

## Investigación traslacional cardiovascular

## Modelos animales de reparación vascular y reendotelización

Saami K. Yazdani \*, Masataka Nakano, Fumiyuki Otsuka, Frank D. Kolodgie y Renu Virmani

CVPath Institute Inc., Gaithersburg, Maryland, Estados Unidos

**Palabras clave:**  
Reparación vascular  
Endotelio  
Modelo animal  
Trombosis tardía  
Stent coronario

## RESUMEN

La investigación experimental se vale de modelos animales para analizar la seguridad y la eficacia de distintos tratamientos propuestos por la investigación básica antes de su análisis en ensayos clínicos. En el terreno de los dispositivos para el tratamiento de la enfermedad coronaria, la investigación traslacional adquiere gran relevancia tras el fenómeno de la trombosis tardía de los *stents* farmacoactivos: aunque en su primer análisis preclínico ya se observaron fenómenos de retraso en la reparación vascular, su uso extendido descubrió la citada complicación tardía. En un movimiento de vuelta al análisis preclínico, se cambió el foco de estudio desde la eficacia antirreestenótica de estos nuevos dispositivos a la seguridad en la reparación vascular. Se revisan los distintos modelos animales (especialmente porcino y de conejo), tanto normales como con enfermedad inducida, de valor en el análisis preclínico de los *stents* coronarios, con particular énfasis en el estudio de la endotelización y de la reparación vascular. La correlación de los hallazgos obtenidos en estos modelos con las observaciones realizadas en necropsias humanas refuerza el concepto de investigación traslacional.

## Animal Models of Vascular Repair and Re-endothelialization

## ABSTRACT

Preclinical research employs animal models to investigate the safety and efficacy of treatments suggested by basic research before they are studied in clinical trials. With regard to devices for treating coronary artery disease, translational research has become very important for the study of late thrombosis in drug-eluting stents: although delayed vascular healing had already been observed in early preclinical trials, this late complication was only fully revealed with extensive use of the devices. In the return to preclinical studies, the focus of research has shifted from the efficacy of these new devices in preventing restenosis to the reliability of vascular repair. This article contains a review of the different animal models (especially pigs and rabbits), whether involving healthy animals or those with induced disease, that are useful for the preclinical assessment of coronary stents, particularly for the study of endothelialization and vascular repair. The observed agreement between findings in these models and findings in human necropsies confirms the value of translational research.

**Keywords:**  
Vascular repair  
Endothelium  
Animal model  
Late thrombosis  
Coronary stent

## INTRODUCCIÓN

Los *stents* farmacoactivos (SFA) se han convertido, rápidamente y en todo el mundo, en el estándar de tratamiento percutáneo de la enfermedad coronaria desde que los ensayos clínicos iniciales demostraron una reducción significativa en la tasa de reestenosis comparados con los *stents* metálicos convencionales (SMC)<sup>1-3</sup>. Sin embargo, el uso de los SFA se ha asociado a la aparición de trombosis tardía del *stent*, una complicación infrecuente pero con elevada tasa de mortalidad<sup>4</sup>. El riesgo de trombosis tardía del *stent* se ha demostrado mayor en pacientes cuya indicación del *stent* es *off-label*<sup>5-7</sup>, situaciones en que el balance riesgo/beneficio aún no se ha demostrado<sup>8</sup>. El hallazgo patológico más frecuente en los casos de trombosis tardía del *stent* es

una reparación vascular retrasada, caracterizada por persistencia de los depósitos de fibrina y peor endotelización de la superficie, como demuestran estudios necrópsicos en muestras humanas de implantes de *stent*<sup>9</sup>, a partir de las cuales se determina que la ausencia de cobertura endotelial de la estructura metálica del *stent* es el mejor predictor individual de trombosis tardía del *stent* (fig. 1)<sup>10</sup>.

El análisis preclínico de los dispositivos experimentales en modelos animales es una parte fundamental del proceso regulatorio de aprobación de los dispositivos, encaminado a analizar la seguridad y la eficacia antes del uso humano. En estas fases de investigación, los estudios histológicos siguen siendo el medio más efectivo de valorar la respuesta vascular. Es bien conocido que el proceso de reparación arterial después de colocación del *stent* es mucho más rápido en animales que en humanos; sin embargo, los modelos animales mantienen un elevado valor predictivo, puesto que la secuencia de eventos biológicos asociados con la reparación arterial es notablemente similar<sup>11</sup>. En esta revisión se analizan los distintos modelos animales y las técnicas usadas para analizar la respuesta vascular a la implantación

\*Autor para correspondencia: Assistant Professor, Department of Mechanical Engineering, 150 Jaguar Drive, Shelby Hall, Room 3123, University of South Alabama, Mobile, AL 36688, Estados Unidos.

Correo electrónico: syazdani@southalabama.edu (S.K. Yazdani).

### Abreviaturas

HE: hematoxilina-eosina  
 OCT: tomografía de coherencia óptica  
 SFA: *stents* farmacoactivos  
 SMC: *stents* metálicos convencionales

del *stent* con una referencia comparativa a los estudios en necropsias humanas.

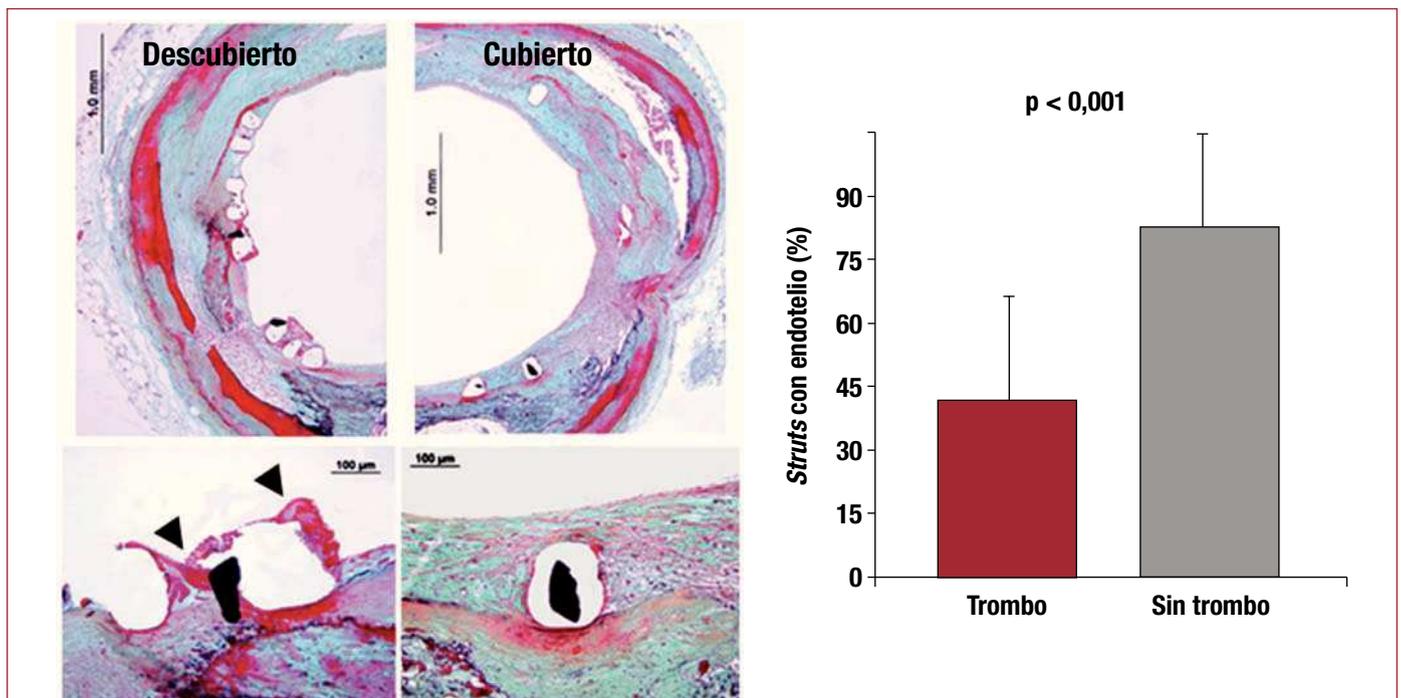
### REVISIÓN DE LOS MODELOS ANIMALES USADOS EN LA EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE LOS STENTS

A pesar del uso extendido en los últimos años de modelos animales para la evaluación de dispositivos endovasculares, es obligatorio reconocer las limitaciones de tamaño inherentes a los estudios experimentales de daño vascular tras el hinchado de balón y/o implante de *stent*. Históricamente, la investigación preclínica de modelos de respuesta vascular comienza en los primeros años de la década de los setenta, con el modelo de arteria carótida de rata, que se estableció como el estándar en el estudio de la formación neointimal como respuesta al daño vascular, lo que incluye también la reendotelización<sup>12</sup>. Posteriormente, varios estudios pioneros del grupo de Seattle se centraron en investigar el mecanismo de la reestenosis como respuesta al daño vascular, y permanecen vigentes aún hoy<sup>13-15</sup>. El modelo de rata se convirtió en el prototipo para el estudio de la proliferación de células musculares lisas y de células endoteliales después del daño vascular, tanto en presencia como en ausencia de tratamientos farmacológicos<sup>16,17</sup>. En la misma línea, la aparición de modelos murinos genéticamente modificados en los años ochenta permitió profundizar en los mecanismos más íntimos del desarrollo de la neointima y establecer su potencial uso en la evaluación de la eficacia de nuevas terapias<sup>18</sup>.

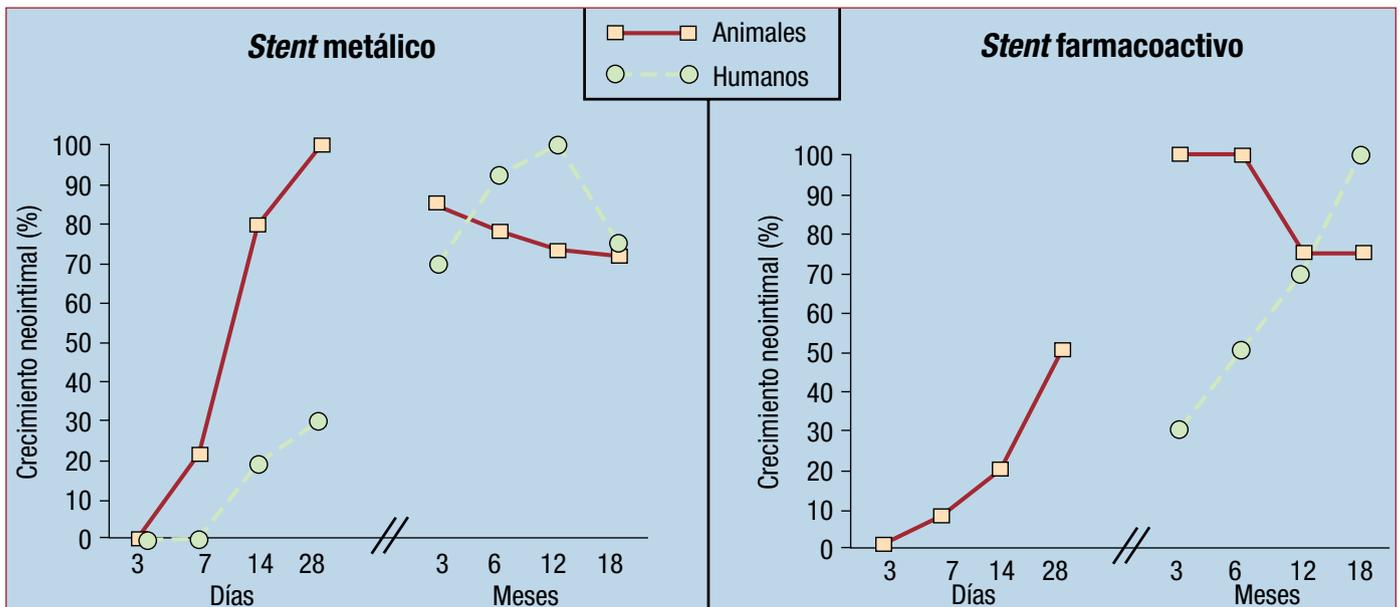
Actualmente los animales más grandes, como conejos, perros, primates, ovejas y cerdos, son los usados más frecuentemente en el análisis preclínico de los dispositivos endovasculares. Dentro de esta variedad, los animales más usados son los conejos y los cerdos, mientras que el modelo ovino se utiliza en menor medida. La angioplastia con balón o implantación de *stent* se puede realizar tanto en arterias periféricas como en coronarias en los perros, pero la respuesta proliferativa neointimal es muy pequeña en estos animales<sup>19</sup>. Por las mismas razones, las ovejas no se usan con frecuencia; sin embargo, es un modelo útil para el estudio del tratamiento de las bifurcaciones arteriales, puesto que anatómicamente presentan ramas coronarias de tamaño similar al de las humanas<sup>20</sup>. Muchos de los nuevos dispositivos endovasculares, particularmente los SFA, han sido probados en los modelos de arteria iliaca de conejo y/o arteria coronaria de cerdo, puesto que la secuencia de la respuesta biológica al daño arterial en ambos modelos es muy similar a la humana. Aunque ambos modelos permiten el implante de *stents* de 2,5-3 mm de calibre, los *stents* de mayor tamaño (3,5-4 mm) solo pueden ser analizados en las porciones más proximales de las arterias coronarias de los cerdos adultos o, menos aconsejable, en la aorta de conejos. La arteria iliaca de los conejos y las arterias coronarias porcinas y humanas están consideradas arterias musculares, mientras la aorta de los conejos es un vaso elástico, mucho menos propenso a desarrollar hiperplasia neointimal que las arterias musculares. Esta revisión se centrará en el impacto que distintos *stents* demuestran en los modelos de cerdos y conejos, con especial énfasis en la reparación vascular y la reendotelización.

### ANÁLISIS DE LA ENDOTELIZACIÓN

El análisis de la repoblación endotelial tras cualquier tratamiento endovascular es un paso fundamental en la evaluación del funcionamiento de los dispositivos y su efectividad. En este sentido, tanto el análisis de la cobertura por células endoteliales como su aspecto morfológico y su recuperación funcional son relevantes. Los estudios de la cinética de reendotelización en el mismo animal actualmente no son factibles, y por ello se suele realizar estudios con observaciones en



**Figura 1.** Hallazgos patológicos en la trombosis tardía del *stent*. Piezas histológicas de *struts* del *stent* cubiertos y descubiertos, que muestran trombo rico en plaquetas (cabeza de flecha) alrededor de *struts* descubiertos. En el análisis *post mórtem* de los especímenes de lesiones tratadas con *stent* más allá de los 30 días, el mejor predictor morfométrico de trombosis tardía del *stent* fue la relación de *struts* descubiertos (no endotelizados) respecto al total de *struts* del *stent*<sup>10</sup>.



**Figura 2.** Relación temporal entre máximo crecimiento neointimal en animales y en humanos tras la implantación de *stents* farmacoactivos (SFA) y metálicos convencionales (SMC). Gráficas obtenidas de muestras de modelo porcino y necrópsicas humanas. En animales, el máximo crecimiento neointimal en los SMC se observa a los 28 días, comparado con los 6-12 meses en humanos. En SFA, el crecimiento neointimal continúa con el tiempo, y se ha demostrado en animales que la falta de eficacia es persistente entre los 3 y los 9 meses (modificado de Virmani et al<sup>11</sup>, con permiso).

distintos puntos temporales para analizar la repoblación por células endoteliales. El modelo de coronarias sanas porcinas ha demostrado una tasa de reendotelización y reparación vascular mucho más rápida que la de las arterias coronarias humanas y de las iliacas de conejo (fig. 2), por lo que el valor predictivo de la reendotelización observada en el modelo porcino y su extrapolación al escenario humano es limitado, y varios grupos prefieren el modelo de conejo<sup>21</sup>.

El porcentaje de endotelización, especialmente tras el implante de *stent*, se ha analizado tradicionalmente en cortes histológicos de la arteria tratada teñidos con hematoxilina-eosina (HE), lo que se puede complementar mediante técnicas inmunohistoquímicas que marquen características específicas del endotelio, tanto en su madurez como en su función (fig. 3). Sin embargo, es particularmente difícil llevar a cabo las técnicas inmunohistoquímicas en los especímenes embebidos en resina (el procedimiento típico requerido para el análisis de los *stents* en histopatología), puesto que la preservación de los sitios antigénicos resulta más compleja en estos casos. La principal limitación que presenta la técnica de análisis histológico de la reendotelización es la escasez de áreas para analizar este parámetro, puesto que típicamente solo se utilizan tres secciones por *stent* para su análisis.

La capa endotelial que cubre la superficie arterial y el *stent* implantado se puede analizar con mayores precisión y extensión (puesto que cubre toda la superficie tratada) mediante técnica «en face» adaptada de los primeros estudios experimentales en arterias de rata, en los que se inducía daño vascular mediante el balón o mediante guías<sup>22,23</sup>. Las nuevas técnicas inmunohistoquímicas que utilizan contrastes fluorados de mayor intensidad (p. ej., las tinciones Alexa), menos susceptibles a la fotodecoloración, analizadas al microscopio confocal, pueden aplicarse a muestras arteriales de *stents* como pieza completa y se puede analizarlas sin la necesidad del procesado en resina. Los segmentos arteriales típicamente se fijan con presión de perfusión *in situ* y después se extraen y se bisecan longitudinalmente para exponer la superficie luminal (fig. 4). De esta forma, el diámetro natural de la arteria se preserva mejor en los segmentos tratados con *stent*, gracias a la rigidez de la estructura metálica, lo que permite bisecar la arteria más fácilmente.

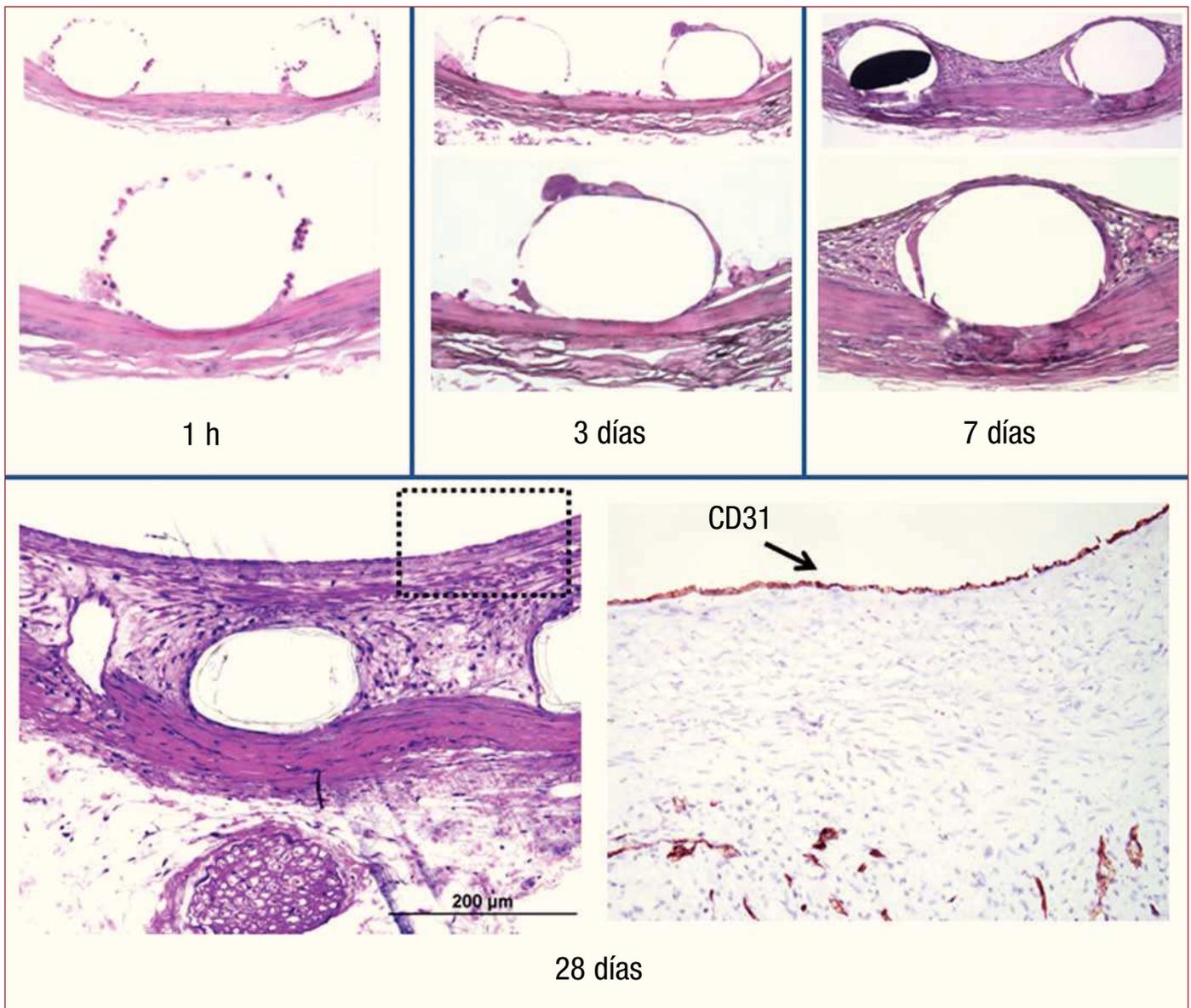
Probablemente, el método más simple de analizar la presencia de endotelio sobre un *stent* es mediante la tinción intravital con tinciones coloidales como el azul de Evans o el azul triptano. La técnica de

coloración con azul de Evans se desarrolló originalmente en el laboratorio del grupo de Schwartz<sup>24</sup> y luego la adaptaron al campo de la angioplastia y el *stent* van Beusekom et al<sup>25</sup>. Se basa en el principio de la permeabilidad aumentada bien por la presencia de uniones endoteliales incompletas o pobremente formadas, bien por la presencia de áreas absolutamente desnudas de células endoteliales (fig. 5). Para la realización de esta técnica, el contraste azul de Evans (soluciones al 0,3-0,5%) se puede inyectar lentamente 1-2 h antes del explante de la muestra y así visualizar el tejido posteriormente «en face». La ausencia de tinción representa endotelio funcional intacto, mientras que la aparición de tinción azul representa la permeabilidad del endotelio, por lo que se puede correlacionar su intensidad con el grado de permeabilidad de este<sup>6</sup>.

Otra técnica originalmente desarrollada en el modelo de rata utiliza nitrato de plata, que delimita los bordes endoteliales intactos. Esta técnica se realiza tras el explante del tejido para analizar y su exposición a la luz ultravioleta, y produce una imagen en mosaico conocida como «líneas de plata»<sup>27</sup>. Aunque esta técnica permite una visualización general de la morfología endotelial, no se puede discriminar totalmente las irregularidades menores.

Actualmente, el método más utilizado para analizar la integridad endotelial en las arterias tratadas con *stent* es el análisis mediante microscopio electrónico de barrido «en face», que nuestro laboratorio ha desarrollado ampliamente<sup>28,29</sup>. La cobertura endotelial tanto sobre los *struts* como entre ellos se puede estimar visualmente y cuantificar mediante morfometría digital. Además, el elevado poder de análisis de estas imágenes puede diferenciar fácilmente formaciones trombóticas y reacciones inflamatorias, así como la integridad de los recubrimientos poliméricos de los *stents*, lo que es muy relevante en la época de los SFA y los balones liberadores de fármaco (fig. 4).

El análisis con microscopio electrónico de barrido puede complementarse con la tinción inmunohistoquímica de marcadores específicos del endotelio, como por ejemplo las uniones intercelulares marcadas por CD31/PECAM-1, buen indicador de la funcionalidad endotelial, y otros indicadores de la recuperación funcional como la trombomodulina<sup>29</sup>. CD31/PECAM-1 es una glucoproteína transmembrana que se localiza en las áreas de contacto intercelular y representa las interacciones homofílicas con otras proteínas PECAM-1 de las células endoteliales vecinas<sup>30</sup>. Otro marcador importante de la recuperación endo-



**Figura 3.** Endotelización de arterias iliacas de conejo tratadas con *stents* metálicos convencionales (SMC). La superficie del *stent* está recubierta de plaquetas y leucocitos en las primeras horas. A los 3 días, se sigue observando leucocitos y células gigantes (reacción de cuerpo extraño) sobre la estructura metálica del *stent*. A la semana, aproximadamente el 70% de la superficie del *stent* se recubre de células endoteliales, con proliferación y migración de células musculares lisas alrededor de los *struts* del *stent*. Al mes, se forma circunferencialmente una capa neointimal rica de células musculares lisas, proteoglicano y matriz de colágeno, que se recubre de una capa intacta de endotelio. La tinción inmunohistoquímica a los 28 días para CD31 (marcador específico de uniones celulares endoteliales) confirma la presencia de endotelio funcional.

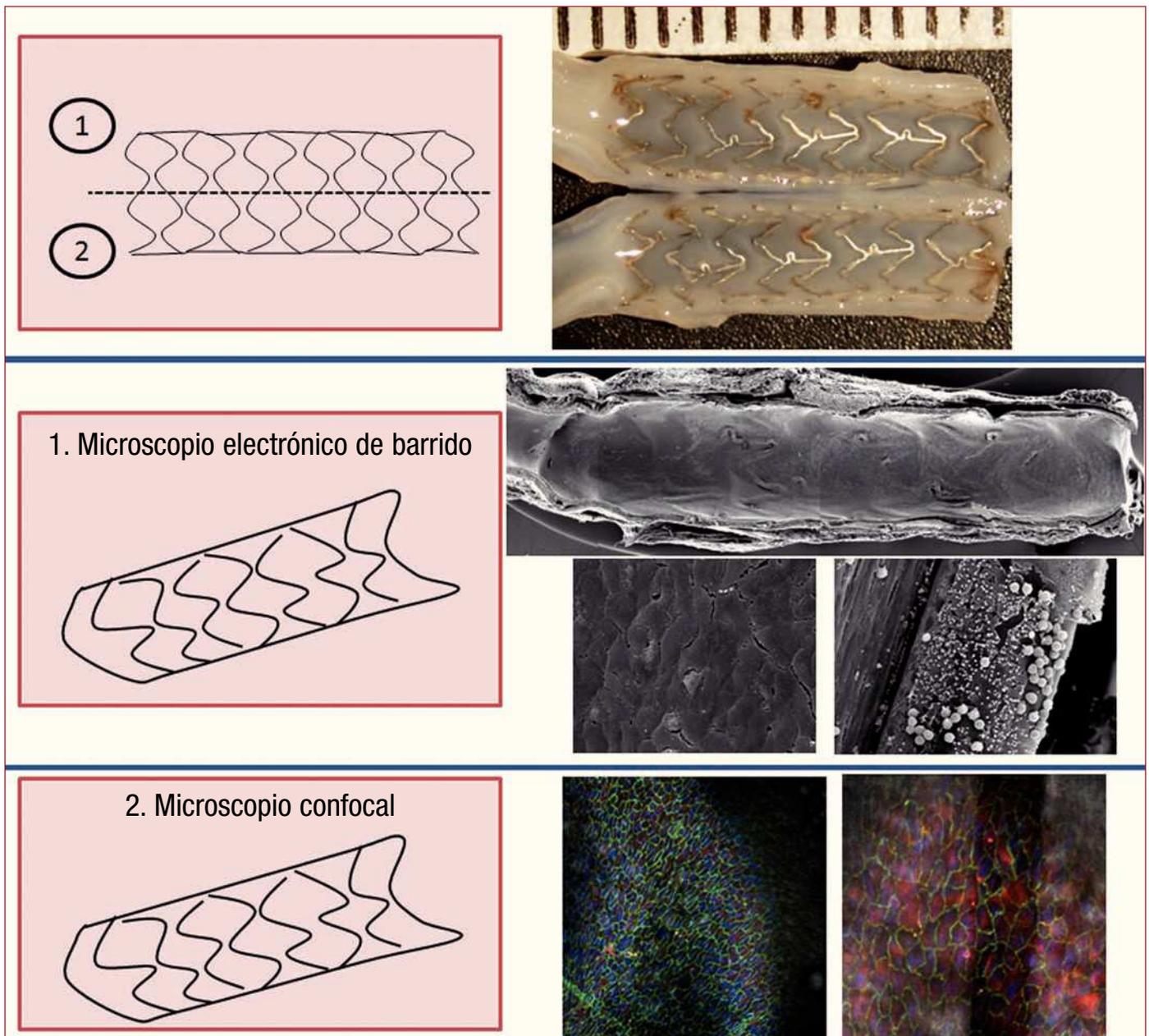
telial es la trombomodulina, de especial relevancia fisiológica en la vía de la proteína C, que tiene un papel fundamental en la regulación de la coagulación y la fibrinólisis<sup>31</sup>. La deficiencia de trombomodulina se ha relacionado con la trombosis espontánea tanto en la circulación arterial como en la venosa<sup>32</sup>. Analizando conjuntamente ambos indicadores de la madurez endotelial y de su funcionalidad, podemos obtener pistas clínicas, puesto que un endotelio disfuncional junto con la falta de total cobertura endotelial es un hecho crítico para que se produzcan eventos trombóticos tardíos, como se ha observado en algunos implantes de SFA en arterias coronarias humanas.

Las técnicas de imagen de las células endoteliales *in vivo* en tiempo real mediante tinciones intravasales aún se están desarrollando en sus etapas más precoces<sup>33,34</sup>. Más recientemente, modalidades de imagen invasiva como la tomografía de coherencia óptica (OCT) intracoronaria han mostrado resultados prometedores en la detección de *struts*, descubiertos gracias a su gran resolución óptica comparada con la de técnicas convencionales como el ultrasonido intravascular<sup>35</sup>. Sin

embargo, la resolución actual aún es insuficiente para distinguir el endotelio de otras estructuras, como depósitos proteináceos o trombos. La recuperación funcional de las células endoteliales en la superficie de los *stents* también se ha analizado recientemente mediante la expresión genética de productos como el VEGF<sup>29</sup> o en estudios de órganos contráctiles aislados<sup>36</sup>, aunque estos probablemente reflejan la funcionalidad endotelial fuera del *stent*.

#### MODELOS ANIMALES DE CORONARIAS PORCINAS Y DE ARTERIAS ILIACAS EN CONEJOS

Los dos modelos animales más aceptados en la evaluación preclínica de SFA son el de arterias coronarias en cerdos y arterias iliacas en conejos<sup>20</sup>. En el modelo porcino, se utilizan animales domésticos normocolesterolémicos o bien *mini-pigs* de Yucatán, estos especialmente en los estudios de largo plazo requeridos por el proceso regulatorio. Recientemente se ha señalado la mejor traducción clínica de los

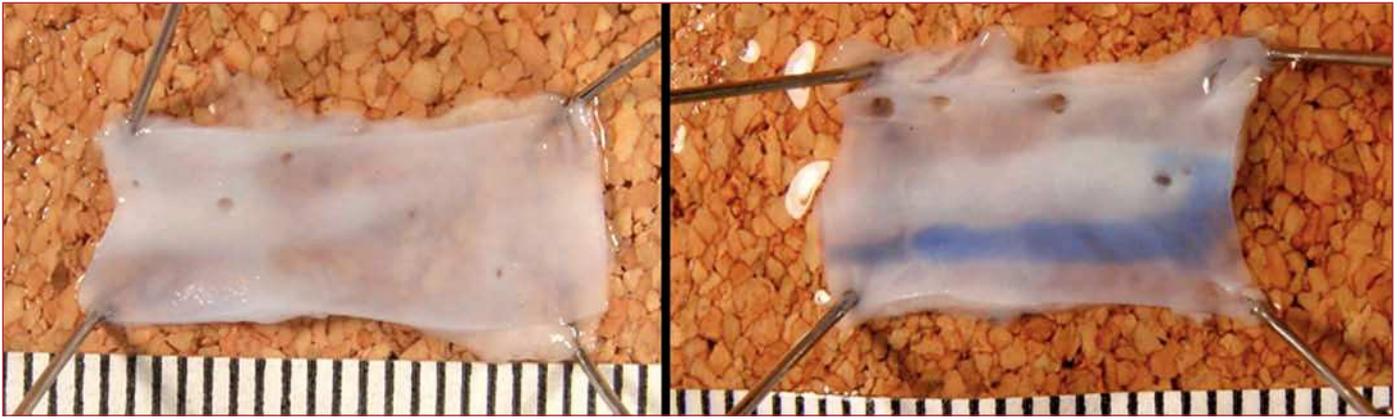


**Figura 4.** Inmunofluorescencia dual de PECAM-1 y trombomodulina para marcar la endothelización de arterias tratadas con *stent*. Imágenes superiores: para analizar la cobertura endotelial de las arterias, se bisecan longitudinalmente en dos mitades para exponer la superficie endotelial. Imágenes centrales: una de las mitades del *stent* se procesa para microscopio electrónico de barrido; las imágenes de baja magnificación se utilizan para reconstruir la superficie luminal, y las de alta magnificación permiten detallar la apariencia de empedrado que forman las células endoteliales e identificar células inflamatorias adheridas a la estructura metálica del *stent* en las zonas descubiertas. Imágenes inferiores: la otra mitad del *stent* se procesa para su estudio con microscopio confocal y tinciones duales marcadoras de endotelio con CD31/PECAM-1 (verde) y trombomodulina (rojo). La inmunofluorescencia permite identificar la cobertura de la estructura metálica del *stent* con células maduras endoteliales con buenas uniones intercelulares como marca CD31; la tinción de trombomodulina refleja una funcionalidad fisiológicamente relevante en tanto las células endoteliales regulan la función plaquetaria y la coagulación.

resultados obtenidos en modelos más complejos de cerdos ateroscleróticos o diabéticos, de mayor similitud con la patología humana<sup>37</sup>. Sin embargo, la utilidad de estos modelos en términos de evaluación preclínica de los dispositivos aún no se ha demostrado totalmente. El modelo más aceptado es el de sobredimensión de las arterias coronarias sanas porcinas (relación *stent*:arteria, 1,1:1-1,2:1). Aunque algunos grupos apoyan una mayor tasa de sobredimensión (relación *stent*:arteria > 1,3), nosotros no creemos que estos resultados se traduzcan en mayor daño de igual manera en distintas arterias. El modelo de arteria iliaca de conejo, con mayor elasticidad natural y menor pérdida de calibre del vaso distal, ofrece ventajas al ser más resistente a disecciones y roturas arteriales, reduciendo la variabilidad interanimal que se observa en muchos estudios del modelo por-

cino. El diámetro de los *stents* implantados en las arterias iliacas de conejos es típicamente de 3 mm, lo que permite alcanzar relaciones *stent*:arteria de 1,2:1-1,3:1. En los conejos, antes de la implantación del *stent*, daño vascular mediante balón de angioplastia o con catéter de Fogarty para aumentar la respuesta neointimal.

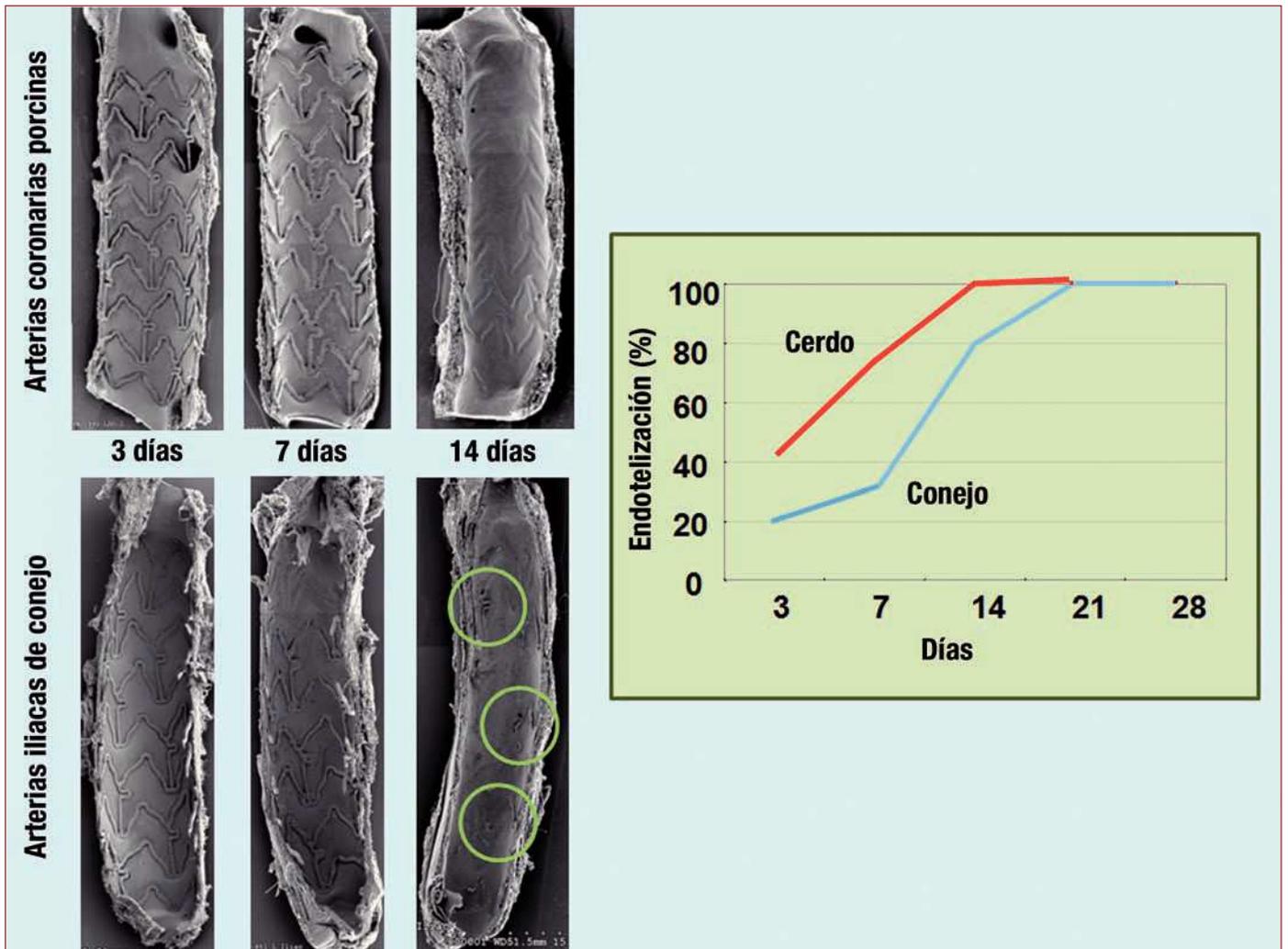
Los cambios patológicos en los modelos porcino y de conejo están bien caracterizados<sup>11</sup> y son similares a los observados tras el implante de *stent* en arterias coronarias humanas, aunque la velocidad de reparación vascular es mucho más lenta en estas<sup>21</sup>. La acumulación de plaquetas y fibrina alrededor de la estructura metálica del *stent* es el primer fenómeno que se observa, seguido de infiltración aguda por células inflamatorias, que aparece en las primeras horas y persiste hasta los 3 días. Posteriormente aparece infiltración por macrófagos, que alcanza



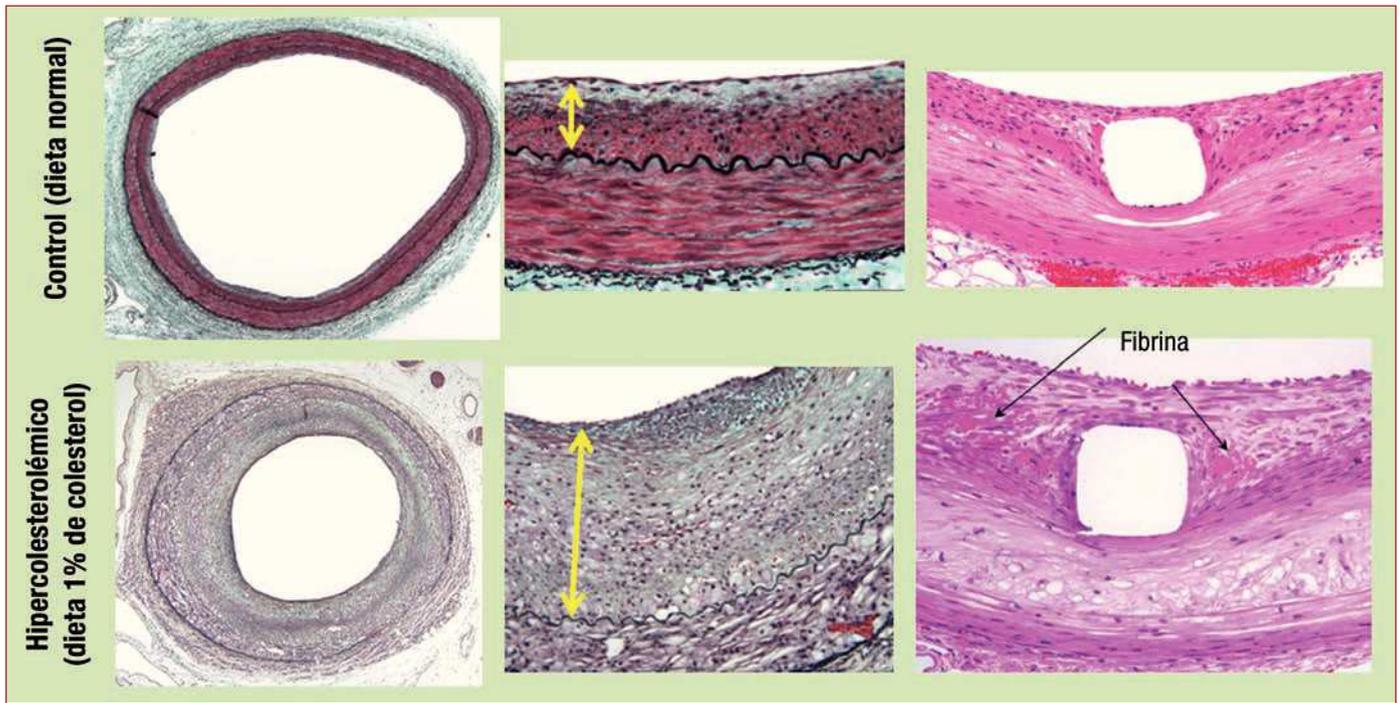
**Figura 5.** Tinción de azul de Evans como indicador de disfunción endotelial. La imagen de la izquierda muestra una superficie luminal no dañada y la de la derecha, el daño vascular inducido después de un procedimiento endovascular. El azul de Evans se acumula en la región con células endoteliales dañadas o disfuncionales. No se observa tinción azul en la imagen de control (izquierda).

su cénit entre los 5 y los 7 días (fig. 3). La proliferación de células musculares lisas comienza en la capa media a los 7 días, y regresa a sus valores basales a los 28 días. Estos fenómenos y su calendario son comunes a ambos modelos animales. En el cerdo, la cobertura endotelial completa de los *stents* metálicos se observa a los 7 días, mientras en

los conejos está retrasada hasta los 21 días (fig. 6). Sin embargo, la deposición de fibrina alrededor de los *struts* del *stent* persiste hasta los 14 días y desaparece a las 3-4 semanas en ambos modelos animales. La migración de células musculares lisas y el crecimiento neointimal, junto con la deposición de colágeno y proteoglicanos es completa a los



**Figura 6.** Diferencias en la velocidad de reendotelización tras implante de *stent* metálico convencional en arterias coronarias porcinas y arterias iliacas de conejo. Se examinan ambas arterias mediante microscopio electrónico de barrido en distintos puntos temporales tras el implante de *stent*. La cobertura endotelial de los *struts* es completa a los 14 días en cerdos, mientras que se observan regiones de *stents* descubiertos (círculos verdes) en las arterias iliacas de conejo. Las gráficas ilustran el porcentaje de cobertura endotelial en cerdos y conejos en función del tiempo. Es reseñable la reendotelización más lenta en los conejos (modificado de Finn et al<sup>21</sup>, con permiso).



**Figura 7.** Cortes representativos de arterias normales y ateroscleróticas en el modelo de arteria iliaca de conejo. Imágenes superiores: alimentados con dieta normal, las arterias iliacas de conejo muestran luz patente con una fina capa intimal (flecha amarilla) tras el daño inducido por la dilatación con balón. Tras el implante de SMC, el vaso muestra reparación completa a los 28 días, sin evidencia de acumulación de fibrina. Imágenes inferiores: en el modelo de conejo aterosclerótico, se observa estrechamiento intraluminal con capa neointimal más gruesa (flecha amarilla) tras el daño vascular por hinchado de balón. La íntima está compuesta de una matriz de proteoglicanos con células inflamatorias (macrófagos espumosos). La presencia de fibrina persiste hasta 28 días después del implante de SMC (reparación retrasada), de forma muy similar a las observaciones realizadas en humanos.

28 días. En el modelo porcino, el crecimiento neointimal alcanza su máximo valor a los 28 días y comienza a remitir; en el modelo de conejo el espesor de la neointima continúa aumentando y es significativamente mayor a los 90 días que a los 28 días<sup>38,39</sup>.

Comparando ambos modelos animales, es evidente que hay ventajas y desventajas en cada uno de ellos. Los documentos de consenso, centrados en los requerimientos necesarios para la aprobación de estos dispositivos por la FDA, recomiendan el uso de las arterias coronarias porcinas, lo que permite el análisis de estos dispositivos en el lecho vascular para el que están diseñados<sup>40,41</sup>. Además, este modelo permite analizar la integridad del *stent* y la susceptibilidad a fracturas condicionadas por el constante movimiento contráctil del corazón. Otra importante ventaja de este modelo en cuanto a seguridad es que permite evaluar la potencial toxicidad del fármaco «aguas abajo» y los fenómenos de embolización distal que pueden afectar al miocardio. Evidentemente, ambos fenómenos no pueden analizarse en el modelo de arterias iliacas de conejo. Estos modelos también permiten analizar la respuesta a la implantación de múltiples *stents* en el mismo territorio, representativo del efecto en humanos de *stents* largos o *stents* solapados. Debe reseñarse que estudios similares de *stents* solapados, especialmente para el análisis de inflamación y persistencia de depósitos de fibrina, se han realizado también en conejos, con seguimientos hasta 90 días<sup>42</sup>.

Aunque el coste comparativo de los cerdos en cuidados y estabulación es superior al de los conejos, la diferencia no es prohibitiva. Una de las mayores desventajas del modelo porcino, especialmente la del animal doméstico, es la excesiva ganancia de peso durante los estudios a largo plazo (más de 90 días), lo que se traduce en cambios significativos en el tamaño de los vasos. Por ello, especialmente para estudios a largo plazo, la recomendación del empleo de *mini-pigs* es uniforme; sin embargo, estos animales son significativamente más caros que los animales domésticos convencionales. Otra desventaja del modelo porcino es la elevada incidencia de reacciones inflamatorias granulomatosas (o inflamación en general) en respuesta a los

*stents*, particularmente los SFA, lo que en ocasiones puede arruinar un protocolo. La reacción inflamatoria granulomatosa raramente se observa en conejos o en las necropsias humanas de pacientes con implantes de SFA. Finalmente, es reseñable que no siempre los estudios preclínicos de SFA en cerdos, especialmente en el aspecto de seguridad, se han traducido en resultados similares en los ensayos clínicos humanos<sup>43-45</sup>. En general, ni el modelo porcino ni el modelo de conejo son buenos predictores de la eficacia a largo plazo de los *stents*. Tampoco la rápida tasa de reendotelización observada en modelos porcinos, incluso en los SFA, se ha traducido posteriormente en reducción de eventos clínicos tan relevantes como la trombosis tardía del *stent*.

La rápida reparación vascular en respuesta a un *stent* que muestran los modelos animales no concuerda con el calendario de reparación completa en los humanos, y se ha demostrado en implantes de SFA de hasta 2 años, y a veces más tiempo, persistencia de los cúmulos de fibrina y ausencia de endotelización completa<sup>10</sup>. Para explicar este fenómeno, se apunta a la elevada sensibilidad de las arterias coronarias porcinas al daño vascular, lo que se traduce en una mayor proliferación de las células musculares lisas y de las células endoteliales, y esto conduce a una endotelización completa a los 28 días, independientemente del tipo de *stent*<sup>21</sup>. En el modelo de conejo, el proceso de reparación (endotelización y reabsorción de la fibrina inclusive) es relativamente más lento que en el modelo porcino. Por ello, el modelo de conejo se considera más sensible para detectar diferencias en la reparación vascular entre SFA y SMC, especialmente en cuanto a reendotelización. En cualquier caso, el calendario respecto a los humanos está marcadamente acelerado<sup>11</sup>. En nuestra experiencia, el punto temporal más adecuado para analizar la cobertura endotelial de los SFA en el modelo de conejos jóvenes sanos es 14 días<sup>29</sup>. Las limitaciones del modelo de conejo vienen dadas por las condiciones de seguridad previamente citadas (daño en órgano diana, análisis estructural en órgano contráctil) y las diferencias entre las arterias coronarias y las arterias iliacas en la dinámica de fluidos.

## EL CONEJO HIPERCOLESTEROLÉMICO: UN MODELO PRECLÍNICO PERFECCIONADO PARA EL ANÁLISIS DE LOS STENTS

El conejo presenta una extraordinaria propensión a la hipercolesterolemia, y se producen fácilmente lesiones ricas en células espumosas. Nuestro laboratorio y otros han demostrado que la morfología de las lesiones se puede modificar fácilmente para obtener placas ateroscleróticas más fibróticas variando la concentración de colesterol (del 0,2 al 0,25%) y extendiendo la duración de la dieta aterogénica<sup>46,47</sup>. El conejo hipercolesterolémico frecuentemente muestra placas ateroscleróticas ricas en células espumosas (macrófagos cargados de lípidos); la inducción de daño vascular (mediante balón de Fogarty) puede aumentar el número de células musculares lisas y el componente extracelular y determinar el sitio donde aparecen las lesiones como, por ejemplo, la arteria iliaca (fig. 7). Otros investigadores han utilizado dietas alternantes de alto contenido en colesterol con dieta normal o de bajo contenido en colesterol (el llamado modelo Constantinides) en forma de múltiples ciclos de cambio de dieta, con lo que se producen placas de mayor similitud con las observadas en la enfermedad humana<sup>48</sup>. El modelo de conejo habitualmente usado en nuestro laboratorio, con placa aterosclerótica establecida y *stent*, se lleva a cabo mediante dieta de alto contenido en colesterol (el 1% de colesterol y el 6% de aceite de cacahuete) durante 5 semanas. Tras la primera semana de dieta, los animales son sometidos a un procedimiento endovascular de denudación arterial iliaca utilizando un catéter Fogarty de 3 Fr para acelerar el desarrollo de la lesión<sup>46,47</sup>. Tras las 5 semanas de dieta de alto contenido en colesterol, se cambia a los animales a una dieta de bajo contenido en colesterol (0,025%) hasta el final del estudio. Los *stents* se implantan después de 4 semanas de dieta de bajo contenido en colesterol. Empleando este modelo, los intervalos de colesterol sérico oscilan entre 500 y 1.000 mg/dl en el momento de la implantación del *stent* y habitualmente alcanzan su cénit el día 35 (media, > 1.500 mg/dl).

La distribución local del fármaco después del implante de un *stent* y su persistencia en los tejidos ateroscleróticos son distintas de las observadas en arterias normales. Puesto que la mayoría de los actuales SFA utilizan fármacos lipófilos y se implantan en arterias ateroscleróticas humanas, es particularmente importante entender qué ocurre en las arterias enfermas, en lugar de arterias normales, tanto desde el punto de vista de la farmacocinética como de la fisiopatología de la reparación vascular. Del mismo modo, las placas humanas de los pacientes con síndrome coronario agudo tienen un alto contenido en lípidos y células espumosas. Por lo tanto, este modelo animal de aterosclerosis debe predecir en mayor medida los resultados observados en el escenario humano de arterias ateroscleróticas. No obstante, actualmente no hay estudios definitivos en este sentido.

### INFORMACIÓN OBTENIDA DE DATOS NECRÓPSICOS Y CLÍNICOS

La aprobación por la FDA de las actuales generaciones de SFA a base de polímeros estables se ha basado en estudios clínicos aleatorizados a corto plazo (< 1 año) que han demostrado reducciones impresionantes en las tasas de reestenosis comparadas con las de SMC, sin aparentes incrementos en eventos adversos cardíacos<sup>2,3</sup>. Estos estudios no estaban diseñados para analizar objetivos de seguridad como la trombosis tardía del *stent*, que hoy sabemos se correlaciona con la ausencia de adecuada cobertura endotelial. Los avances en el conocimiento de la fisiopatología de la trombosis tardía de los SFA se derivan especialmente de los análisis patológicos de muestras necrópsicas obtenidas de pacientes a los que se implantó estos dispositivos. Los análisis histológico y morfométrico detallado de estos especímenes ha permitido entender las diferentes respuestas vasculares que muestran las arterias tratadas con SFA y SMC, especialmente en cobertura de los *struts* y endotelización. De hecho, la pobre cobertura endotelial de la superficie de los vasos tratados con SFA, independientemente del tiempo transcurrido desde la implantación, contrasta

notablemente con los hallazgos patológicos de los SMC, que muestran abundante crecimiento neointimal con muchas células musculares lisas y deposición de proteoglicanos, con mínima deposición de fibrina alrededor del *stent*<sup>9</sup>. La endotelización de la mayoría de las secciones de los SMC observados concuerda con los resultados de estudios patológicos previos que mostraban una cobertura endotelial casi completa a los 3-4 meses, con abundantes células musculares lisas (alfaactina positivas) con picos a los 9-18 meses<sup>49-51</sup>.

La trombosis tardía del *stent*, definida como trombo rico en plaquetas que ocupa más del 25% de la luz arterial observado después de los primeros 30 días de la implantación, se ha correlacionado con la aparición patológica de datos de reparación vascular retrasada, caracterizada por persistencia de fibrina y ausencia de endotelización. De los estudios necrópsicos se han obtenido predictores de mayor incidencia de trombosis del *stent* en variables dependientes del procedimiento, como la implantación de *stent* en localización ostial o en bifurcaciones, la aposición incompleta y la penetración de los *struts* en los núcleos necróticos de las placas ateroscleróticas<sup>52,53</sup>. Muchas de estas causas también son indicadores de mayor riesgo trombótico tras SMC<sup>49</sup>.

### CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los estudios preclínicos en modelos animales de cerdo y conejo continúan siendo el método más efectivo para analizar la respuesta vascular a los *stents*, particularmente los SFA. Aunque la ausencia relativa de fibrina, la cobertura por neointima del *stent* y el crecimiento endotelial son indicadores fundamentales de la reparación vascular, el patrón temporal de estos hallazgos no refleja necesariamente la capacidad regenerativa que se observará en humanos, especialmente en SFA, puesto que la reparación vascular en estos es mucho más lenta que en los animales. En el análisis de la seguridad de los dispositivos, el modelo porcino tiene ventajas evidentes sobre el modelo de conejo, puesto que los *stents* se implantan en el lecho vascular en el que se utilizarán en el escenario clínico humano con un órgano terminal, lo que permite evaluar fenómenos de embolización distal y potencial toxicidad del fármaco. En cambio, otros aspectos de seguridad como el crecimiento endotelial se evalúan mejor en el modelo de conejo, por su endotelización más lenta. Aunque son varios los estudios que comienzan a examinar el efecto del implante de *stents* en la recuperación de la función endotelial, los estudios publicados aún son insuficientes. En este sentido es esencial escoger el lecho vascular, la especie animal y los tiempos de análisis apropiados que permitan determinar no solo una adecuada recuperación endotelial desde el punto de vista morfológico mediante la presencia física de células endoteliales, sino también la recuperación de una funcionalidad vascular normal. Finalmente, debemos hacer hincapié en que los actuales modelos animales de conejo y cerdo no respaldan conclusiones sobre la eficacia farmacológica a largo plazo; los avances en el desarrollo de modelos animales con enfermedad aterosclerótica podrían cubrir este déficit al simular más adecuadamente el escenario clínico en el que se indican estos dispositivos.

### CONFLICTO DE INTERESES

R. Virmani declara recibir honorarios como consultora de 480 Biomedical y Abbott Vascular, así como por ponencias de Abbott Vascular, Boston Scientific y Terumo Corporation; los demás autores no tienen conflicto de intereses.

### BIBLIOGRAFÍA

- Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, Fajadet J, Ban Hayashi E, Perin M, et al. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med.* 2002;346:1773-80.
- Moses JW, Leon MB, Popma JJ, Fitzgerald PJ, Holmes DR, O'Shaughnessy C, et al. Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med.* 2003;349:1315-23.

3. Stone GW, Ellis SG, Cox DA, Hermiller J, O'Shaughnessy C, Mann JT, et al. A polymer-based, paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2004;350:221-31.
4. Daemen J, Wenaweser P, Tsuchida K, Abrecht L, Vaina S, Morger C, et al. Early and late coronary stent thrombosis of sirolimus-eluting and paclitaxel-eluting stents in routine clinical practice: data from a large two-institutional cohort study. *Lancet.* 2007;369:667-78.
5. Beohar N, Davidson CJ, Kip KE, Goodreau L, Vlachos HA, Meyers SN, et al. Outcomes and complications associated with off-label and untested use of drug-eluting stents. *JAMA.* 2007;297:1992-2000.
6. Farb A, Boam AB. Stent thrombosis redux—the FDA perspective. *N Engl J Med.* 2007;356:984-7.
7. Win HK, Caldera AE, Maresh K, Lopez J, Rihal CS, Parikh MA, et al. Clinical outcomes and stent thrombosis following off-label use of drug-eluting stents. *JAMA.* 2007;297:2001-9.
8. Marroquin OC, Selzer F, Mulukutla SR, Williams DO, Vlachos HA, Wilensky RL, et al. A comparison of bare-metal and drug-eluting stents for off-label indications. *N Engl J Med.* 2008;358:342-52.
9. Joner M, Finn AV, Farb A, Mont EK, Kolodgie FD, Ladich E, et al. Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:193-202.
10. Finn AV, Joner M, Nakazawa G, Kolodgie F, Newell J, John MC, et al. Pathological correlates of late drug-eluting stent thrombosis: strut coverage as a marker of endothelialization. *Circulation.* 2007;115:2435-41.
11. Virmani R, Kolodgie FD, Farb A, Lafont A. Drug eluting stents: are human and animal studies comparable? *Heart.* 2003;89:133-8.
12. Schwartz SM, Benditt EP. Studies on aortic intima. I. Structure and permeability of rat thoracic aortic intima. *Am J Pathol.* 1972;66:241-64.
13. Schwartz SM, Haudenschild CC, Eddy EM. Endothelial regeneration. I. Quantitative analysis of initial stages of endothelial regeneration in rat aortic intima. *Lab Invest.* 1978;38:568-80.
14. Haudenschild CC, Schwartz SM. Endothelial regeneration. II. Restitution of endothelial continuity. *Lab Invest.* 1979;41:407-18.
15. Reidy MA, Schwartz SM. Endothelial regeneration. III. Time course of intimal changes after small defined injury to rat aortic endothelium. *Lab Invest.* 1981;44:301-8.
16. Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium. *Lab Invest.* 1983;49:327-33.
17. Zempo N, Koyama N, Kenagy RD, Lea HJ, Clowes AW. Regulation of vascular smooth muscle cell migration and proliferation in vitro and in injured rat arteries by a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:28-33.
18. Sata M, Maejima Y, Adachi F, Fukino K, Saiura A, Sugiyama S, et al. A mouse model of vascular injury that induces rapid onset of medial cell apoptosis followed by reproducible neointimal hyperplasia. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32:2097-104.
19. Schwartz RS, Edwards WD, Bailey KR, Camrud AR, Jorgenson MA, Holmes DR Jr. Differential neointimal response to coronary artery injury in pigs and dogs. Implications for restenosis models. *Arterioscler Thromb.* 1994;14:395-400.
20. Schwartz RS, Edelman E, Virmani R, Carter A, Granada JF, Kaluza GL, et al. Drug-eluting stents in preclinical studies: updated consensus recommendations for preclinical evaluation. *Circ Cardiovasc Interv.* 2008;1:143-53.
21. Finn AV, Nakazawa G, Joner M, Kolodgie FD, Mont EK, Gold HK, et al. Vascular responses to drug eluting stents: importance of delayed healing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:1500-10.
22. Hansson GK, Schwartz SM. Evidence for cell death in the vascular endothelium in vivo and in vitro. *Am J Pathol.* 1983;112:278-86.
23. Reidy MA, Schwartz SM. Developments in the study of endothelial cells by scanning electron microscopy. *Artery.* 1980;8:236-43.
24. Somer JB, Evans G, Schwartz CJ. Influence of experimental aortic coarctation on the pattern of aortic Evans blue uptake in vivo. *Atherosclerosis.* 1972;16:127-33.
25. Van Beusekom HM, Whelan DM, Hofma SH, Krabbendam SC, Van Hinsbergh VW, Verdouw PD, et al. Long-term endothelial dysfunction is more pronounced after stenting than after balloon angioplasty in porcine coronary arteries. *J Am Coll Cardiol.* 1998;32:1109-17.
26. Friedman M, Byers SO. Endothelial permeability in atherosclerosis. *Arch Pathol.* 1963;76:99-105.
27. Zand T, Underwood JM, Nunnari JJ, Majno G, Joris I. Endothelium and "silver lines". An electron microscopic study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol.* 1982;395:133-44.
28. Farb A, John M, Acampado E, Kolodgie FD, Prescott MF, Virmani R. Oral everolimus inhibits in-stent neointimal growth. *Circulation.* 2002;106:2379-84.
29. Joner M, Nakazawa G, Finn AV, Quee SC, Coleman L, Acampado E, et al. Endothelial cell recovery between comparator polymer-based drug-eluting stents. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52:333-42.
30. Newton JP, Buckley CD, Jones EY, Simmons DL. Residues on both faces of the first immunoglobulin fold contribute to homophilic binding sites of PECAM-1/CD31. *J Biol Chem.* 1997;272:20555-63.
31. Dahlback B, Villoutreix BO. The anticoagulant protein C pathway. *FEBS Lett.* 2005;579:3310-6.
32. Isermann B, Hendrickson SB, Zogg M, Wing M, Cummskey M, Kisanuki YY, et al. Endothelium-specific loss of murine thrombomodulin disrupts the protein C anticoagulant pathway and causes juvenile-onset thrombosis. *J Clin Invest.* 2001;108:537-46.
33. Goetz M, Thomas S, Heimann A, Delaney P, Schneider C, Relle M, et al. Dynamic in vivo imaging of microvasculature and perfusion by miniaturized confocal laser microscopy. *Eur Surg Res.* 2008;41:290-7.
34. Vakoc BJ, Lanning RM, Tyrrell JA, Padera TP, Stylianopoulos T, et al. Three-dimensional microscopy of the tumor microenvironment in vivo using optical frequency domain imaging. *Nat Med.* 2009;15:1219-23.
35. Jimenez-Valero S, Moreno R, Sanchez-Recalde A. Very late drug-eluting stent thrombosis related to incomplete stent endothelialization: in-vivo demonstration by optical coherence tomography. *J Invasive Cardiol.* 2009;21:488-90.
36. Pendyala LK, Li J, Shinke T, Geva S, Yin X, Chen JP, et al. Endothelium-dependent vasomotor dysfunction in pig coronary arteries with Paclitaxel-eluting stents is associated with inflammation and oxidative stress. *JACC Cardiovasc Interv.* 2009;2:253-62.
37. Granada JF, Kaluza GL, Wilensky RL, Biedermann BC, Schwartz RS, Falk E. Porcine models of coronary atherosclerosis and vulnerable plaque for imaging and interventional research. *EuroIntervention.* 2009;5:140-8.
38. Carter AJ, Aggarwal M, Kopia GA, Tio F, Tsao PS, Kolata R, et al. Long-term effects of polymer-based, slow-release, sirolimus-eluting stents in a porcine coronary model. *Cardiovasc Res.* 2004;63:617-24.
39. Kollum M, Kaiser S, Kinscherf R, Metz J, Kubler W, Hehrlein C. Apoptosis after stent implantation compared with balloon angioplasty in rabbits. Role of macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:2383-8.
40. Guidance for industry, coronary drug-eluting stents-nonclinical and clinical studies. Silver Spring: FDA; 2008.
41. Schwartz RS, Edelman ER, Carter A, Chronos N, Rogers C, Robinson KA, et al. Drug-eluting stents in preclinical studies: recommended evaluation from a consensus group. *Circulation.* 2002;106:1867-73.
42. Finn AV, Kolodgie FD, Harnek J, Guerrero LJ, Acampado E, Tefera K, et al. Differential response of delayed healing and persistent inflammation at sites of overlapping sirolimus- or paclitaxel-eluting stents. *Circulation.* 2005;112:270-8.
43. Drachman DE, Edelman ER, Seifert P, Groothuis AR, Bornstein DA, Kamath KR, et al. Neointimal thickening after stent delivery of paclitaxel: change in composition and arrest of growth over six months. *J Am Coll Cardiol.* 2000;36:2325-32.
44. Heldman AW, Cheng L, Jenkins GM, Heller PF, Kim DW, Ware M Jr, et al. Paclitaxel stent coating inhibits neointimal hyperplasia at 4 weeks in a porcine model of coronary restenosis. *Circulation.* 2001;103:2289-95.
45. Suzuki T, Kopia G, Hayashi S, Bailey LR, Llanos G, Wilensky R, et al. Stent-based delivery of sirolimus reduces neointimal formation in a porcine coronary model. *Circulation.* 2001;104:1188-93.
46. Joner M, Farb A, Cheng Q, Finn AV, Acampado E, Burke AP, et al. Pioglitazone inhibits in-stent restenosis in atherosclerotic rabbits by targeting transforming growth factor-beta and MCP-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:182-9.
47. Ribichini F, Joner M, Ferrero V, Finn AV, Crimmins J, Nakazawa G, et al. Effects of oral prednisone after stenting in a rabbit model of established atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50:176-85.
48. Johnstone MT, Perez AS, Nasser I, Stewart R, Vaidya A, Al Ammary F, et al. Angiotensin receptor blockade with candesartan attenuates atherosclerosis, plaque disruption, and macrophage accumulation within the plaque in a rabbit model. *Circulation.* 2004;110:2060-5.
49. Farb A, Burke AP, Kolodgie FD, Virmani R. Pathological mechanisms of fatal late coronary stent thrombosis in humans. *Circulation.* 2003;108:1701-6.
50. Grewe PH, Deneke T, Machraoui A, Barmeyer J, Muller KM. Acute and chronic tissue response to coronary stent implantation: pathologic findings in human specimen. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35:157-63.
51. Farb A, Kolodgie FD, Hwang JY, Burke AP, Tefera K, Weber DK, et al. Extracellular matrix changes in stented human coronary arteries. *Circulation.* 2004;110:940-7.
52. Nakazawa G, Yazdani SK, Finn AV, Vorpahl M, Kolodgie FD, Virmani R. Pathological findings at bifurcation lesions: the impact of flow distribution on atherosclerosis and arterial healing after stent implantation. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55:1679-87.
53. Nakazawa G, Finn AV, Joner M, Ladich E, Kutys R, Mont EK, et al. Delayed arterial healing and increased late stent thrombosis at culprit sites after drug-eluting stent placement for acute myocardial infarction patients: an autopsy study. *Circulation.* 2008;118:1138-45.