectos arteriales en perros mediante técnicas de bypass (7). Sin embargo, no fue hasta principios de la década de los cincuenta cuando el primer material sintético para el reemplazo de arterias, denominado *Vinyon N*, fue introducido en clínica (8). A partir de entonces, diferentes tipos de polímeros, preferentemente derivados de etileno, han sido utilizados como sustitutos de arterias humanas. El tratamiento de patologías vasculares que afectan a arterias de gran calibre ha sido abordado con éxito me-

diante la utilización de implantes sintéticos constituidos por politetrafluoroetileno expandido (ePTFE, *Teflon*) y tereftalato de polietileno (PET, *Dacron*). Sin embargo, estos materiales han demostrado ser trombogénicos y, por lo tanto, inadecuados como sustitutos de vasos sanguíneos de pequeño calibre (diámetro interno inferior a 6 mm) (2). A pesar de los numerosos avances realizados, ninguno de los implantes sintéticos desarrollados hasta el momento ha conseguido superar el resultado obtenido con los vasos sanguíneos autólogos. Las principales razones que se han postulado como responsables de este bajo rendimiento de los implantes artificiales han sido la falta de recubrimiento endotelial y su incapacidad para reproducir las propiedades mecánicas de los vasos nativos. En la Tabla 1 se recogen los principales tipos de sustitutos vasculares disponibles en la actualidad, así como el estado de las investigaciones y la aplicación clínica para cada uno de ellos (9).

TABLA 1. **Tipos de implantes vasculares.** Estado actual de investigación y uso.

<i>Tipo de implante</i>	<i>Fase experimental</i>	<i>Fase clínica</i>	<i>Aplicación de rutina</i>
Vena autóloga	✓	✓	✓
Arteria radial	✓	✓	✓
Arteria mamaria interna	✓	✓	✓
Arteria gastro-epiploica	✓	✓	✓
ePTFE	✓	✓	✓
Dacron	✓	✓	✓
Implante de poliuretano	✓	✓	Uso inminente
Ingeniería de tejidos			
Polímeros con células	✓	✓	—
Implante completo	✓	—	—

Los primeros logros en el desarrollo de vasos sanguíneos mediante técnicas de Ingeniería de tejidos fueron llevados a cabo por Weinberg y Bell en 1986 (10), quienes obtuvieron un modelo de arteria a partir de células endoteliales, musculares y fibroblásticas bovinas crecidas sobre una malla de Dacron impregnada de colágeno. En 1998, L'Heureux y colaboradores diseñaron un vaso sanguíneo completo, constituido también por endotelio, músculo liso y fibroblastos,

basándose exclusivamente en el uso de células humanas cultivadas *in vitro* (11). Un año más tarde, el grupo de investigación de la doctora Niklason (1999) consiguió desarrollar arterias bovinas a partir de células endoteliales y células de músculo liso cultivadas sobre soportes de ácido poliglicólico (PGA) en biorreactores de flujo pulsátil (12). Sin embargo, y a pesar de los resultados obtenidos, la fabricación de un implante vascular adecuado de superficie hemo-compatible sigue suponiendo en la actualidad un importante desafío para la comunidad científica.

En este contexto se inicia en 2002, un proyecto multidisciplinar y coordinado entre el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I (Universidad Complutense de Madrid, UCM), el Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica (UCM), el Departamento de Ciencias de la Salud (Universidad Rey Juan Carlos), el Departamento de Tecnología Fotónica (Universidad Politécnica de Madrid) y el Instituto Pediátrico del Corazón (Hospital Universitario «12 de Octubre»), con el objetivo de llevar a cabo los estudios necesarios para la preparación de implantes biodegradables con aplicación en cirugía pediátrica reparadora.

LA POLI(ϵ -CAPROLACTONA) COMO BIOMATERIAL

Una de las líneas de aproximación al desarrollo de implantes mediante técnicas de Ingeniería de tejidos incluye la utilización de **materiales naturales**, tales como colágeno, hidroxiapatita o alginato. En muchos casos se trata de constituyentes biológicos de la matriz extracelular con propiedades interactivas naturales, lo que reduce en gran medida las posibilidades de rechazo del implante. Como contrapartida, estos materiales carecen con frecuencia de las propiedades mecánicas adecuadas o presentan un tiempo de degradación no acorde con su aplicación (13).

Sin embargo, en los últimos años gran parte de las investigaciones se han centrado en el desarrollo de una amplia variedad de **materiales sintéticos**, degradables o no, con el propósito de satisfacer las necesidades que los soportes naturales no pueden cubrir. Se trata, en general, de polímeros muy versátiles que permiten el conformado de soportes en distintas formas y tamaños y cuyas pro-

propiedades químicas y mecánicas pueden ser, en gran medida, controladas y manipuladas. La elección de polímeros que sean o no biodegradables depende de la aplicación perseguida para el implante, ya sea una sustitución temporal o un reemplazo permanente del tejido dañado, respectivamente. Los **polímeros biodegradables**, debido a sus especiales características físico-químicas y biológicas, permiten que sólo el tejido natural reparado permanezca después de la degradación y la reabsorción del polímero (13). Dentro de los polímeros biodegradables más utilizados en la actualidad se encuentran los homopolímeros y copolímeros basados en ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA) y policaprolactona (PCL).

Con el propósito de diseñar un implante vascular biodegradable, nuestro grupo de investigación seleccionó la **poli(ε-caprolactona)** (PCL) como biomaterial soporte. La PCL es un poliéster alifático ($-\text{[CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{]}_n-$) cuyos polímeros, semicristalinos y biodegradables, presentan una temperatura de fusión (T_m) comprendida entre 59-64°C, dependiendo de su contenido cristalino, y una temperatura de transición vítrea (T_g) definida en torno a los -60°C, alcanzando textura de goma a temperatura ambiente (14). Sus propiedades físico-químicas le confieren una degradación más lenta que la de otros miembros de la familia de los poliésteres alifáticos. Sin embargo, su capacidad para formar mezclas compatibles (15, 16) y copolímeros con una amplia variedad de moléculas (17, 18) ha ampliado en gran medida su campo de aplicación. La PCL ha sido estudiada como material útil para el recubrimiento de heridas desde la década de los años setenta (19). En la actualidad, es ampliamente utilizada como material biodegradable para Ingeniería de tejidos blandos y duros (19-21).

La baja **hidrofilicidad** de la superficie de los polímeros de PCL ha dirigido gran parte de las investigaciones en este campo hacia la mejora de sus características físico-químicas. El tratamiento con hidróxido sódico se ha convertido en los últimos años en uno de los métodos de elección para la mejora de las propiedades de los polímeros de PCL debido al marcado beneficio que induce en la hidrofilicidad de la superficie, siendo, además, un método de muy sencilla aplicación (22). Con este objetivo, se han llevado a cabo modificaciones de la superficie del polímero inducidas por tratamiento con hidróxido sódico (23). Para ello, las láminas de PCL se han mantenido

sumergidas en una solución de NaOH 2N durante distintos tiempos (de 30 minutos a 24 horas), evaluando posteriormente la rugosidad y el grado de hidrofiliicidad de la superficie de las mismas. La Figura 3 incluye imágenes de microscopía de fuerza de barrido (SFM) de las láminas de PCL no tratadas (Figura 3A) y después del tratamiento con NaOH 2N durante 2 horas (PCL-NaOH) (Figura 3B). En la Figura 3C se observa la variación del ángulo de contacto con el tiempo de tratamiento. Los resultados muestran un incremento significativo en la rugosidad de la superficie sólo después de tratamientos de 24 horas, mientras que los estudios del ángulo de contacto revelan un aumento del grado de hidrofiliicidad a las dos horas de tratamiento. En consecuencia, las láminas PCL-NaOH han sido seleccionadas, dentro de este estudio, como soporte biodegradable más adecuado para el desarrollo de los implantes vasculares.

BIOCOMPATIBILIDAD DEL POLÍMERO

Una de las características esenciales que deben presentar los materiales potencialmente útiles en el campo de la Ingeniería de tejidos es su **biocompatibilidad**, inicialmente definida como «*la cualidad de no inducir efectos tóxicos o dañinos sobre sistemas biológicos*» (24), facilitando así la adaptación del implante al entorno biológico en el que será incluido. El estudio de la biocompatibilidad de un material debe englobar tanto la evaluación de los efectos del entorno fisiológico sobre el material como los que el propio material pueda inducir en dicho ambiente (25).

La evaluación de la **citotoxicidad** *in vitro* es el paso inicial en los estudios de biocompatibilidad, y normalmente se lleva a cabo con líneas celulares establecidas (25), como los fibroblastos murinos L929. Con esta línea de referencia se ha evaluado la biocompatibilidad de las láminas de PCL mediante el estudio de parámetros que describen la colonización celular del biomaterial (adhesión y proliferación), el mantenimiento de la morfología de las células sobre su superficie y la conservación de su funcionalidad (actividad mitocondrial e integridad de la membrana plasmática) (26). Los resultados obtenidos proporcionan evidencias de una adecuada adhesión y proliferación sobre las láminas de PCL, así como del mantenimiento de

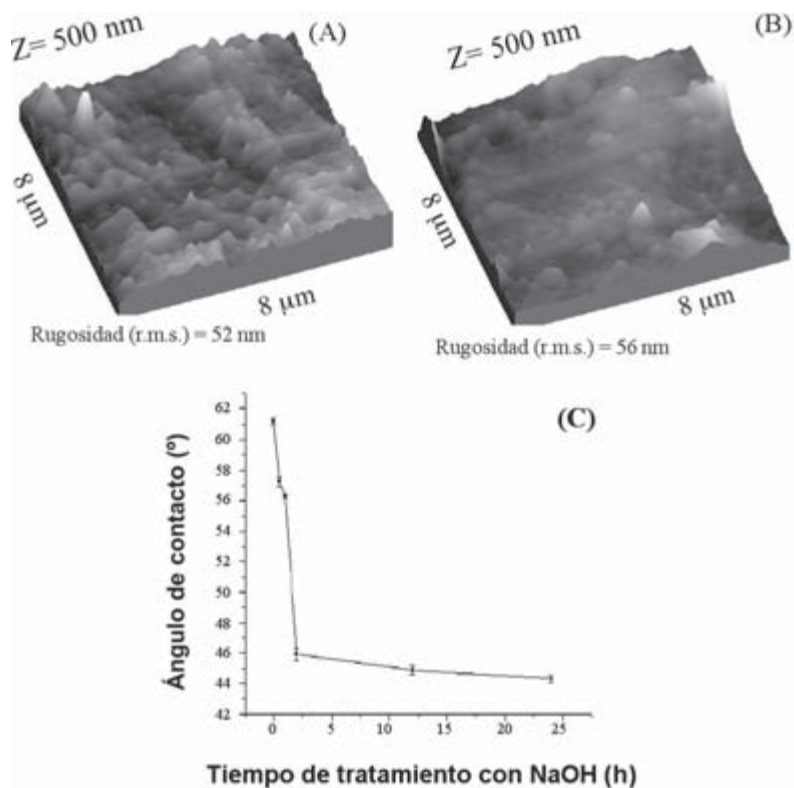


FIGURA 3. *Caracterización por microscopía de fuerza de barrido (SFM) de láminas de poli(e-caprolactona): no tratadas (A) y tratadas con NaOH 2M durante 2h (B). Variación del ángulo de contacto con el tiempo de tratamiento con NaOH 2M (C). Los datos se expresan como media \pm desviación estándar.*

la integridad de la membrana plasmática. Por otro lado, las células en cultivo sobre el biomaterial mantienen la morfología característica de los fibroblastos, tal y como revelan los estudios de microscopía electrónica de barrido (SEM) (Figura 4). No obstante, el polímero induce una estimulación transitoria pero significativa de la actividad mitocondrial, evaluada como reducción del reactivo MTT (Figura 5). La adecuada respuesta de los fibroblastos en cultivo sobre el biomaterial permite determinar la posible utilización de la PCL para el desarrollo de implantes vasculares con tipos celulares de origen vascular, es decir, células endoteliales y células de músculo liso.

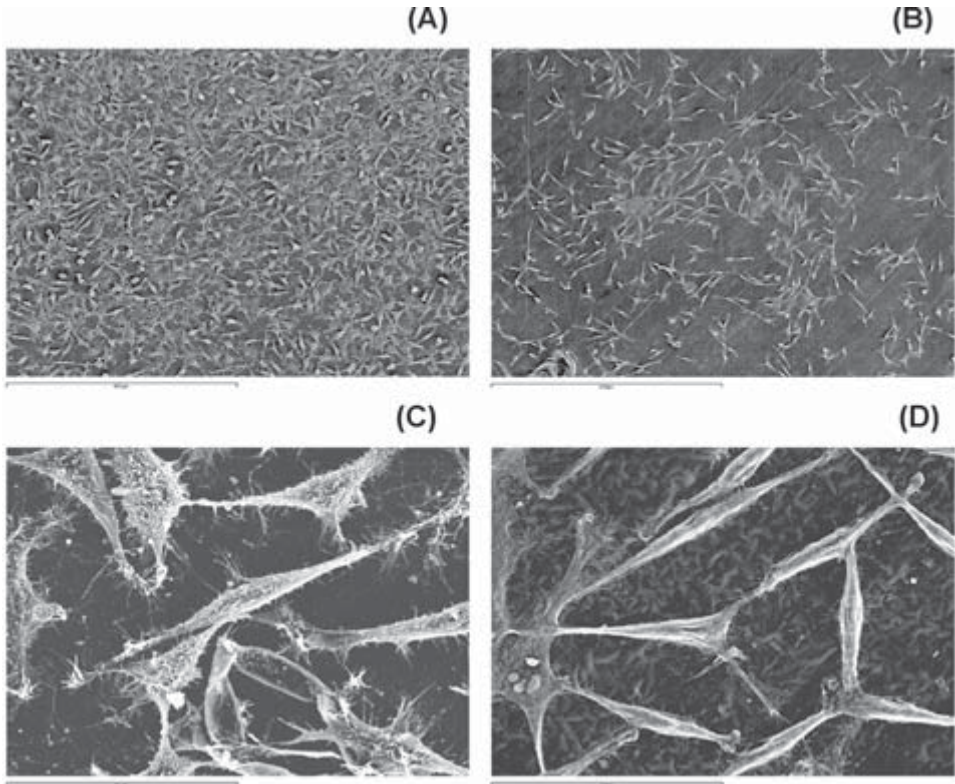


FIGURA 4. *Caracterización morfológica de fibroblastos L929 en cultivo sobre TCP (A, C) y láminas de poli(ε-caprolactona) (B, D) mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Magnificación: 100x (A, B), 1000x (C, D).*

Los procesos de **adhesión** y **proliferación** celular sobre un polímero dependen en gran medida de las características de superficie del material, tales como el grado de hidrofiliicidad, la carga, la energía libre de superficie y la topografía. La importancia de las propiedades de superficie radica en la influencia que éstas ejercen en la composición y la conformación de la capa de proteínas adsorbida al material (27). Las superficies moderadamente hidrofílicas, que permiten la adsorción de proteínas séricas mediante enlaces débiles y reversibles, favorecen la adhesión celular (28). Además, las células pueden depositar sus propias proteínas de adhesión, siendo posible un rápido intercambio con las proteínas séricas previamente adsor-

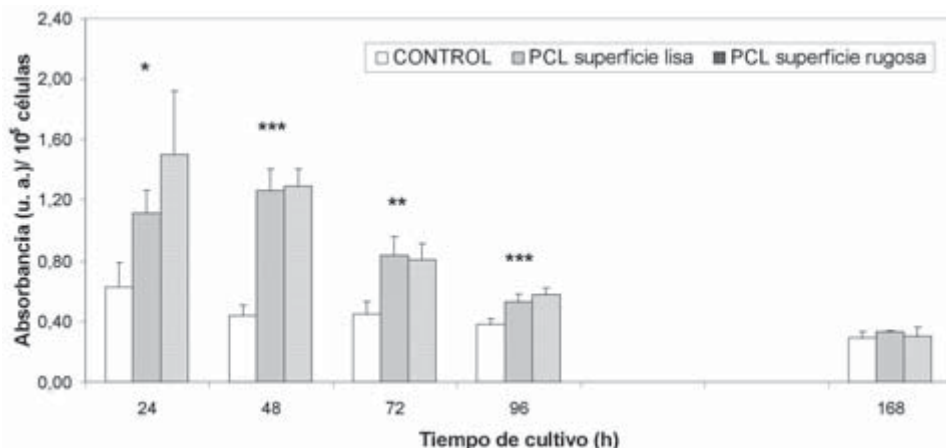


FIGURA 5. *Actividad mitocondrial de fibroblastos L929 en cultivo sobre láminas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL). Los datos del ensayo de MTT están referidos al número de células y se expresan como media \pm desviación estándar. Significación estadística: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,005$.*

bidas. También se ha descrito que ciertas propiedades químicas del polímero, tales como la presencia de grupos carboxílicos o hidroxílicos, pueden ejercer una influencia significativa en los mecanismos de adhesión y crecimiento dependiente del tipo celular (25). La influencia que la **topografía** de la superficie del polímero ejerce sobre el comportamiento celular sigue siendo un parámetro ampliamente discutido. En este sentido, estudios realizados con fibroblastos L929 cultivados sobre láminas de PCL de distinta rugosidad (láminas lisas con una rugosidad media de 37 nm y láminas rugosas, de 62 nm) no han revelado diferencias significativas en el crecimiento celular sobre el polímero (26).

Por otro lado, aspectos celulares como la morfología, la proliferación y la diferenciación también pueden verse influidos significativamente por las **propiedades mecánicas** del soporte (29). Por este motivo, un implante ideal debería reunir las propiedades mecánicas adecuadas con el fin de mimetizar aquellas que presenta el tejido al que pretende reemplazar, siendo necesario que su integridad estructural se mantenga hasta que el nuevo tejido se haya formado. Dependiendo de las aplicaciones perseguidas, propiedades como la elasticidad, la resistencia a la rotura o la fatiga adquirirán mayor o menor

relevancia, siendo especialmente importantes en el caso concreto de los implantes vasculares.

Con el propósito de evaluar las propiedades mecánicas de las láminas de PCL nuestro grupo de investigación ha diseñado un aparato de medida específico a través del cual se obtienen, de manera precisa, las curvas de presión-deformación características del comportamiento mecánico del material (30). La Figura 6 muestra el esquema del aparato de medida, que consta de un controlador electrónico que permite aplicar presiones uniformes y omnidireccionales progresivamente crecientes sobre la lámina completa, que es anclada uniformemente al aparato y sumergida en medio líquido. Las curvas obtenidas con las láminas de PCL revelan la capacidad de estas membranas para soportar presiones comprendidas dentro del rango fisiológico, así como una influencia significativa del espesor de la membrana (Figura 7A) y del tiempo de tratamiento con hidróxido sódico (Figura 7B) en el comportamiento mecánico de las láminas.

COMPONENTES CELULARES DE ORIGEN VASCULAR

La Ingeniería de tejidos fue desarrollada originalmente como una aproximación al trasplante celular selectivo, que permite la inoculación de tipos celulares específicos en las áreas tisulares en las que son requeridos (13). Sea cual fuere el origen de las células, las características ideales que deben reunir se resumen en: fácil accesibi-

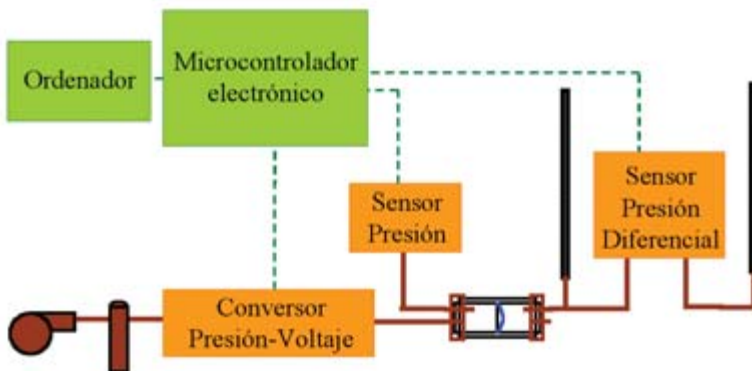


FIGURA 6. *Instrumento de medida de las propiedades mecánicas. En el esquema se incluyen los distintos componentes del sistema.*

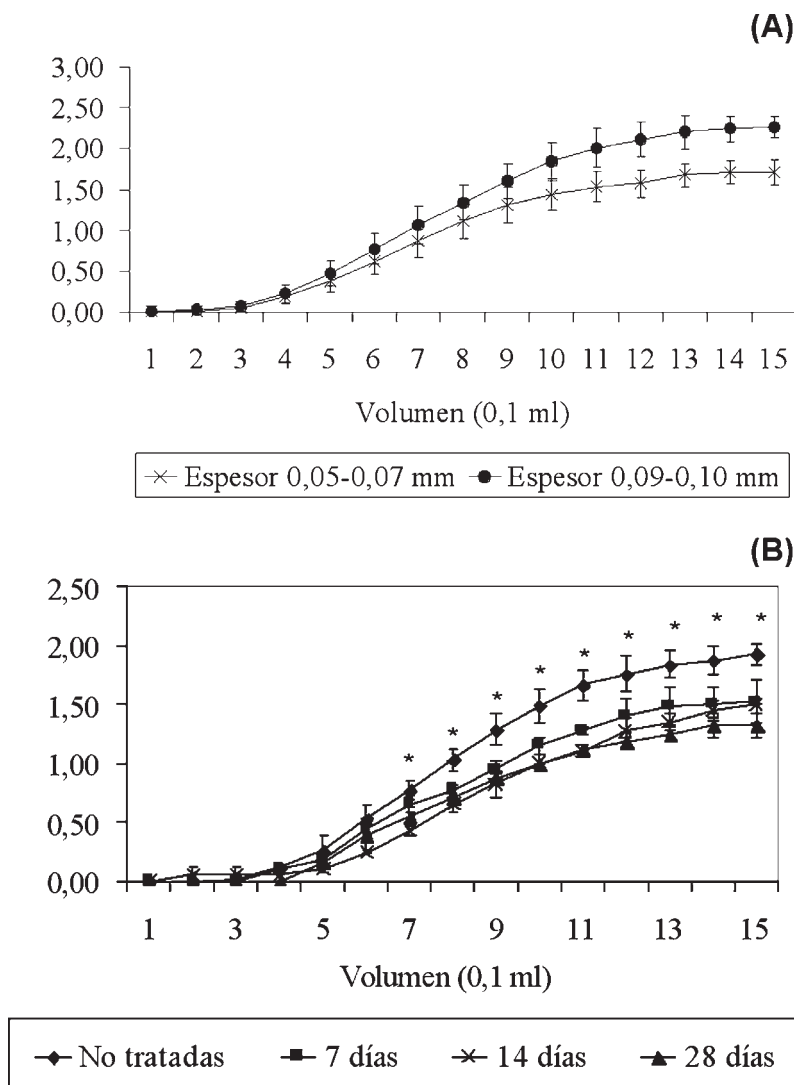


FIGURA 7. *Curvas de presión-deformación de las láminas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL). Efecto del espesor de las membranas (A) y del tiempo de tratamiento con NaOH 2M (B). Los datos se expresan como media \pm desviación estándar. Significación estadística: * $p < 0,05$.*

lidad; potencialidad para diferenciarse o transdiferenciarse en una amplia variedad de células organo-específicas con funciones especia-

lizadas; alta tasa proliferativa *in vitro*, pero sin mutagenicidad durante su crecimiento *in vivo*, y la aceptación por parte del sistema inmune del receptor sin necesidad de terapias inmunosupresoras (13).

La gran diferencia en rendimiento descrita para los implantes autólogos de venas y los implantes sintéticos ha sido atribuida en gran medida a la presencia o ausencia, respectivamente, de un recubrimiento de células endoteliales (7). En la Tabla 2 se recogen los resultados de algunos de los más destacados estudios llevados a cabo *in vivo* con la finalidad de reemplazar vasos sanguíneos dañados o alterados (9). La búsqueda de soluciones para solventar las limitaciones encontradas en este campo ha llevado a la utilización de las **células endoteliales** (EC) como recubrimiento biológico y funcional de la cara luminal del soporte antes de su implante (31, 32).

TABLA 2. *Resultados de los principales ensayos clínicos llevados a cabo con implantes vasculares de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) con recubrimiento endotelial en las últimas décadas.*

<i>Autores</i>	<i>Uso</i>	<i>Tipo de EC</i>	<i>Implantes</i>	<i>Eficacia</i>
<i>Meinhart et al., 2001</i>	<i>PVBG</i>	<i>Vena</i>	<i>153</i>	<i>84% a 4 años</i>
<i>Laube et al., 2000</i>	<i>CABG</i>	<i>Vena</i>	<i>14</i>	<i>91% a 2.5 años</i>
<i>Deutsch et al., 1999</i>	<i>PVBG</i>	<i>Vena</i>	<i>113</i>	<i>65% a 9 años</i>
<i>Williams, 1999</i>	<i>PVBG</i>	<i>Grasa</i>	<i>11</i>	<i>60% a 4 años</i>
<i>Leseche et al., 1995</i>	<i>PVBG</i>	<i>Vena</i>	<i>21</i>	<i>67% a 6.3 años</i>
<i>Herring et al., 1994</i>	<i>PVBG</i>	<i>Vena</i>	<i>66</i>	<i>38% a 2.5 años</i>
<i>Meerbaum et al., 1990</i>	<i>PVBG</i>	<i>Grasa</i>	<i>34</i>	<i>42% a 2.5 años</i>

CABG: Bypass coronario; PVBG: Bypass vascular periférico (Vara et al., 2005).

En condiciones fisiológicas, las células endoteliales tienen una función antitrombogénica, sirven como superficie anticoagulante y desempeñan un destacado papel protector frente a la hiperplasia de la capa íntima vascular (7). Las células endoteliales desempeñan, además, un papel esencial en el proceso de angiogénesis, a través del cual se consigue el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a expensas de estructuras vasculares existentes. Conviene también destacar que las interacciones entre células de endotelio y de músculo liso juegan un papel primordial en el funcionamiento de la pared vascu-

lar, participando en el control de aspectos tan importantes como el diámetro del vaso, la proliferación de las **células musculares** o el fenotipo celular (33). Esta comunicación, vía puentes mioendoteliales, convierte a ambos tipos celulares en componentes esenciales de un implante vascular.

Con el propósito de desarrollar un implante vascular biodegradable y minimizar las complicaciones anteriormente descritas, se ha procedido a cultivar células endoteliales y células de músculo liso (SMC) de origen vascular sobre láminas de PCL, tratadas o no con hidróxido sódico (23). Ambos tipos celulares crecen adecuadamente sobre el biomaterial (Figura 8), confirmando además que el trata-

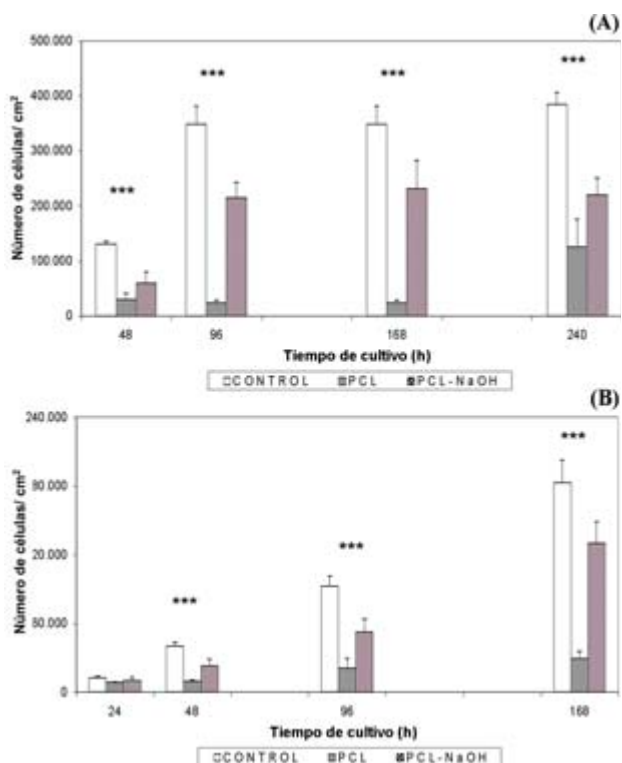


FIGURA 8. *Proliferación de las células endoteliales (A) y las células de músculo liso (B) sobre las láminas de poli(ϵ -caprolactona) sin tratamiento (PCL) o tratadas con NaOH 2 M (PCL-NaOH). El plástico de cultivo (TCP) se ha utilizado como superficie control. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar. Significación estadística: *** $p < 0,005$.*

miento con NaOH mejora de forma significativa la adhesión y la proliferación de los dos tipos celulares. Las células EC y SMC en cultivo sobre PCL conservan su morfología característica (Figura 9) y la viabilidad celular tampoco se ve afectada por el cultivo sobre el polímero. No obstante, y coincidiendo con los resultados obtenidos con fibroblastos L929, en ambos tipos celulares se ha encontrado un ligero aumento de la actividad mitocondrial a tiempos cortos de cultivo, aspecto que requiere un estudio más detallado.

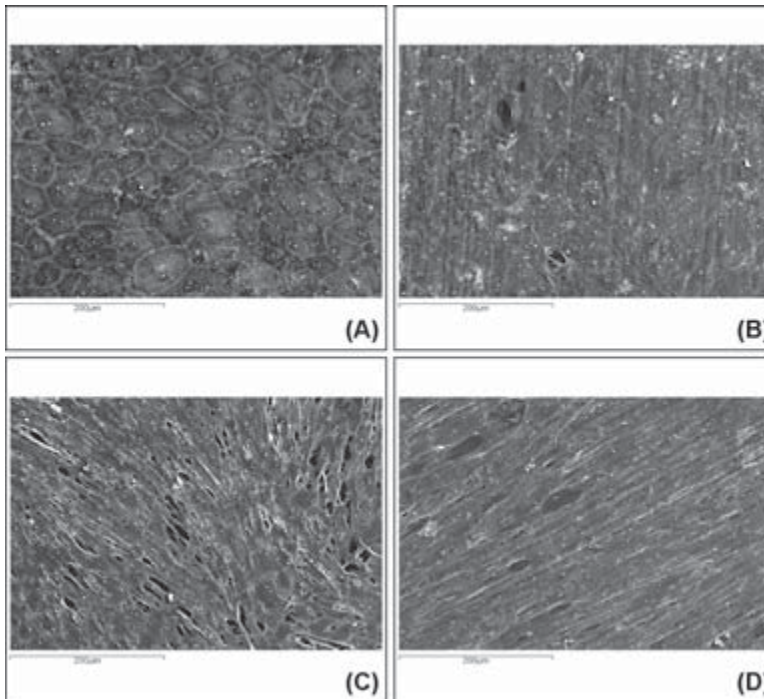


FIGURA 9. *Caracterización morfológica de células endoteliales (B) y células de músculo liso (D) en cultivo sobre láminas de poli(ε-caprolactona) (PCL) mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Las células fueron cultivadas sobre cristal como superficie control (A, C). Magnificación: 250x.*

ESTRÉS OXIDATIVO

Entre los parámetros asociados a la viabilidad celular sobre los biomateriales, el estrés oxidativo puede considerarse como uno de los más sensibles. El estrés oxidativo se produce como consecuencia

de un desequilibrio creado por la exposición a agentes oxidantes que alteran el estado redox de los principales sistemas antioxidantes celulares.

Cuando el metabolismo celular se ve comprometido, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) puede ser estimulada, especialmente a nivel mitocondrial. Las ROS incluyen moléculas como el oxígeno singlete o el peróxido de hidrógeno, así como los radicales libres de oxígeno anión superóxido y radical hidroxilo. Estas moléculas, altamente reactivas, son capaces de oxidar los componentes celulares (principalmente proteínas, lípidos y ácidos nucleicos), induciendo modificaciones que pueden comprometer su funcionalidad. Sin embargo, estas moléculas también participan en importantes funciones fisiológicas. El peróxido de hidrógeno, por ejemplo, desempeña un destacado papel como segundo mensajero en las rutas de señalización celular (34). Recientemente, se han encontrado importantes evidencias que indican la participación de estas moléculas en los procesos de apoptosis (35, 36). En condiciones metabólicas normales, las ROS son inactivadas a través de los sistemas antioxidantes celulares, entre los que destacan el glutatión, la superóxido dismutasa y la catalasa, sistemas de distribución ubicua en las células eucariotas.

Las mitocondrias son los orgánulos encargados de la síntesis de ATP mediante el acoplamiento del proceso de fosforilación oxidativa a la cadena respiratoria. Este acoplamiento requiere la existencia de un potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) y un gradiente de protones (ΔpH) generado por la cadena de transporte de electrones. De esta manera, un incremento en la formación de radicales a nivel mitocondrial podría desestabilizar el potencial de membrana mitocondrial y alterar, en consecuencia, la función mitocondrial, comprometiendo el metabolismo energético y desencadenando procesos de apoptosis (37). El colapso del potencial de la membrana mitocondrial interna está asociado con la liberación de proteínas apoptóticas (38) y con la aparición de la fracción celular subG₁ en los perfiles de ciclo celular, característica de células apoptóticas.

Con estos antecedentes, es importante analizar en profundidad si la estimulación transitoria de la función mitocondrial, detectada tanto en fibroblastos como en células vasculares primarias cultivadas sobre láminas de PCL, está relacionada con un desequilibrio

redox celular. Estos estudios se han realizado inicialmente en fibroblastos L929, dado que han sido ampliamente utilizados en la bibliografía como sistema de evaluación de citotoxicidad inducida por estrés oxidativo y perturbaciones en la actividad mitocondrial (36). Se ha evaluado el contenido en especies reactivas de oxígeno y el estado de las reservas de glutatión (principal sistema antioxidante celular) en fibroblastos L929 cultivados sobre láminas de PCL (39). Aunque las ROS juegan un papel fisiológico relevante, una producción excesiva puede provocar la disfunción del endotelio, causar daño oxidativo a las células de la pared vascular, oxidar lipoproteínas y acelerar procesos de aterosclerosis. Por este motivo, el contenido en ROS ha sido igualmente evaluado en las células vasculares primarias EC y SMC en cultivo sobre PCL, en las que además se ha analizado el estado del potencial de membrana mitocondrial (40). Para completar el estudio, se han evaluado en los tres tipos celulares otros parámetros como el tamaño, la complejidad y el ciclo celular a diferentes tiempos de cultivo sobre el biomaterial.

Los resultados obtenidos indican que la PCL induce un estrés oxidativo transitorio aunque significativo en los fibroblastos en cultivo sobre el polímero, tal y como revelan el incremento en el contenido intracelular de ROS (Figura 10) y los ensayos del estado redox de las reservas de glutatión (Figura 11). También se observan cambios en la complejidad y el tamaño celular (Figura 12). Sin

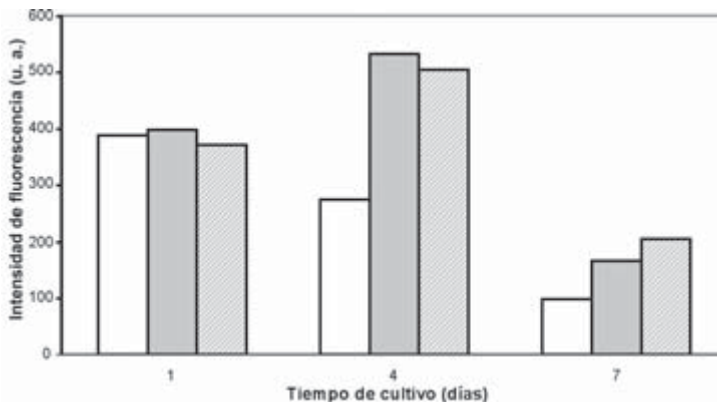


FIGURA 10. *Contenido en especies reactivas de oxígeno de fibroblastos L929 en cultivo sobre láminas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL). El plástico de cultivo (TCP) se ha utilizado como superficie control.*

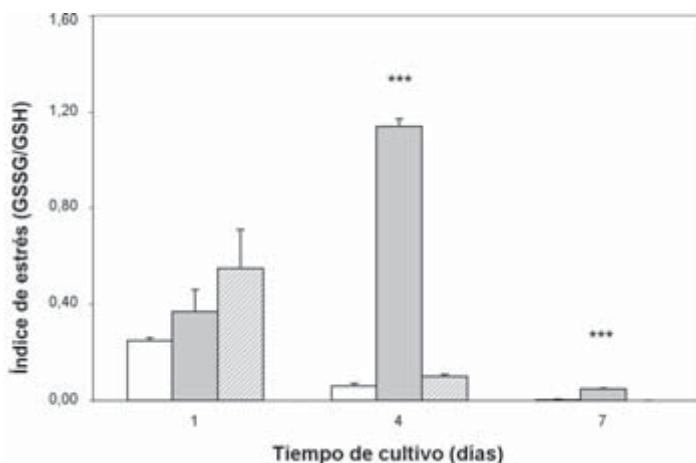


FIGURA 11. *Índice de estrés oxidativo (cociente glutatión oxidado/ glutatión reducido) de fibroblastos L929 en cultivo sobre láminas de poli(ε-caprolactona) (PCL). El plástico de cultivo (TCP) se ha utilizado como superficie control. Los datos se expresan como media ± desviación estándar. Significación estadística: ***p<0,005.*

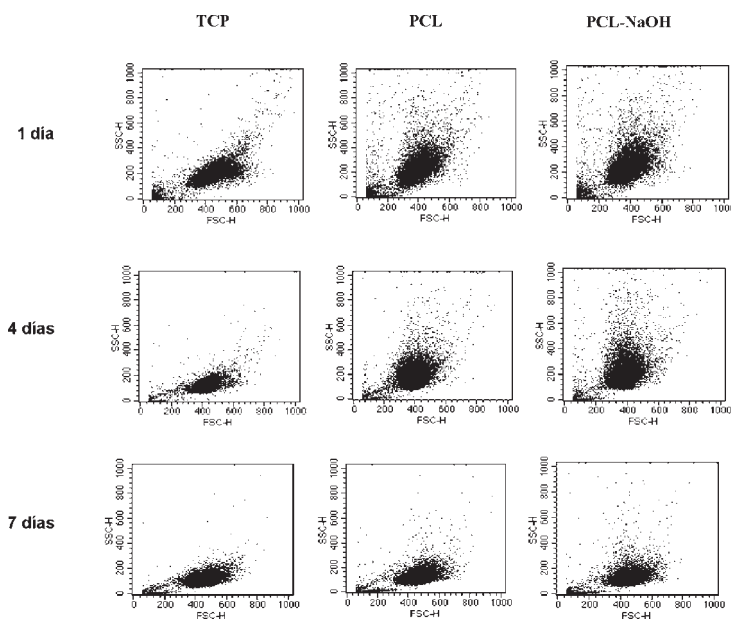


FIGURA 12. *Tamaño y complejidad de fibroblastos L929 en cultivo sobre láminas de poli(ε-caprolactona) (PCL). Las propiedades ópticas de dispersión de las células han sido analizadas mediante citometría de flujo.*

embargo, después de 7 días en cultivo, las células alcanzan los niveles control para todos los parámetros estudiados. Los resultados también revelan que el tratamiento con hidróxido sódico reduce estos efectos. Ni el ciclo celular ni la integridad de la membrana plasmática parecen verse afectados en ninguno de los tiempos evaluados. Los resultados obtenidos con células vasculares primarias muestran que el cultivo sobre PCL disminuye el contenido en ROS en las células endoteliales a lo largo del cultivo (Figura 13A), pero produce un incremento de estos niveles en las células musculares después de 7 días (Figura 13B). El polímero induce variaciones en el potencial

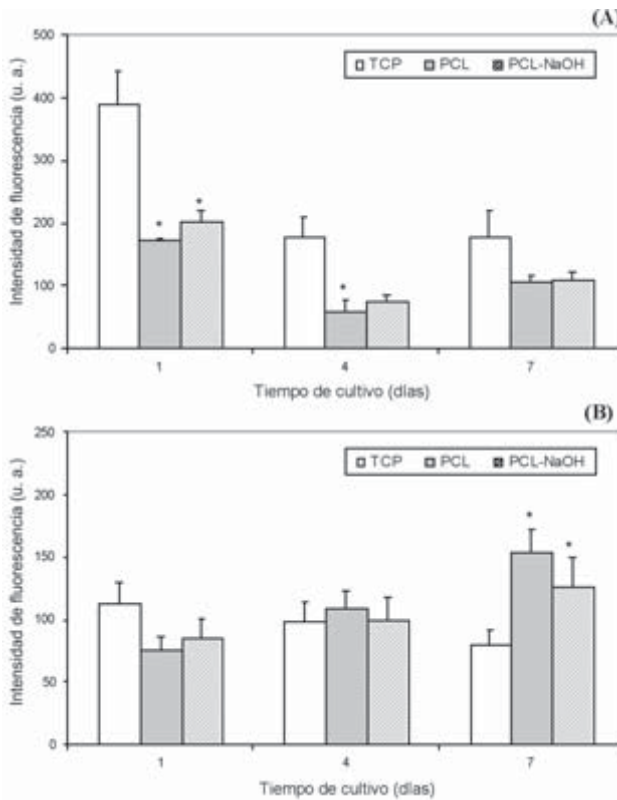


FIGURA 13. **Contenido en especies reactivas de oxígeno de células endoteliales (A) y células de músculo liso (B) en cultivo sobre láminas de poli(ϵ -caprolactona) sin tratar (PCL) o tratadas con NaOH 2M (PCL-NaOH).** El plástico de cultivo (TCP) se ha utilizado como superficie control. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar. Significación estadística: * $p < 0,05$.

de membrana mitocondrial que muestran un paralelismo significativo con los cambios observados en los niveles de ROS (Figura 14), demostrando la importancia y sensibilidad de estas medidas como indicadores de la función mitocondrial. El tratamiento de las láminas con NaOH también disminuye, en este caso, los efectos inducidos por el polímero, tal y como se ha observado previamente con los fibroblastos L929, poniendo de manifiesto los beneficios de incrementar la hidrofiliicidad de la superficie antes del cultivo celular. Dado que no se detectan cambios importantes en la fracción subG₁ ni en EC (Tabla 3) ni en SMC (Tabla 4), los cambios en $\Delta\Psi_m$ observados en este estudio no pueden atribuirse a procesos de apoptosis.

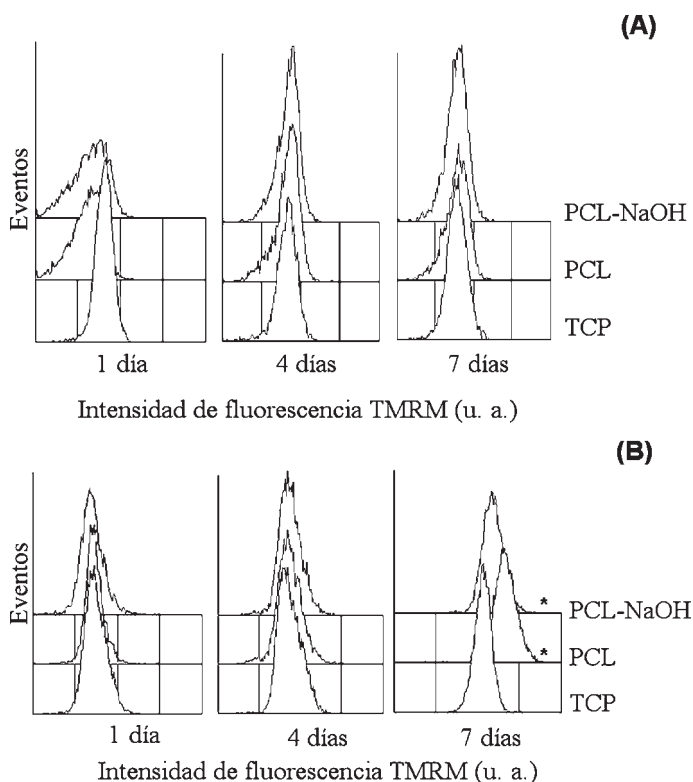


FIGURA 14. *Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de células endoteliales (A) y células de músculo liso (B) en cultivo sobre láminas de poli(ϵ -caprolactona) sin tratar (PCL) o tratadas con NaOH 2M (PCL-NaOH). El plástico de cultivo (TCP) se ha utilizado como superficie control.*

TABLA 3. Porcentajes de células incluidas en cada una de las diferentes fases del ciclo celular de células endoteliales cultivadas en láminas de poli(ϵ -caprolactona) sin tratar (PCL) o tratadas con NaOH (PCL-NaOH). El plástico de cultivo (TCP) ha sido utilizado como superficie control. La tabla recoge los resultados de tres experimentos similares.

Días de cultivo	$subG_1$	G_0/G_1	S	G_2/M
TCP				
1	1.57	84.70	8.81	5.27
4	0.73	77.92	15.53	5.95
7	0.65	92.40	4.59	2.34
PCL				
1	2.58	85.91	3.01	8.79
4	2.25	74.64	16.68	6.47
7	1.15	65.72	25.42	7.02
PCL-NaOH				
1	1.93	84.56	7.80	6.01
4	1.01	86.40	7.36	5.36
7	0.53	88.55	5.77	4.84

TABLA 4. Porcentajes de células incluidas en cada una de las diferentes fases del ciclo celular de células de músculo liso cultivadas en láminas de poli(ϵ -caprolactona) sin tratar (PCL) o tratadas con NaOH (PCL-NaOH). El plástico de cultivo (TCP) ha sido utilizado como superficie control. La tabla recoge los resultados de tres experimentos similares.

Días de cultivo	$subG_1$	G_0/G_1	S	G_2/M
TCP				
1	0.18	78.05	10.16	11.73
4	0.89	91.26	4.01	3.95
7	4.09	85.71	6.57	3.91
PCL				
1	0.75	91.20	3.94	4.18
4	0.59	92.83	3.86	3.03
7	1.03	95.37	1.91	1.89
PCL-NaOH				
1	0.33	89.02	4.96	5.80
4	0.27	93.07	3.67	3.18
7	1.10	93.85	2.96	2.52

CONCLUSIONES

Los estudios llevados a cabo con polímeros de poli(ϵ -caprolactona) confirman su biocompatibilidad tanto con la línea establecida de fibroblastos L929 como con células vasculares primarias y permiten proponer este polímero como soporte biodegradable adecuado para el desarrollo de un implante vascular mediante técnicas de Ingeniería de tejidos.

No obstante, el diseño y obtención de implantes vasculares presenta aún hoy en día numerosos aspectos que deben ser mejorados para conseguir un implante compatible y funcional *in vivo*, entre ellas la identificación de poblaciones celulares adecuadas, la eliminación de procesos trombogénicos y la optimización de su funcionalidad.

En primer lugar, y con la finalidad de evitar los inconvenientes derivados del uso de células endoteliales primarias de origen vascular, se ha iniciado una búsqueda activa de fuentes alternativas para la obtención de estas células. Entre ellas cabe destacar la utilización de **células endoteliales derivadas de cordón umbilical** (HUVEC) que pueden proporcionar importantes ventajas, entre las que destacan su mayor tasa proliferativa y la posibilidad de desarrollar implantes autólogos ideales para el tratamiento de cardiopatías en neonatos. Asimismo, la identificación de **células progenitoras de endotelio** (EPC) en sangre periférica ha revolucionado la investigación en procesos de angiogénesis, convirtiéndose en los últimos años en una de las fuentes utilizadas preferentemente para la endotelización de los implantes vasculares (41, 42).

Por otro lado, la evaluación de la biocompatibilidad de los materiales que van a estar en contacto directo con el torrente circulatorio y/o algún componente sanguíneo debe incluir el estudio de su **hemocompatibilidad**, ya que las complicaciones trombogénicas, así como los riesgos de hemorragias asociados a la terapia anticoagulante administrada, siguen representando un punto crítico en el desarrollo y uso clínico de los implantes cardiovasculares.

Por último, y dado que el funcionamiento fisiológico de las estructuras vasculares y, en gran medida, el proceso de vasculogénesis, implica la participación y contacto con el torrente circulatorio, el desarrollo de arterias o venas *in vitro* debe realizarse bajo condiciones de **estrés mecánico pulsátil**. Recientemente, se ha demostrado

que el cultivo en condiciones de flujo dinámico favorece la maduración del implante vascular diseñado al aumentar el espesor de la pared y el contenido en colágeno del mismo (12), lo que le otorga, en consecuencia, un comportamiento funcional más acorde con la estructura vascular que pretende reemplazar.

AGRADECIMIENTOS

Estos estudios han sido posibles gracias a la financiación de los proyectos de investigación de la Comunidad de Madrid (08.4/0004.3/2001) y de la Fundación Mutua Madrileña Automovilística (2004-033), coordinados por el Dr. J. V. Comas (Instituto Pediátrico del Corazón, Hospital Universitario «12 de Octubre», Madrid) y forman parte de la Tesis Doctoral de la Dr. M. C. Serrano realizada gracias a una beca predoctoral FPU del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. Los autores desean expresar su agradecimiento a la Dra. M. Vallet-Regí y al Dr. J. Peña (Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica, Facultad de Farmacia, UCM) por la preparación de las láminas del polímero y la realización de los estudios de caracterización del material; al Dr. L. Galletti y a la Dra. L. Polo (Instituto Pediátrico del Corazón, Hospital Universitario «12 de Octubre», Madrid) por el suministro de las muestras de vena cava de cerdo. Los fibroblastos L929 fueron generosamente cedidos por la Dr. M. A. Lizarbe y la Dr. N. Olmo (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Químicas, UCM). Los autores quieren expresar también su agradecimiento al personal del Servicio de Citometría de Flujo y Microscopía Confocal (CAI, UCM) y al Dr. Alberto Álvarez-Barrientos (Servicio de Citometría de Flujo, CNIC, Instituto Carlos III) por la asistencia técnica recibida para los estudios de citometría.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) VILLAGRÁ, F. Unidad de Cardiopatías Congénitas. *Cardiopatías Congénitas*. © Fernando Villagrà 2004. Fecha de la última consulta: 9 de Mayo de 2006. Disponible en web: <http://www.cardiopatiascongenitas.net/>.
- (2) RATCLIFFE, A. (2000) Tissue engineering of vascular grafts. *Matrix Biol.* 19: 353-357.

- (3) NIKLASON, L.E. Y LANGER R.S. (1997) Advances in tissue engineering of blood vessels and other tissues. *Transplant Immunology* 5: 303-306.
- (4) KADNER A.; HOERSTRUP S.P.; TRACY J.; BREYMANN C.; MAURUS C.F.; MELNITCHOUK S.; KADNER G.; ZUND G. Y TURINA M. (2002) Human umbilical cord cells: a new cell source for cardiovascular tissue engineering. *Ann. Thorac. Surg.* 74: S1422-1428.
- (5) LANGER, R. Y VACANTI, J.P. (1993) Tissue Engineering. *Science* 260: 920-926.
- (6) ABRAHAM, G.A.; GONZALEZ, M.F. Y CUADRADO, T.R. (1998) La ciencia y la ingeniería de los biomateriales, un desafío interdisciplinario. *Ciencia Hoy* 9 (49).
- (7) HEYLIGERS, J.M.M.; ARTS, C.H.P.; VERHAGEN, H.J.M.; DE GROOT, P.G. Y MOLL F.L. (2005) Improving small-diameter vascular grafts: From the application of an endothelial cell lining to the construction of a tissue-engineered blood vessel. *Ann. Vasc. Surg.* 19: 1-9.
- (8) VOORHEES, A.B.; JARETZKI, A. Y BLAKEMORE, A.H. (1952) The use of tubes constructed from vinyon "N" cloth in bridging arterial defects. *Ann. Surg.* 135: 332-336.
- (9) VARA, D.S.; SALACINSKI, H.J.; KANNAN, R.Y.; BORDENAVE, L.; HAMILTON, G. Y SEIFALIAN, A.M. (2005) Cardiovascular tissue engineering: state of the art. *Pathol. Biol. (Paris)* 53: 599-612.
- (10) WEINBERG, C. Y BELL, A. (1986) A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science.* 231: 397-400.
- (11) L'HEREUX, N.; PAQUET, S.; LABBE, R.; GERMAIN, L. Y AUGER, F.A. (1998) A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J.* 12: 47-56.
- (12) NIKLASON, L.E.; GAO, J.; ABBOTT, W.M.; HIRSCHI, K.K.; HOUSER, S.; MARIN, R. Y LANGER, R. (1999) Functional arteries grown in vitro. *Science.* 284: 489-493.
- (13) NASSERI, B.A.; OGAWA, K. Y VACANTI, J.P. (2001) Tissue engineering: An evolving 21st-century science to provide biologic replacement for reconstruction and transplantation. *Surgery.* 130: 781-784.
- (14) DUMITRIU, S. (2001) *Polymeric Biomaterials*. 2nd Ed. Rev. Marcel Dekker Inc: New York. p95-7, 107-9, 402-3.
- (15) LOWRY, K.J.; HAMSON, K.R.; BEAR, L.; PENG, Y.B.; CALALUCE, R.; EVANS, M.L.; ANGLIN, J.O. Y ALLEN, W.C. (1997) Polycaprolactone/glass bioabsorbable implant in a rabbit humerus fracture model. *J. Biomed. Mater. Res.* 36: 536-541.
- (16) KIM, H.W.; KNOWLES, J.C. Y KIM, H.E. (2004) Development of hydroxyapatite bone scaffold for controlled drug release via poly(ϵ -caprolactone) and hydroxyapatite hybrid coatings. *J. Biomed. Mater. Res.* 70B: 240-249.
- (17) IMMIRZI, B.; MALINCONICO, M.; ORSELLO, G.; PORTOFINO, S. Y VOLPE, M.G. (1999) Blends of biodegradable polyesters by reactive blending: preparation, characterization and properties. *J. Mat. Sci.* 34: 1625-1640.
- (18) KWON, I.K.; KIDOAKI, S. Y MATSUDA, T. (2005) Electrospun nano- to microfiber fabrics made of biodegradable copolyesters: structural characteristics, mechanical properties and cell adhesion potential. *Biomaterials.* 26: 3929-3939.
- (19) Khor, H.L.; Ng, K.W.; Schantz, J.T.; Phan, T.-T.; Lim, T.C.; Teoh, S.H. y Hutmacher, D.W. (2002) Poly(ϵ -caprolactone) films as a potential substrate for tissue engineering an epidermal equivalent. *Mater. Sci. Eng. C.* 20: 71-75.

- (20) COOMBES, A.G.; RIZZI, S.C.; WILLIAMSON, M.; BARRALET, J.E.; DOWNES, S. Y WALLACE, W.A. (2004) Precipitation casting of polycaprolactone for applications in tissue engineering and drug delivery. *Biomaterials*. 25: 315-325.
- (21) LI, W.J.; TULI, R.; OKAFOR, C.; DERFOUL, A.; DANIELSON, K.G.; HALL, D.J. Y TUAN, R.S. (2005) A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 26: 599-609.
- (22) KHOR, H.L.; NG, K.W.; HTAY, A.S.; SCHANTZ, J.-T.; TEOH, S.H. Y HUTMACHER, D.W. (2003) Preliminary study of a polycaprolactone membrane utilized as epidermal substrate. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 14: 113-120.
- (23) SERRANO, M.C.; PORTOLÉS, M.T.; VALLET-REGÍ, M.; IZQUIERDO-BARBA, I.; GALLETTI, L.; COMAS, J.V. Y PAGANI, R. (2005) Vascular endothelial and smooth muscle cell culture on NaOH-treated poly(ϵ -caprolactone) films as a preliminary study for vascular graft development by tissue engineering. *Macromolecular Bioscience*. 5: 415-423.
- (24) WILLIAMS, D.F. (1999) *The Williams Dictionary of Biomaterials*. Liverpool, UK: University Press; p.40.
- (25) MARQUES, A.P.; REIS, R.L. Y HUNT, J.A. (2002) The biocompatibility of novel starch-based polymers and composites: In vitro studies. *Biomaterials*. 23: 1471-1478.
- (26) SERRANO, M.C.; PAGANI, R.; VALLET-REGÍ, M.; PEÑA, J.; RÁMILA, A.; IZQUIERDO, I. Y PORTOLÉS, M.T. (2004) In vitro biocompatibility assessment of poly(ϵ -caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts. *Biomaterials*. 25: 5603-5611.
- (27) GROTH, T.H.; KLOSZ, K.; CAMPBELL, E.J.; NEW, R.C.; HALL, B. Y GOERING, H. (1994) Protein adsorption, lymphocyte adhesion and platelet adhesion/activation on polyurethane ureas is related to hard segment content and composition. *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.* 6: 497-510.
- (28) VAN WACHEM, P.B.; BENGELING, T.; FEJJEIN, J.; BANTJES, A.; DETMERS, J.P. Y VAN AKEN, W.G. (1985) Interaction of cultured human endothelial cells with polymeric surfaces of different wettabilities. *Biomaterials*. 6: 403-408.
- (29) HUBBELL, J.A. (1995) Biomaterials in tissue engineering. *Biotechnology*. 13: 565-576.
- (30) TRIVIÑO, G.; SERRANO, M.C.; PAGANI, R. Y PORTOLÉS, M.T. (2005) A customizable instrument for measuring the mechanical properties of thin biomedical membranes. *Macromol. Mater. Eng.* 290: 953-960.
- (31) JARRELL, B.E.; WILLIAMS, S.K.; STOKES, G.; HUBBARD, F.A.; CARABASI, R.A.; KOOLPE, E.; GREENER, D.; PRATT, K.; MORITZ, M.J. Y RADOMSKI, J. (1986) Use of freshly isolated capillary endothelial cells for the immediate establishment of a monolayer on a vascular graft at surgery. *Surgery*. 100: 392-399.
- (32) DEUTSCH, M.; MEINHART, J.; FISCHLEIN, T.; PREISS, P. Y ZILLA, P. (1999) Clinical autologous in vivo endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts in 100 patients: a 9-year experience. *Surgery*. 126: 847-855.
- (33) FILLINGER, M.F.; SAMPSON, L.N.; CRONENWETT, J.L.; POWELL, R.J. Y WAGNER, R.J. (1997) Coculture of endothelial cells and smooth muscle cells in bilayer and conditioned media models. *J. Surg. Res.* 67: 169-178.
- (34) LANDER, H.M. (1997) An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J.* 11: 118-124.

- (35) QUILLET-MARY, A.; JAFFREZOU, J.P.; MANSAT, V.; BORDIER, C.; NAVAL, J. Y LAURENT, G. (1997) Implication of mitochondrial hydrogen peroxide generation in ceramide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272: 21388-21395.
- (36) TAKEYAMA, N.; MIKI, S.; HIRAKAWA, A. Y TANAKA, T. (2002) Role of the mitochondrial permeability transition and cytochrome c release in hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Experimental Cell Research.* 274: 16-24.
- (37) DING, W.X.; SHEN, H.M. Y ONG, C.N. (2000) Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition in microcystin-induced rapid apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology.* 32: 547-555.
- (38) ZAMZAMI, N.; SUSIN, S.A.; MARCHETTI, P.; HIRSCH, T.; GÓ, M.I.; CASTEDO, M. Y KROEMER, G. (1996) Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* 183: 1533.
- (39) SERRANO, M.C.; PAGANI, R.; PEÑA, J. Y PORTOLÉS, M.T. (2005) Transitory oxidative stress in L929 fibroblasts cultured on poly(ϵ -caprolactone) films. *Biomaterials.* 26: 5827-5834.
- (40) SERRANO, M.C.; PAGANI, R.; MANZANO, M.; COMAS, J.V. Y PORTOLÉS, M.T. (2006) Mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species content of endothelial and smooth muscle cells cultured on poly(ϵ -caprolactone) films. *Biomaterials.* 27: 4706-4714.
- (41) ASAHARA, T.; MUROHARA, T.; SULLIVAN, A.; SILVER, M.; VAN DER ZEE, R.; LI, T.; WITZENBICHLER, B.; SCHATTEMAN, G. Y ISNER, J.M. (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 275: 964-967.
- (42) WALENTA, K.; FRIEDRICH, E.B.; SEHNERT, F.; WERNER, N. Y NICKENING, G. (2005) In vitro differentiation characteristics of cultured human mononuclear cells-implications for endothelial progenitor cell biology. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 333: 476-482.