



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,**  
**ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**  
**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

Efecto de Paclitaxel comparado con Cilostazol, sobre la expresión de HIF-1alpha, PDGF, la cantidad de Actina y el grosor de hiperplasia intimal a los primeros 7 días, en un modelo experimental.

**T E S I S**

Que para optar por el grado de:  
Maestría en Ciencias Médicas

**P R E S E N T A**

Rodrigo Lozano Corona

**T U T O R**

Dr. Carlos Arturo Hinojosa Becerril  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

**C O M I T É T U T O R**

Dr. José Francisco González Zamora  
Instituto Nacional de Pediatría  
Dr. Eduardo Almeida Gutiérrez  
Centro Médico Nacional Siglo XXI



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## índice

<b>Resumen</b>	3
<b>1. Introducción</b>	4
Objetivos	25
Hipótesis	26
<b>2. Metodología</b>	27
Diseño del protocolo	27
Modelo experimental	27
Intervenciones	13
Tamaño de la muestra	35
Variables Mediciones	37
Asignación de grupos	39
Cegamiento	39
Análisis estadístico	40
Infraestructura	41
Consideraciones éticas	44
Cronograma	45
<b>3. Resultados</b>	46
Resumen del ensayo	46
Características basales	47
Comparación densitométrica	56
<b>4. Discusión</b>	59
<b>5. Conclusión</b>	65
<b>6. Referencias bibliográficas</b>	66
<b>7. Anexos</b>	77

## RESUMEN

**Efecto de Paclitaxel comparado con cilostazol, sobre la expresión de HIF-1ALPHA, PDGF, la cantidad de actina y el grosor de hiperplasia intimal a los primeros 7 días, en un modelo experimental.**

**Objetivos:** Comparar las mediciones en milímetros cuadrados, del grosor de la hiperplasia intimal, en cortes histológicos de venas femorales de conejos de Nueva Zelanda, una semana después de haberlas sometido a barotrauma mediante un modelo de fuerza tensional radial intravascular, en un grupo control al que se realizó angioplastia con balón más administración vía oral de Cilostazol y un grupo experimental al que se realizó angioplastia medicada con Paclitaxel.

**Materiales y Métodos:** Estudio experimental, de no inferioridad entre dos fármacos: Cilostazol y Paclitaxel, el intervalo de la diferencia entre ambos fármacos planteada fue de 0.21 mm<sup>2</sup>.

**Resultados:** fueron obtenidas 14 muestras de conejos en el grupo de cilostazol y 14 en el de Paclitaxel. El área de la luz vascular para el grupo de cilostazol fue 1.17 mm<sup>2</sup> (DE 1.02, IC 95% 0.56 a 1.77 mm<sup>2</sup>) y para el grupo de Paclitaxel de 1.10 mm<sup>2</sup> (DE 1.0, IC 95% 0.47 a 1.72 mm<sup>2</sup>), el área de hiperplasia intimal para el grupo de cilostazol fue de 0.33 mm<sup>2</sup> (DE 0.15, IC 95% 0.24 a 0.42 mm<sup>2</sup>) y para el grupo de Paclitaxel de 0.31 mm<sup>2</sup> (DE 0.14, IC 95% 0.22 a 0.40 mm<sup>2</sup>). El Paclitaxel y el cilostazol tuvieron una reducción en la expresión de la hiperplasia intimal de 61% y 63% respectivamente. La diferencia entre ambos fármacos fue de 0.0193 mm<sup>2</sup> (IC 95% -0.1175 a 0.156 mm<sup>2</sup>).

**Conclusión:** El Cilostazol es no inferior al Paclitaxel en la inhibición de Hiperplasia intimal en venas femorales de conejos de Nueva Zelanda, cuando se realiza la medición 7 días después de haberles realizado barotrauma mediante angioplastia.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en los países desarrollados, en México dichos padecimientos predominan entre la población adulta representando de igual manera, la principal causa de morbimortalidad general <sup>1</sup>. En 2004, se realizaron en Estados Unidos más de 6 millones de procedimientos cardiovasculares con la finalidad de disminuir la mortalidad asociada a padecimientos vasculares: se estima que se realizaron 1.2 millones de angioplastias, 0.4 millones de *bypass* y 1.4 millones de procedimientos de cateterización diagnóstica. El costo de las enfermedades cardiovasculares y los accidentes cerebrovasculares en los Estados Unidos fue de 431.800 millones de dólares en el año 2007 <sup>2</sup>. Desafortunadamente en nuestro país no contamos con los mismos datos estadísticos.

Por su parte, la patología venosa no se queda atrás en cuanto al impacto en la salud mundial, la trombosis venosa profunda representa la primera causa de morbimortalidad prevenible en pacientes hospitalizados; la complicación más grave es la Tromboembolia pulmonar, catalogada como la tercera causa de muerte vascular después de la cardiopatía isquémica y el evento vascular cerebral; representando el 5% de muertes totales en la población mundial. Además, el uso continuo de venas en técnicas quirúrgicas de tipo arterial y debido al propio entendimiento de las manifestaciones clínicas de la enfermedad venosa, se ha hecho hincapié en la importancia de estudiar de igual manera el funcionamiento de la pared de las venas, su respuesta al estímulo quirúrgico y complicaciones pos procedimientos <sup>3</sup>.

Para tratar de entender la fisiopatología de la enfermedad cardiovascular, es necesario remontarse a los elementos anatómo-fisiológicos que se ven implicados en la enfermedad vascular oclusiva crónica. La estructura de los vasos sanguíneos está determinada por 3 componentes principales: el elemento más interno se denomina íntima, una capa media o muscular y la porción más externa se llama adventicia. El endotelio vascular es el recubrimiento celular especializado ubicado en la capa íntima, en contacto e interacción con el torrente sanguíneo. Se encarga

de complejos sistemas de regulación del tono vascular, agregación plaquetaria, coagulación, flujo sanguíneo, respuesta a estrés intra y extravascular, expresión de diferentes sustancias y además funciona como barrera física, separando los elementos de la sangre de las moléculas que componen la matriz interna. Las células endoteliales producen moléculas de adhesión que interactúan con el citoesqueleto intracelular, permitiendo el intercambio selectivo de moléculas entre la sangre y el tejido vascular. El endotelio de igual manera sintetiza anticoagulantes (por ejemplo, heparina, trombomodulina, prostaglandina I<sub>2</sub> [PGI<sub>2</sub>] y el factor de transcripción Kruppel-2) para mantener una superficie luminal libre de trombos. También es responsable de la expresión de vasodilatadores como la PGI<sub>2</sub> y el óxido nítrico (ON), sustancias que controlan la activación, adhesión y agregación plaquetaria. Es importante señalar, que el ON inhibe la secreción de mediadores químicos y moléculas de adhesión de células inflamatorias, incluyendo la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1). Se han descrito más de sesenta funciones del endotelio vascular, sin embargo, algunas reacciones específicas, son las que jugarán un papel importante en la fisiopatología de la hiperplasia neointimal <sup>4-6</sup>.

Por su parte, la capa media venosa está conformada por células de músculo liso (CML), en menor cantidad, comparada con el sistema arterial. La estructura y función de la capa media están regulados por diferentes mecanismos encaminados en mantener un bajo índice de migración celular, proliferación y apoptosis (estado quiescente). Por ejemplo, el factor de crecimiento de transformación- $\beta$  disminuye la mitogénesis de las CML y así estabiliza la matriz extracelular. Además, la heparina del endotelio neutraliza el factor de crecimiento de fibroblastos para de igual manera, regular la proliferación celular. Las lesiones o cambios en dichos ambientes, pueden aumentar las tasas de proliferación, migración, diferenciación o apoptosis de las células que le conforman <sup>7</sup>.

La adventicia es la capa más externa de la pared vascular y generalmente es más gruesa en venas de mayor calibre. Las células del músculo liso de la capa media, orientadas longitudinalmente se intercalan con fibras de colágeno y elastina en esta capa. En comparación con la *vasa vasorum* de las arterias correspondientes, es

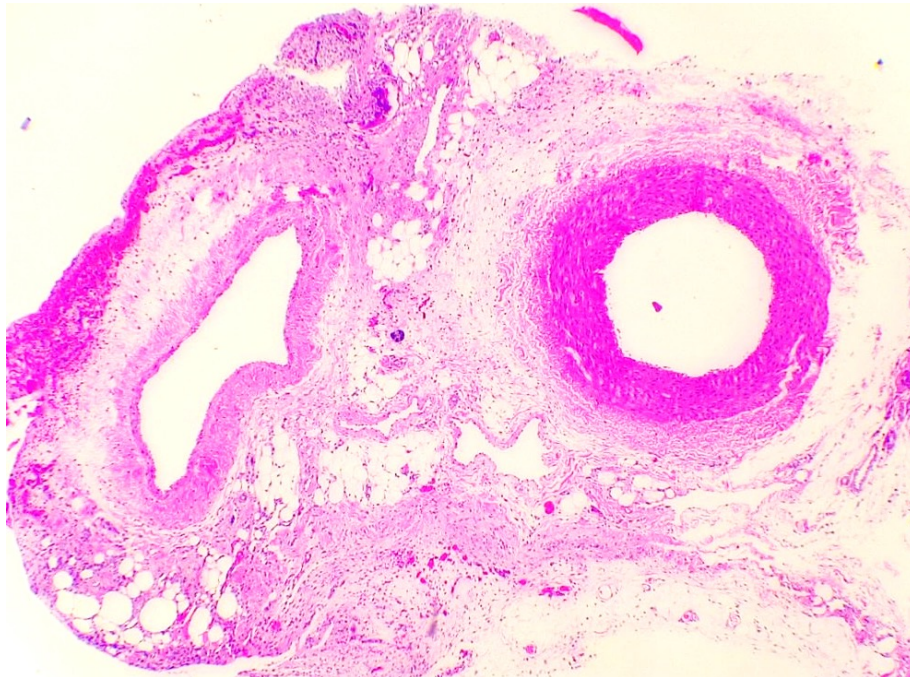
mucho más extensa en las venas, posiblemente por la tensión de oxígeno que es menor en la sangre venosa <sup>8</sup>.

Estas conformaciones estructurales, dotan de características propias a las venas respecto a las arterias, otorgándoles el atributo de vasos de capacitancia. Una vena relajada puede aumentar su diámetro en un 200% como respuesta a un discreto aumento en la presión transmural de 0 a 10 mmHg. Este aumento refleja un cambio en la geometría venosa, cambiando de una forma elipsoidal con paredes casi coaptadas a una circular, ampliando enormemente el área de sección transversal e incluso la longitud del vaso. La diferencia entre la presión intraluminal que actúa para expandir una vena y la presión tisular que actúa para colapsarla se denomina presión transmural. La abundancia de colágeno en la adventicia y la falta de elastina en la media, hacen de las venas un reservorio capaz de albergar el 60% al 80% del volumen sanguíneo total <sup>9</sup>.

Los cambios en la capacidad venosa se modulan pasivamente (por distensión y retracción), y activamente (por cambios en la actividad de los músculos lisos de las paredes de las venas). La actividad del músculo liso es, a su vez, controlada por el sistema nervioso simpático <sup>10</sup>. En condiciones fisiológicas, el flujo sanguíneo venoso es laminar y genera en promedio 1 a 6 dinas/cm<sup>2</sup> de fuerza de cizallamiento sobre la pared, difiriendo de las arterias, donde el flujo genera fuerzas de 15 dinas/cm<sup>2</sup>. Las células endoteliales detectan esta fuerza de cizallamiento fisiológico, liberando mediadores como el ON y el factor 2 de Kruppel para mantener en reposo a las células del músculo liso y así la homeostasis de toda la pared del vaso. Por ende, una fuerza de cizallamiento baja, acelera el crecimiento y grosor de la íntima, ya que las células endoteliales responden a estas condiciones hemodinámicas elaborando moléculas de adhesión, citocinas proinflamatorias y otras sustancias bioactivas que aumentan la proliferación celular y la acumulación de matriz extracelular. Por otro lado, el aumento del flujo sanguíneo en los vasos con una capa íntima engrosada ya establecida, induce la regresión intimal. Aunque los mecanismos exactos aún no se han dilucidado por completo, estudios experimentales sugieren que una fuerza de cizallamiento alta cambia los mediadores celulares de un estado proinflamatorio a uno antiinflamatorio, regulando

la diferenciación del crecimiento intimal. En la anatomía venosa, es esperada una fuerza de cizallamiento baja, y esta condición fisiológica del flujo, puede ser una de la condicionantes por las cuales, los procedimientos quirúrgicos de reconstrucción venosa tienen menores tasas de permeabilidad comparados con los procedimientos arteriales. Sin embargo, no parece ser el único mecanismo implicado en el crecimiento de la capa íntima venosa <sup>5,11</sup> (Figura 1).

**Figura 1.** Diferencias histológicas entre una arteria y una vena.



Corte transversal de segmento de vena y arteria femorales de un conejo de Nueva Zelanda con tinción de H&E (aumentada 40 veces). Se observan las diferencias morfológicas entre la vena (a la izquierda) y la arteria (a la derecha).

Cuando se pierde el equilibrio entre las funciones del endotelio, se activan complejos mecanismo encaminados a reparar la estructura y función vascular. Al crecimiento hacia la luz vascular de la capa íntima, se denomina hiperplasia intimal (HI); resulta de la migración y proliferación de células musculares lisas al espacio sub endotelial, así como deposición de componentes extracelulares en el sitio de lesión intimal. Esta respuesta aparece al haber cambios hemodinámicos en los vasos implicados; como respuesta a un mecanismo activador, por ejemplo, la



manipulación del endotelio o el barotrauma <sup>12</sup>. Se estima que las lesiones hiperplásicas se presentan en 5 al 30% de las reconstrucciones terapéuticas vasculares invasivas, incluyendo la angioplastia, y representa la principal causa de falla de un procedimiento de revascularización a mediano y largo plazo. La pérdida de luz vascular es proporcional a la proliferación del tejido de neoformación intimal y como resultado, afecta las tasas acumuladas de permeabilidad primaria para los procedimientos quirúrgicos y endovasculares. La tasa de reestenosis intra-stent después de una angioplastia coronaria es del 10% al 60%, en el sector ilíaco la permeabilidad disminuye al 76%, 59% y 49% a 1, 3 y 5 años respectivamente, debido a la hiperplasia intimal <sup>13</sup>. En el caso del bypass periférico, la tasa de reestenosis a un año es de 30%, y del 50% para la angioplastia en el sector femoropoplíteo<sup>14</sup>. En la endarterectomía carotídea o stents carotídeos la hiperplasia intimal se presenta en el 5.8% de los casos, a 1 año. Finalmente, el 60% de las fistulas arteriovenosas creadas como accesos vasculares para hemodiálisis, no maduran ya que los procesos obliterantes por hiperplasia cercanos a la anastomosis, se asocian con la mitad de estos fallos. De forma similar, la durabilidad de los injertos protésicos, sigue siendo deficiente debido justamente a la hiperplasia intimal en el flujo de salida <sup>15</sup>.

Aunque molecularmente este proceso comienza inmediatamente después de la lesión endotelial que acompaña al procedimiento quirúrgico, las manifestaciones clínicas o hemodinámicas aparecen semanas después <sup>16</sup>.

La HI es un fenómeno complejo cuya comprensión total aún no se ha logrado. Sin embargo, se ha identificado la participación de procesos inflamatorios, de citosinas estimulantes de crecimiento y proliferación celular (como Interleucina uno beta [IL-1 $\beta$ ], factor de necrosis tumoral- $\alpha$  [FNT- $\alpha$ ], Factor de crecimiento derivado de plaquetas [PDGF], factor de crecimiento transformante- $\beta$  [TGF- $\beta$ ], factor inducible por hipoxia [HIF-1 $\alpha$ ] y de quimiocinas, por ejemplo, IL-8 y proteínas monocíticas quimioattractivas [MCP]), disfunción endotelial, diferenciación y migración de células de músculo liso (CML), así como cambios transcripcionales en diferentes grupos celulares.

## **Fisiopatología de la Hiperplasia Intimal**

La hiperplasia intimal es un proceso sumamente complejo que involucra varios tejidos (perivascular, pared vascular y sangre), numerosas líneas celulares y múltiples vías de interacción molecular. Aunque mucho se ha aprendido en las últimas décadas, aún no se comprende del todo este fenómeno. El paradigma actual se basa en el postulado de que la hiperplasia intimal es una respuesta vascular a la lesión, con eventos celulares y moleculares similares a la cicatrización de heridas en otras regiones del organismo <sup>17</sup>.

Cuando un vaso se manipula o se somete a una fuerza de sobre expansión, se produce una ruptura celular denominada denudación endotelial y ocurre además un cambio en la geometría del vaso; el cual, en las venas va de una forma elipsoidal a una circular y posteriormente a una elongación de la vena. Al someterse a presión, el endotelio rompe su estructura aislante, hay muerte celular y contracción de las células sobrevivientes, lo que permite el contacto de elementos del torrente sanguíneo con la matriz extracelular (capa donde descansan las células endoteliales e implicada en la respuesta proliferativa) <sup>18</sup>. La denudación o disfunción endotelial da como resultado una reducción de factores antitrombóticos (por ejemplo, ON, prostaciclina, y activador del plasminógeno tisular), expresión de moléculas de adhesión para monocitos, macrófagos y plaquetas. Éstas últimas cuando se activan, liberan varios mediadores vasoactivos tales como la serotonina y el tromboxano A<sub>2</sub>, que a su vez estimulan la proliferación de CML <sup>19</sup>. La inflamación producida por monocitos, aumenta la cantidad de proteínas quimiotácticas, moléculas de adhesión, interleucinas y proteína C reactiva. Las CML expresan proteínas promigratorias como metaloproteinasas de matriz (MMP), especialmente MMP-2 o MMP-9, que sirven para degradar colágeno, fibronectina, laminina y fibrina reticulada; de esta manera las CML puedan migrar de la media a la íntima <sup>20-22</sup>. Además de la migración de CML provenientes de la túnica media, se han identificado células de otros sitios como la adventicia, el tejido perivascular, células madre provenientes de médula ósea y células inflamatorias. Una vez reclutadas en la lesión intimal, obtienen un fenotipo similar al de las células del músculo liso mediales, haciéndolas indistinguibles unas de otras.

Como resultado de estos procesos, la hiperplasia neointimal se forma mediante proliferación y migración de CML a la íntima, así como síntesis de una nueva matriz extracelular <sup>23</sup>. Existen genes que codifican componentes de la matriz (proteínas como ácido hialurónico, condroitina, colágeno, proteoglicanos, fibronectina y elastina) que estarán expresados de forma exponencial en dichas circunstancias. Por otro lado, la producción y la actividad del sistema de degradación de la matriz, que consta de proteasas (por ejemplo, MMP, plasminógeno tisular y activador del plasminógeno urinario), disminuye para favorecer una acumulación de una matriz intersticial *de Novo*, con una composición alterada <sup>24</sup>.

La trombosis y la inflamación se producen 1 a 5 días después de la angioplastia (trauma vascular), la proliferación de células de músculo liso alcanza su pico máximo en 7 a 14 días. Todo el proceso de reestenosis tarda aproximadamente 6 meses después de la lesión inicial. Estudios experimentales han demostrado que la proliferación de mediadores inflamatorios puede comenzar pocas horas después del trauma, alcanzar un pico en pocos días y durar de semanas a meses. El perfil exacto de estos mediadores varía según la etapa de desarrollo de la hiperplasia y pueden actuar sobre las propias células musculares lisas y en otros grupos celulares a través de funciones autocrinas y/o paracrinas. Por ende, dichos factores se pueden dividir en tempranos y tardíos: los mediadores tempranos sirven para amplificar la respuesta inflamatoria y favorecer la migración y proliferación celular, mientras que los tardíos (liberados por las células del músculo liso ya en la neoíntima establecida), facilitan el proceso fibrótico. Ejemplos de tales mediadores son: Citoquinas (Interleucina uno beta [IL-1 $\beta$ ], factor de necrosis tumoral- $\alpha$  [FNT- $\alpha$ ]), Factor de crecimiento derivado de plaquetas [PDGF], factor de crecimiento transformante- $\beta$  [TGF- $\beta$ ], factor inducible por hipoxia [HIF-1alpha]) y quimiocinas (por ejemplo, IL-8 y proteínas monocíticas quimioattractivas [MCP]) <sup>25-27</sup>.

Además de la migración, el fenómeno de proliferación, se genera por una mitosis acelerada de CML y una producción igualmente acelerada de matriz extracelular. Durante el desarrollo de la hiperplasia de la íntima, las células del músculo liso también presentan fluctuaciones de expresión o inhibición de marcadores de diferenciación celular, los cuales varían en diversas etapas de la hiperplasia,

cambiando la característica contráctil de dicha línea celular, a un estado proliferativo y sintético, para terminar en un estado fibroso. A diferencia del tejido fibrótico reactivo de una cicatriz, formado principalmente de fibroblastos, las lesiones vasculares de la íntima expresan marcadores inmunohistoquímicos de músculo liso, tales como  $\alpha$ -actina y cadenas pesadas de miosina de músculo liso (SM-MHC). Como consecuencia, estas células pueden perder sus proteínas contráctiles a través de la des diferenciación celular y adquirir un fenotipo de miofibroblastos (forma no contráctil), debido a un aumento en la expresión de las proteínas c-Fos y c-Jun<sup>28</sup>. El proceso inicial de des diferenciación celular conduce a una pérdida de expresión de la mayoría de los marcadores de diferenciación previamente mencionados (tales como  $\alpha$ -actina, desmina e isoformas de músculo liso SM1 y SM2). Una vez establecidos los miofibroblastos, probablemente actúen como reguladores de diversas sustancias bioactivas, modulando el remodelado estructural y el crecimiento de la íntima en la pared del vaso. Durante más de 50 años, se ha creído que la diferenciación entre células de músculo liso de tipo sintético y contráctil como respuesta al trauma, se debe a la desdiferenciación celular de líneas maduras, y en raras ocasiones, por células madre provenientes de la médula ósea o que residen en los propios vasos. Sin embargo, Tang y colaboradores<sup>29</sup>, postulan una teoría donde, posterior a la lesión vascular, la mayoría de las formas maduras de CLM mueren, y sólo una pequeña población (<10%) sobrevive para activar el proceso de desdiferenciación y proliferación. Por lo tanto, postulan que, mientras la mayoría de formas maduras de CML desaparecen, una forma celular no identificada previamente, presentes en las tres capas de los vasos, denominadas células madre vasculares multipotenciales derivadas de la media (dependiendo de la expresión de factores de crecimiento), que se diferenciarán en CML sintéticas, contráctiles, o en otras líneas celulares; encaminadas a la reparación del vaso lesionado.

De forma complementaria, la lesión vascular por barotrauma, activa otros caminos de respuesta celular. Las plaquetas que se agregan al endotelio activado para cubrir los sitios de colágeno y otros componentes de la matriz expuestos al torrente sanguíneo, promueven el depósito de fibrina, formando una superficie adhesiva

para capturar células inflamatorias circulantes, por ejemplo: monocitos, eosinófilos y células T<sup>30</sup>.

Este proceso de agregación celular es de gran importancia, ya que las células inflamatorias han sido identificadas como orquestadores “clave” del engrosamiento de la íntima hiperplástica. Por ejemplo, se ha demostrado una correlación entre el recuento de leucocitos en sangre y la presencia de hiperplasia intimal. Las estrategias (endógenas o exógenas) encaminadas a bloquear la adhesión de los leucocitos o crear leucopenia, inhiben significativamente el engrosamiento intimal en diversos contextos experimentales. A través de su gran capacidad para producir mediadores inflamatorios, incluyendo quimiocinas, citocinas y factores de crecimiento; los leucocitos amplifican la inflamación aguda, contribuyendo al engrosamiento de la íntima.

La cantidad de cada subconjunto de leucocitos, puede estar determinada por la participación de factores iniciadores específicos y la etapa de la lesión, ya sea temprana o tardía. Por ejemplo, en infiltrados puramente inflamatorios, después de una lesión endotelial moderada, la prevalencia es de neutrófilos. Por su parte, las células T estimulan la hiperplasia intimal tardía a través de la promoción de una respuesta celular tipo 1, mecanismo significativo en la patogénesis de aloinjertos trasplantados<sup>31</sup>.

Los monocitos, al extravasarse, se pueden diferenciar en macrófagos M1 y M2, desempeñando papeles distintos en la patogénesis y la reparación de tejidos. Por ejemplo, la polarización M2 de los monocitos es indispensable para el remodelado arterial provocado por el estrés hemodinámico.

Debido a la complejidad de sucesos, para estudiar el efecto de la lesión endotelial, muchos investigadores han recurrido a modelos experimentales, intentado variados métodos para crear lesiones mecánicas o químicas<sup>32</sup>. Masuda et al. Realizó un estudio experimental en arterias carótidas de conejos, produciendo barotrauma mediante angioplastia; cuatro semanas después de la denudación, demostró la presencia de un grado importante de hiperplasia intimal<sup>33</sup>. Lu et al. Utilizó un catéter especialmente diseñado para desnudar el endotelio sin dañar otras estructuras, por ejemplo, la matriz extracelular. Las arterias mantuvieron una función normal

después de la denudación, pero desarrollaron hiperplasia intimal<sup>34</sup>. De esta manera se ha demostrado que el daño endotelial es el único evento dominante que causa hiperplasia. Los estudios anteriores también mostraron cómo los diferentes estímulos mecánicos y el daño luminal vascular cambian la actividad y expresión de las MMP. El aumento de la presión transmural (debido a una angioplastia, por ejemplo), induce la actividad de MMP-2 y MMP-9<sup>35</sup>. El flujo sanguíneo bajo también aumenta la actividad de MMP-9<sup>36</sup>.

El ERK 1/2 es una cinasa de regulación de señal extracelular, del tipo MAP quinasa (cinasa de proteína activadas por mitógenos), que puede ser activada por fuerzas mecánicas, especialmente presión aplicada en los vasos o estiramiento cíclico<sup>37</sup>. Tal activación conduce a la expresión de proteínas reguladoras en el citoplasma y el núcleo celular, promoviendo la proliferación y diferenciación celular<sup>38</sup>. Esto sugiere que la activación de ERK 1/2 por fuerzas mecánicas tiene un papel importante en el desarrollo de HI y marca otro camino para la diferenciación genética de las células de músculo liso<sup>39</sup>.

### **Remodelación de la pared vascular y cambios geométricos de los vasos**

Además del engrosamiento de la íntima, los vasos sanguíneos pueden cambiar permanentemente sus dimensiones originales después de una intervención terapéutica. Este cambio se denomina remodelación de la pared. Por ejemplo, las arterias coronarias crecen activamente para aumentar su área transversal y así compensar la estenosis de lesiones ateroscleróticas. Como resultado de esta expansión compensatoria, puede mantenerse eficazmente la permeabilidad del vaso. El proceso de remodelación implica una reorganización de las capas media y adventicia. De forma contrastante, la remodelación también puede proceder en dirección opuesta y promover la contracción de la pared hacia la luz con la consecuente pérdida del espacio intraluminal<sup>40</sup>.

Las fuerzas hemodinámicas, particularmente la fuerza de cizallamiento y la tensión de la pared, son moduladores primarios del proceso de remodelación vascular. Una fuerza de cizallamiento elevada, por ejemplo, produce una expansión o crecimiento hacia fuera del vaso, mientras que una reducción en la fuerza de cizallamiento

promueve el "encogimiento" o el crecimiento concéntrico <sup>5,41</sup>. Por lo general, la tensión de la pared es un factor que favorece un proceso de remodelación negativo. Cuando se combina con la Hiperplasia intimal, la remodelación de la pared puede mejorar o exacerbar el estrechamiento luminal a través de su efecto sobre la dimensión del vaso <sup>42</sup>.

Por otro lado, las fuerzas hemodinámicas locales y la activación nerviosa, pueden ajustar el tono vascular a través de la vasoconstricción y vasodilatación. Un aumento persistente del tono vascular puede conducir a cambios estructurales permanentes. La contracción pasiva de la matriz de colágeno y elastina, es también un determinante crítico del diámetro del vaso; por tal motivo, después de la distensión sistólica, los vasos regresan a sus dimensiones originales como resultado de la contracción elástica. Este fenómeno se denomina retroceso vascular. En la pared del vaso, los componentes estructurales intactos y bien organizados, así como la sangre, contrarrestan la contracción de la pared causada por el retroceso vascular. En los casos en que se destruye la integridad de la pared, como en la angioplastia, el retroceso puede causar el 50% de pérdida de la ganancia aguda durante la dilatación. Las venas se caracterizan por presentar índices mayores de retroceso pos angioplastia, comparado con las arterias <sup>42-45</sup>.

Las venas *in vivo* se someten no sólo a la presión y al flujo sanguíneo, también a un estiramiento axial resultante del movimiento del cuerpo, y otras condiciones no patológicas como el embarazo, el aumento o la pérdida de peso, el crecimiento o la realización de procedimientos quirúrgicos vasculares <sup>46</sup>. A medida que las tensiones mecánicas producidas por el flujo y la presión causan un cambio significativo en la morfología y función vascular, el estiramiento longitudinal puede causar estrés mecánico significativo y conducir a cambios funcionales del endotelio y contribuir también al desarrollo de hiperplasia <sup>47,48</sup>.

### **Medición de la hiperplasia intimal**

En los cortes histológicos vasculares, se pueden realizar dos tipos de mediciones de acuerdo al crecimiento de la capa íntima: morfometría y densitometría. La morfometría tiene como objetivo realizar mediciones geométricas de regiones

visibles en una imagen histológica. Mediante ésta aproximación se pueden obtener valores acordes al sistema métrico, principalmente en milímetros o micrómetros. Es posible establecer el diámetro externo e interno en un corte transversal de un vaso sometido a barotrauma, así como el tamaño de la neoíntima. Dichas mediciones han sido utilizadas en diferentes modelos experimentales de hiperplasia intimal<sup>43-45</sup>. Actualmente, mediante la ayuda de programas computacionales, se pueden expresar en unidades del sistema métrico internacional los resultados obtenidos, que estarán expresados en unidades de píxel<sup>49</sup>.

La densitometría por su parte, permite medir la cantidad de luz que absorbe un material: dicha cantidad de luz puede estar determinada por ciertas tinciones encaminadas específicamente a resaltar el color de un elemento. La inmunohistoquímica (IHQ), es una técnica de tinción de anticuerpos marcados, que permite demostrar una variedad de antígenos presentes en las células o los tejidos, basándose en la capacidad de los anticuerpos para unirse específicamente a los correspondientes antígenos; al juntarse provocarán una reacción que se hará visible, debido a que el anticuerpo estará previamente marcado con una sustancia que absorbe o emite luz o que produce coloración. La actina es un ejemplo de marcador inmunohistoquímico utilizado para identificar células musculares en cortes histológicos vasculares; es una proteína presente en las células de músculo liso contráctiles y en fase G0 o no proliferativa. Se expresa además en otras líneas celulares como miofibroblastos, pericitos, las células glómicas y las células mioepiteliales; es por tanto un marcador muy sensible para detectar diferenciación hacia músculo liso y miofibroblastos, en zonas de hiperplasia. Después del barotrauma, como ya se ha mencionado, la CML se tornará fibrosa, migrante y proliferativa, disminuyendo la cantidad de actina presente en su citoplasma. Teniendo en cuenta que existen 2 formas maduras de CML: una contráctil (de forma alargada y con múltiples filamentos de actina) y una sintética (de forma redondeada y con múltiples organelos secretores); se ha observado que, a menor cantidad de actina, mayor será la proliferación de CML. Dicho en otras palabras, la Actina parece disminuir la proliferación y migración celular mediante la inhibición de proteínas de la familia RAC1.<sup>50</sup> Los mecanismos implicados para tal proceso sugieren que, al



disminuir la actina, aumenta la actividad de cinasas de adhesión focal y aumenta la expresión del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) – beta en las células musculares lisas. Aunque existen diferentes marcadores para tinción de estructuras musculares, la actina se hace visible en etapas tempranas de hiperplasia intimal, a diferencia de la cadena pesada de miosina (SM-MHC) que se presenta en etapas maduras, y que es negativa para células madre vasculares multipotenciales derivadas de la media <sup>51</sup>.

El factor de crecimiento derivado de Plaquetas (PDGF) es un dímero de dos cadenas polipeptídicas y cinco isoformas (A, B, C, D y un heterodímero AB) que se une a dos tipos de receptores: alfa y beta. Diferentes células mesenquimales cuentan con dichos receptores, ya que el PDGF se encarga de estimular la proliferación del tejido conectivo, por ejemplo, células de músculo liso ubicadas en la capa media o provenientes de otros sitios <sup>52</sup>. Desde que se denuda el epitelio secundario a trauma y las plaquetas se agregan para tapar dichos sitios lesionados, los gránulos plaquetarios secretan tal factor de crecimiento. Durante la angiogénesis y la hiperplasia intimal, el PDGF, además, estimula la migración y proliferación de pericitos y células de músculo liso. La isoforma Beta del PDGF, ha mostrado tener efectos regulatorios positivos en las formas contráctiles de CML, tanto en propagación, migración y expresión genética. Se relaciona además con mayor cantidad de Actina en etapas tardías de la respuesta hiperplásica, de tal manera que en etapas tempranas (una semana), habrá menos células contráctiles y mayor número del subtipo sintético <sup>53</sup>.

Recientemente, se ha establecido una relación entre factores de crecimiento y la expresión de agentes promotores de angiogénesis o hiperplasia secundarios a hipoxia. Posterior a una angioplastia, al activarse diferentes vías de respuesta a estrés, la demanda de oxígeno aumenta, y puede haber un periodo similar a la hipoxia. Además, la estasis sanguínea, la marginación, rodamiento y adhesión de leucocitos al endotelio, así como la compresión de los tejidos secundaria a edema, contribuyen a dicho fenómeno <sup>54</sup>. Los factores inducibles por hipoxia (HIFs) son elementos transcripcionales nucleares heterodiméricos, que consisten de dos subunidades que regulan la transcripción de los genes relacionados con la

respuesta homeostática celular, en consecuencia, a la oxigenación alterada. La subunidad HIF-a (HIF-1a y HIF-2a) y HIF-b se expresan en el núcleo de las células afectadas. El HIF-1alpha se expresa en todas las células, mientras que la expresión de HIF-2alpha está restringida a algunos tipos celulares específicos, incluyendo células endoteliales vasculares, células intersticiales renales, hepatocitos, cardiomiocitos y astrocitos. En condiciones normales, las subunidades proteicas de HIF-a son hidroxiladas en residuos de prolina, por la acción de la enzima HIF-prolil hidroxilato (HPD). Para dicha reacción, las HPD requieren oxígeno y a-cetoglutarato como co-sustratos para catalizar una reacción en la cual, un átomo de oxígeno se inserta en el a-cetoglutarato para formar succinato y dióxido de carbono. Ésta hidroxilación es esencial para la síntesis de la proteína de Von Hippel-Lindau, que interactúa con la elongina C, facilitando el reclutamiento de un complejo de ubiquitina ligasa, que a su vez, marcará al HIF-alpha, para su degradación proteosómica<sup>55</sup>. A falta de oxígeno, no se puede llevar a cabo la función de la HPD, lo que permite la unión de HIF-1 y HIF-2 a los elementos sensibles de hipoxia, presentes en algunos genes (*Semenza et al.*, demostraron que el gen de la eritropoyetina tiene un elemento de respuesta a la hipoxia en su región promotora, desde esa fecha, se ha encontrado en más de cien genes); cambiando así la expresión genética de las células vasculares, manifestándose mediante un aumento de la migración, proliferación y apoptosis irregular en las células de músculo liso, así como el aumento en la expresión de factores de crecimiento derivados de otras células. Sin embargo, además del oxígeno, diferentes sustancias se han relacionado con la expresión de HIF-1 alpha, entre ellos, el PDGF<sup>56</sup>. En biopsias de cáncer invasivo de mama (neoplasia con alto grado de angiogénesis y diferenciación vascular), se ha demostrado una relación significativa entre la sobreexpresión conjunta de PDGF y HIF-1alpha, lo que demuestra su interacción en la angiogénesis de dichas neoplasias, pero no hay estudios al momento, encaminados a buscar su relación en hiperplasia intimal.

La importancia de estudiar e identificar agentes presentes en células estromales como la Actina, factores de crecimiento como el PDGF y de hipoxia como es el caso del HIF-1 Alpha; radica en la posibilidad de utilizarlos como “blanco” para dirigir

terapias antiproliferativas en el tratamiento de neoplasias, hiperplasia, inmunomodulación, promoción o inhibición de angiogénesis, entre otras<sup>57</sup>. En caso de encontrar inhibición en los niveles séricos de PDGF y HIF-1 por el uso de medicamentos como cilostazol y/o Paclitaxel, se abren nuevas vías de estudio y tratamiento sobre hiperplasia intimal, mismos que en un futuro pueden ser llevados a la práctica clínica.

### **Estrategias para inhibir el grado de hiperplasia intimal**

A pesar de que en la actualidad se han dado grandes avances tecnológicos relacionados al intervencionismo cardiovascular, la HI aún representa un problema sin resolución, las alternativas terapéuticas parecen únicamente medidas paliativas encaminadas a retrasar la morbimortalidad de los padecimientos vasculares, donde en realidad el órgano afectado nunca volverá a estar sano, e independiente a la técnica utilizada, todas las intervenciones estarán destinados a ocluirse debido a un crecimiento intimal pos procedimiento<sup>2-6, 58</sup>.

Se han utilizado diferentes medidas y algunos fármacos para tratar de reducir el riesgo de reestenosis después de procedimientos vasculares percutáneos. Disminuir la manipulación, por ejemplo, controlar los factores de riesgo, o inhibir alguna de las múltiples etapas del proceso de proliferación y migración celular, mediante la administración de diferentes sustancias, ya sea vía oral o intravenosa<sup>59</sup>. Los antiagregantes plaquetarios son un grupo de fármacos que, al inhibir la activación plaquetaria, bloquean el reclutamiento de células inflamatorias. El cilostazol es un antiagregante con efectos anti plaquetarios, vasodilatadores y antiproliferativos<sup>50</sup>. Es un inhibidor selectivo de la fosfodiesterasa III y promueve el aumento de adenosin monofosfato cíclico 3' - 5' (AMPc) en plaquetas y células de músculo liso (lo cual evita la activación de dichas células). Las propiedades farmacológicas del cilostazol estimulan la rápida regeneración de las células endoteliales, lo que inhibe la formación neointimal por dos mecanismos: bloqueo del crecimiento anormal de las células del músculo liso y el segundo consiste en mejorar la función endotelial mediante factores de crecimiento y regeneración del endotelio sintetizados a nivel local o a nivel hepático. Los resultados de varios estudios en

animales muestran que el cilostazol inhibe la hiperplasia intimal después de la angioplastia y/o colocación de stent. Se piensa que el efecto antiproliferativo es inespecífico para una variedad de factores como son: el factor de crecimiento derivado de plaquetas, la insulina, el factor de crecimiento 1 similar a la insulina y el suero <sup>60</sup>.

Además, el cilostazol tiene efectos pleiotrópicos; Inhibiendo la MAPK (proteína quinasa activadas por mitógenos) y el Anti oncogen p53, promueve la apoptosis intra placa. Ejerce un efecto anti-inflamatorio mediante la inhibición de la Integrina (Mac-1) de leucocitos, de forma directa, e indirectamente mediante la reducción de la P-selectina glicoproteína ligando-1 (estimulador de agregación leucocitaria) <sup>61-63</sup>.

Por su parte el Paclitaxel (Taxol) es un diterpenoide antineoplásico que inhibe la división celular y la migración de CML mediante la formación de microtúbulos anormalmente estables durante el ciclo celular y la mitosis, impidiendo además la despolimerización y organización celular, esencial para las funciones celulares. Actúa sobre la subunidad b-tubulina, lo que impide su desmontaje, interrupción de la mitosis y detiene el ciclo celular en la fase G2 y M. La detención de la división celular puede conducir a la apoptosis, así como necrosis de células de músculo liso. Al igual que el cilostazol, también inhibe la migración de CML por interacciones con el citoesqueleto y cuenta además con efectos antiproliferativos a través de L-arginina-dependiente de óxido nítrico, por unión a Mac-160 y proteína C quinasa. Mediante la inducción de síntesis de interleucina 12, puede contribuir a la inhibición inflamatoria <sup>66</sup>.

El efecto terapéutico de estos fármacos está condicionado a la eficiencia en su transporte y distribución en los tejidos. Al tratarse de una molécula lipofílica, el Paclitaxel es capaz de atravesar el extremo hidrófobo de la membrana plasmática celular en el endotelio y, por lo tanto, transportarse con mayor facilidad a través de la pared arterial. Por lo tanto, los fármacos utilizados para inhibir la hiperplasia intimal, deben ser lipófilos para una absorción eficiente. Por todos los atributos antes mencionados, los inmunomoduladores son medicamentos que se han utilizado y aprobado para recubrir dispositivos como balones de angioplastia y stents. Los dispositivos de angioplastia con liberación de fármacos (*Drug Eluting balloon: DEB*)

se comercializaron por primera vez en Europa en 2009 y desde entonces se han utilizado para el tratamiento de estenosis en el sector coronario, periférico y en fístulas arteriovenosas. El concepto de Stent liberador de fármacos (*Drug eluting Stent: DES*) surgió tras la creciente incidencia de reestenosis intra-stent (15-20%) en pacientes sometidos a tratamiento con dispositivos de andamiaje desnudos. Los Stents liberadores de fármacos están recubiertos de igual manera con medicamentos anti-proliferativos (como Paclitaxel), que se entregan a la pared arterial al desplegarse <sup>67</sup>.

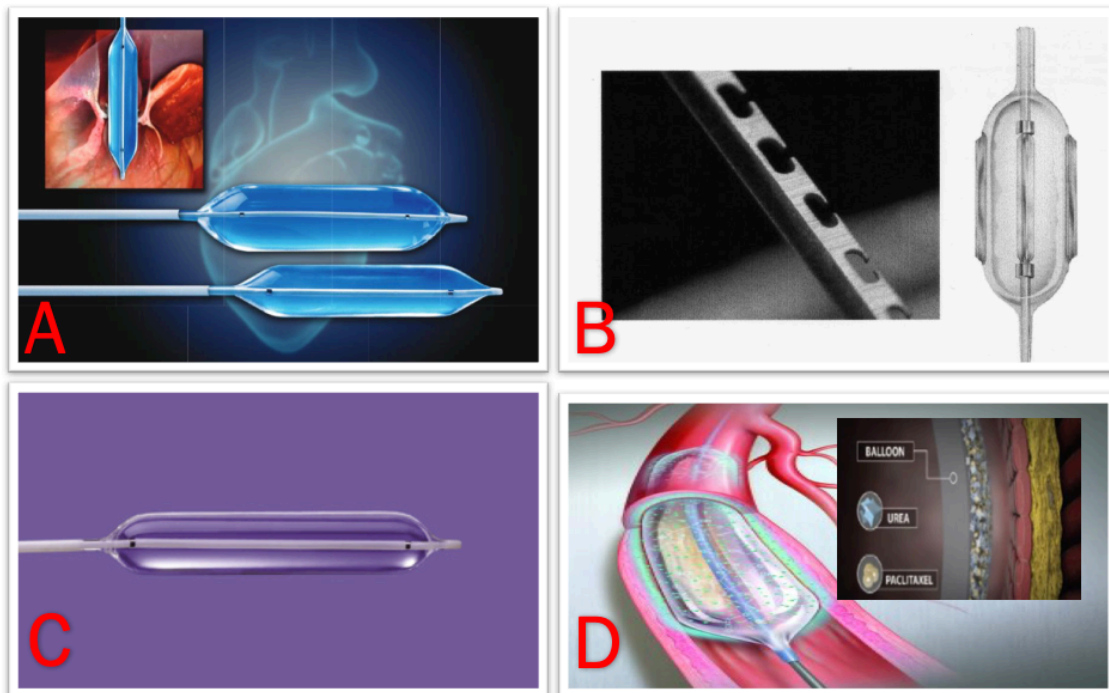
Hasta ahora, el uso clínico de DEB se ha centrado principalmente en escenarios en los que la implantación de stents no es deseable o efectiva. Los datos más alentadores con DEB han sido en las arterias coronarias, para el tratamiento de la reestenosis intra-stent; y en menor medida en vasos periféricos grandes. La terapia con DEB para la arteriopatía periférica se puede categorizar de acuerdo a dos "regiones" arteriales: femoropoplítea y debajo de la rodilla. Los resultados de los ensayos clínicos para los primeros han sido positivos, mientras que los de los últimos son menos concluyentes.

El uso de angioplastia medicada también ha jugado un rol positivo en el tratamiento de estenosis en fístulas arteriovenosas (FAV) para hemodiálisis. Se ha reportado una permeabilidad del 70% para el uso de balones liberadores de fármacos vs 20% para angioplastia convencional a un año, en casos de estenosis primaria o secundaria. Se debe recordar, que las condiciones de flujo a nivel una fístula arteriovenosa están alterados, respecto a las condiciones hemodinámicas de una vena no arteriolizada, la fuerza de cizallamiento aumenta debido al flujo arterial. Cuando se realizan procedimientos quirúrgicos de derivación por oclusión venosa, el uso de FAVs aumenta la permeabilidad por dicho principio <sup>66</sup>.

La era endovascular, ha representado grandes ventajas para los pacientes y para los modelos de atención sanitaria. Son técnicas mínimamente invasivas, con menores tasas de hospitalización, complicación de heridas, sangrado, dolor pos procedimiento e incapacidad. Desde su aparición en 1999, el porcentaje de amputaciones por enfermedades vasculares ha disminuido del 32.2% al 5% en un periodo de 10 años <sup>69</sup>.

Además de la angioplastia convencional (primer método de terapia endovascular), se ha estudiado la efectividad de la crio-angioplastia, al uso de balones con cuchillas cortantes, balones de angioplastia con mayor presión y de forma más reciente, al uso de balones medicados con inhibidores celulares (como el Sirolimus y el paclitaxel) en caminados a reprimir el crecimiento y migración celular (Fig. 2).

**Figura 2.** Modalidades endovasculares para inhibir la hiperplasia intimal.



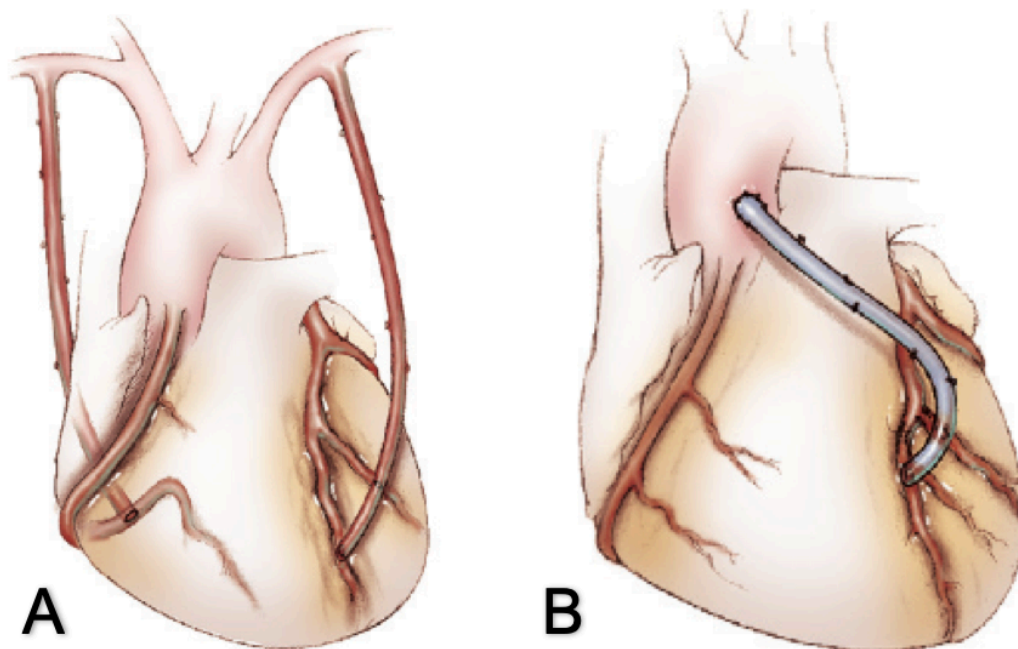
**A:** Imagen ilustrativa de la crio-angioplastia, mediante hipotermia se busca promover la apoptosis, dando menor disección y menor hiperplasia intimal. **B:** imagen ilustrativa de un balón cortante, adicionado con cuchillas cuya finalidad era destruir el tejido fibroelástico del anillo de neo íntima. **C:** balón ultra no compaciente, que puede aportar mayor fuerza tensional de inflado sin aumentar su diámetro. **D:** Imagen ilustrativa de un balón medicado con paclitaxel.

Los resultados de dichos estudios, a nivel coronario (primeros reportes desde el año 2002) y a nivel arterial periférico (sector iliaco, femoral y poplíteo [primeros reportes desde el año 2010]) cuentan con resultados prometedores para la inhibición de HI, a corto y mediano plazo, ya que podrían dotar de mayor longevidad a los procedimientos de revascularización y podrían disminuir la cantidad de intervenciones secundarias para perpetuar dicha permeabilidad. La Sociedad

Europea de Cirugía Vascul ar (ESVS, por sus siglas en inglés), en sus guías de 2017 sobre el tratamiento de la enfermedad arterial periférica, mencionan que el uso de balones medicados con Paclitaxel puede ser considerado como una opción terapéutica en la enfermedad oclusiva de la arteria femoral superficial.

Por otro lado, aunque las arterias y las venas comparten muchas características similares en su estructura y función, difieren en la cantidad de sangre circulante, capacidad de distensión y contracción, presiones intraluminales, respuesta adaptativa al estrés, entre otras. Dichas peculiaridades anatómicas y funcionales son determinantes en la cirugía vascular; por ejemplo, en los procedimientos de revascularización miocárdica, un injerto de arteria mamaria interna anastomosado a una arteria coronaria tiene mayor permeabilidad que un injerto de safena inversa (fig. 3).

**Figura 3.** arterias y venas como injertos en la revascularización



**A:** bypass coronario usando la arteria mamaria interna. Se han reportado tasas de permeabilidad primaria del 80% a 10 años después del procedimiento. **B:** bypass coronario usando la vena safena mayor inversa, cuyos reportes sobre permeabilidad primaria a 10 años de la cirugía son del 50%. Imagen modificada de: Deng DX, Spin JM, Tsalenko A, Vailaya A, Ben Dor A, Yakhini Z, et al. *Molecular signatures determining coronary artery and saphenous vein smooth muscle cell phenotypes: distinct responses to stimuli.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006;26:1058- 65.

Aunque se han realizado diferentes estudios con la finalidad de entender mejor la respuesta hiperplásica de los injertos venosos, existen pocos reportes sobre el estudio de la HI venosa en condiciones de flujo habitual. Es decir, la mayoría de estudios sobre HI venosa, son abordados como parte del tratamiento de la patología arterial y no como un fenómeno que se presenta en padecimientos propios de las venas, tales como: secuelas postrombóticas, flebitis, síndromes de compresión extrínseca, oclusión o estenosis venosa central, por mencionar algunos padecimientos.

Pese a la inequitativa evidencia sobre el estudio de la HI arterial y la HI venosa, diferentes terapias probadas en el sector arterial se están utilizando para tratar estenosis en el sector venoso, bajo una estrategia de similitud. El ejemplo más reconocido son las fístulas Arteriovenosas para hemodiálisis (FAVs). La FDA (*U.S. Food and drug administration*) en 2017 aprobó el uso de balones medicados con Paclitaxel para el tratamiento de estenosis venosas en FAVs. La ESVS, en sus guías de 2018 sobre accesos vasculares para hemodiálisis, mencionan que el papel de los balones medicados en el tratamiento de estenosis venosas en FAVs está siendo valorado y podría ser una alternativa costo-efectiva. Sin embargo, las condiciones hemodinámicas de una FAV difieren mucho al de una vena no arteriolizada, pues se sabe en base a estudios experimentales y clínicos que, a mayor estrés de cizallamiento (dado por el flujo pulsátil de las arterias), habrá mayor permeabilidad del vaso. Por otra parte, existen publicaciones que reportan el uso de angioplastia medicada para el tratamiento de estenosis venosa centrales con resultados que favorecen a la angioplastia medicada. Sin embargo, ensayos clínicos posteriores han obtenido resultados contrastantes, lo que sugiere diferencias en la respuesta de la pared venosa al Paclitaxel, respecto al sector arterial.

En 2015, el servicio de cirugía vascular del INCMNSZ inició una línea de investigación sobre la HI en venas de conejos de Nueva Zelanda, enfocada en identificar marcadores indirectos de estrés oxidativo y otros mediadores de fase temprana de este proceso fisiopatológico (los primeros 7 días después de generado el estímulo hiperplásico), conocidos como posibles blancos terapéuticos.



Una primera fase del estudio evaluó la factibilidad de generar HI venosa mediante realización de barotrauma por angioplastia en la vena femoral del conejo (procedimiento que genera distensión, mayor fuerza tensional y estiramiento de la pared venosa), obteniendo un grosor inicial mayor al 60% respecto a venas control. Se evaluaron los niveles séricos de PDGF, Endotelina-1 y HIF-1 alfa en tres periodos cronológicos diferentes (antes del barotrauma, a las 12 horas y 7 días después de la angioplastia), comparándose los hallazgos con el grupo control (sin angioplastia) y encontrando diferencias significativas entre ambos grupos.

En una segunda fase del estudio, se utilizó cilostazol (fármaco inhibidor selectivo de la fosfodiesterasa III que promueve el aumento de adenosin monofosfato cíclico 3'-5' [AMPC] en plaquetas y células de músculo liso, cuyos efectos son anti plaquetarios, vasodilatadores y antiproliferativos) en la inhibición de la IH venosa en el mismo modelo experimental de conejos de Nueva Zelanda comparado con placebo; obteniendo reducción significativa en el grosor de la HI en el grupo de cilostazol. Tales hallazgos sugieren una posible actividad reguladora del cilostazol en la respuesta hiperplásica temprana (primeros 7 días).

Estos resultados nos alentaron para continuar con dicha línea de investigación y comparar los efectos encontrados en el uso de cilostazol, contra el uso de Paclitaxel, fármaco que podría definirse como el tratamiento estándar para la inhibición de HI en el segmento arterial, cuyos mecanismos moleculares no han sido explorados del todo en el sector venoso.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo principal**

Comparar las mediciones en milímetros cuadrados de hiperplasia intimal en cortes histológicos de venas sometidas 7 días antes a barotrauma, entre un grupo de conejos medicados con Cilostazol y un grupo experimental al que se realizó angioplastia medicada con Paclitaxel.

### **Objetivos secundarios**

- Comparar el número de células marcadas mediante inmunohistoquímica con Actina de músculo liso (SMA) entre el grupo de cilostazol y el de Paclitaxel.
- Comparar el número de células marcadas mediante inmunohistoquímica con PDGF entre el grupo de cilostazol y el de Paclitaxel.
- Comparar el número de células marcadas mediante inmunohistoquímica con HIF-1alfa entre el grupo de cilostazol y el de Paclitaxel.

## **HIPÓTESIS**

### **HIPÓTESIS NULA**

En un modelo experimental de hiperplasia en venas femorales de conejos de Nueva Zelanda sometidas a barotrauma 7 días antes, la diferencia en la reducción del grosor de la hiperplasia intimal será igual o mayor a  $0.21 \text{ mm}^2$  entre cilostazol y Paclitaxel.

### **HIPÓTESIS ALTERNA**

En un modelo experimental de hiperplasia en venas femorales de conejos de Nueva Zelanda sometidas a barotrauma 7 días antes, la diferencia en la reducción del grosor de la hiperplasia intimal será menor a  $0.21 \text{ mm}^2$  entre cilostazol y Paclitaxel.

## 2. METODOLOGÍA

### Diseño del estudio

Ensayo clínico aleatorizado de no inferioridad.

### Modelo experimental

Clasificación taxonómica: Conejos de Nueva Zelanda.

Orden: *Lagomopha*, Familia: *Leporidae*, Género: *Oryctolagus*, Especie: *cuniculus*.

Edad adulta: 6 meses.

Edad para el protocolo: 7 meses a 1 año, peso: 3 a 4.5 Kg. Sexo: machos.

Especie caracterizada por ser un animal de tamaño medio, buen índice de crecimiento, dócil y fácil de manejar, apta para estudios multipropósito. Ya ha sido utilizado en modelos experimentales de tipo vascular, principalmente vasos del sector ilio-femoral y cervical, caracterizados por presentar un calibre similar a los vasos coronarios o vasos tibiales en humanos. Además, las estructuras vasculares de los conejos presentan una reacción de hiperplasia intimal aceptable con características histológicas muy similares a las obtenidas en muestras humanas<sup>75</sup>. El grosor de la pared de las venas femorales de conejo tiene una media de 0.2mm<sup>2</sup>. En modelos de hiperplasia provocada por barotrauma, alcanza hasta 1mm<sup>2</sup> de grosor, con una media de 0.86mm<sup>2</sup>. Existen protocolos ya descritos para el abordaje quirúrgico, especificaciones del material endovascular para generar hiperplasia, etc. Pese a que se trata de una especie muy delicada, en el estudio del Dr. Laparra no se reportaron muertes antes del desenlace primario. Por su parte, el Paclitaxel, igualmente se han utilizado en conejos con fines de inhibición de hiperplasia, pero en el sector carotideo, mediante liberación directa del medicamento en la arteria y no sobre balones medicados, presentado no sólo el detenimiento del grosor de la íntima (2 micrómetros de la basal), de igual manera preservando la forma y contractibilidad del vaso. El modelo de hiperplasia intimal en venas femorales de conejos de Nueva Zelanda es novedoso. el desarrollador, Dr. Laparra, se apegó a la metodología descrita en modelos de hiperplasia intimal arterial, para lograr un modelo donde se pudo reproducir dicho fenómeno<sup>74</sup>.

Bioterio: Las condiciones ambientales del bioterio influyen de manera directa en el estado de salud del animal, por lo que es indispensable asegurar un adecuado control de temperatura, humedad relativa y horas luz – oscuridad de acuerdo a las necesidades de esta especie, basándose en la Norma Oficial Mexicana 062-ZOO, referente al uso y cuidado de los animales de laboratorio. Para el presente protocolo se utilizó el bioterio de la facultad de medicina de la UNAM.

Alimentación: El alimento se proporcionó en base a nutrientes balanceados para los requerimientos o necesidades esenciales de mantenimiento de la especie. El alimento comercial se presenta extrudizado de 120gr al día. La dieta consistió en:

Proteína cruda: no menos de 16%

Grasa cruda: no menos de 2.5%

Fibra cruda: no menos de 14 %

Cenizas: No menos de 8%

El agua potable y a libre demanda <sup>68</sup>.

Tiempo que duró el experimento para los conejos: 9 días. divididos de la siguiente manera;

- 1 día de preoperatorio (lunes): en el que 12 horas antes del procedimiento se les dió una dosis de cilostazol vía oral, a un grupo, y al otro grupo únicamente ayuno de 6 horas.

-Día de la cirugía (martes): toma de muestras sanguíneas, una vez sedado el modelo. Bajo anestesia, se realizó la incisión inguinal bilateral, el barotrauma, y se suturaron las heridas. Se vigiló la recuperación anestésica del conejo, y se administró analgésico postoperatorio horario. A las 6 horas del procedimiento se reanudó la vía oral, más el cilostazol según correspondiera.

-7 días de seguimiento posoperatorio (martes, una semana después): obtención de muestras sanguíneas, eutanasia del modelo y obtención de muestras histológicas

<sup>69</sup>.

## Intervenciones realizadas

Fase preoperatoria: se realizó una medición Antropométrica de los sujetos experimentales, así como medición de signos vitales, 12 horas y 30 minutos antes de la inducción anestésica. Ayuno de 6 horas, primera medicación con Cilostazol o placebo 12 horas antes para el grupo correspondiente Se realizó tricotomía de la región quirúrgica (femoral derecha e izquierda), ya que el animal se encontraba sedado <sup>70-72</sup>.

### Fase I:

Transportación: La sujeción del conejo se realizó tomándolo de la piel del dorso y la nuca con la mano derecha, mientras que con la izquierda se le sujetaba por los muslos, de tal manera que quedaba sentado sobre la palma de la mano izquierda con la finalidad de sostener el peso del animal (apegándose a la Norma Oficial Mexicana NOM-051-ZOO-1995, Trato humanitario en la movilización de animales) <sup>78</sup>.

### Inducción anestésica:

Fármaco	Mecanismo de acción	Dosis	Vía de administración	Duración	Observaciones
Xilacaina	Agonista $\alpha_2$	6 mg/kg	IM	30 – 45 mis	Sedante, analgésico y relajante muscular
Ketamina	Antagonista NMDAr	50 mg/kg	IM	20-30 mins	Produce profunda sedación y relajación muscular

### Manejo anestésico trans operatorio:

Fármaco	Mecanismo de acción	Dosis	Vía de administración	Duración	Observaciones
---------	---------------------	-------	-----------------------	----------	---------------

Pentobarbital	Barbitúrico	40 mg/kg	IV	40 – 50 min	Anestesia general
---------------	-------------	-------------	----	----------------	----------------------

La ketamina 20-40 mg/kg, se administró vía intramuscular (inyectada en el muslo del conejo). Se esperaron de 5 a 10 minutos a que se produjera el efecto del medicamento. Esta medicación permitió colocar al conejo sobre la mesa quirúrgica, y contar con acceso venoso mediante un catéter corto en la vena marginal de la oreja, misma que se canalizó con solución fisiológica, en un goteo para mantener vena permeable.

Segunda fase anestésica: se utilizó Pentobarbital sódico a dosis de 40 mg/kg intravenoso, administrando el 50% de la dosis total junto con la misma cantidad de solución fisiológica <sup>70-72</sup>. En este momento se vigilaron las constantes fisiológicas del conejo, reflejos (palpebral y pedal), tono muscular mandibular, y se determinó el plano anestésico hasta que el modelo llegó al tercer plano de anestesia (inconsciencia con pérdida progresiva de los reflejos, ventilación tóracoabdominal). Durante el procedimiento se cuidó que el modelo no presente hipotermia, problemas respiratorios, cardiovasculares, entre otros <sup>73,74</sup>. Se colocó al conejo en decúbito supino, se realizó antisepsia de la región a intervenir con Yodopovidona, colocación de campos estériles. Se realizó la toma de muestras sanguínea (tiempo 0) en la oreja, con una aguja de 22 *Gauges*, un total de 2 ml de sangre en la oreja y posteriormente se realizó el procedimiento quirúrgico, se infiltró además la zona quirúrgica con lidocaína al 1%, con 5 ml, subdérmico y posteriormente en el plano quirúrgico correspondiente, empezando por la incisión a nivel inguinal bilateral, por debajo del ligamento inguinal (referencia anatómica), para lograr una disección de la vena femoral. Bajo visión directa se realizó control vascular proximal y distal en un segmento de 2 cm de la longitud de la vena, punción en el área quirúrgica femoral con aguja de 24 *Gauges* e introducción de guía hidrofílica de 0.035 pulgadas, bajo visión fluoroscópica, ubicando la punta de la misma en vena cava superior y aurícula derecha. Posteriormente sobre la guía hidrofílica se introdujo balón de angioplastia de 20 mm de longitud x 4 mm de diámetro, hasta que la zona insuflable quedase completamente intravascular. Se realizó insuflación controlada a 14 ATM de presión

durante un tiempo de 3 minutos. En el primer grupo de conejos, el balón fue no recubierto con fármacos, con una disección de la vena femoral contralateral y punción como: “*sham surgery*” o barotrauma; según corresponda y toma de muestras cuando no fue posible obtener sangre suficiente por la oreja del modelo <sup>79</sup>.

En el segundo grupo se utilizó un Balón recubierto con Paclitaxel marca *Freeway*® (*Eurocore*, Alemania) y de la línea *Joker*® de balones no medicados. Se realizó de igual manera insuflación controlada a 14 ATM de presión durante un tiempo de 3 minutos, con la intención de provocar una lesión en el endotelio de la vena femoral, secundario a sobre distensión vascular <sup>80</sup>. Concluido dicho periodo de tiempo, se logra realizar una lesión aguda en el endotelio venoso por sobredistensión de aproximadamente 300% de su diámetro normal <sup>74</sup>. Posteriormente se desinfló el balón y se retiró de la vena en cuestión. Una vez retirados los instrumentos de trabajo bajo visión directa y fluoroscópica, se realizó una inyección intravenosa de medio de contraste no iónico diluido al 50% (5 ml) para verificar la permeabilidad del sistema venoso pulmonar y periférico. En todos los modelos fue necesario colocar un punto hemostático en el sitio de punción con sutura monofilamento de Polipropileno No. 8-0 (Ethicon, Somerville, NJ, Estados Unidos de América, círculo 6.5 mm y 3-8). Se verificó adecuada hemostasia y se afrontaron los planos de disección con sutura polifilamento de Ácido poliglicólico 4-0 en tejido celular subcutáneo y sutura monofilamento de Nylon 3-0 para piel (Ethicon, Somerville, NJ, Estados Unidos de América, círculo 6.5 mm y 3-8), no se cubrió el sitio quirúrgico, porque los apósitos resultaban molestos para el modelo una vez recuperado de la anestesia.

Como se mencionó, en el segundo grupo de conejos, se realizó el procedimiento con balones de angioplastia medicados con Paclitaxel a dosis de 3  $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ , cubiertos como excipiente por una resina natural llamada *Shellac*. Dichos balones ya han sido utilizados por *Drachman* y Cols. En modelos arteriales de hiperplasia intimal en conejos de Nueva Zelanda, obtenido una disminución de la hiperplasia a 7 días, 3 veces mayor, comparado con balones no medicados <sup>73</sup>.



Ya que la concentración de Paclitaxel que se absorbe por los tejidos es dependiente del tiempo de contacto con la pared del vaso, el periodo de insuflado también fue de 3 minutos <sup>80</sup>. De tal manera que ambos grupos fueron expuestos en una sola ocasión al barotrauma, bajo las mismas condiciones mecánicas.

**Fase II:** Se mantuvo vigilancia sobre el modelo hasta que recuperaba sus constantes vitales, de forma gradual y libre de excitación, hasta que fue capaz de levantar la cabeza e incorporarse a su actividad normal. Durante el seguimiento posoperatorio, los conejos se valoró la capacidad de incorporarse y permanecer en postura habitual y se aplicó una escala de valoración de signos de dolor, así como exploración diaria del estado de la extremidad intervenida (edema, cambios de temperatura, cambios de coloración, dehiscencia de sutura, entre otros). A las 6 horas posteriores a la angioplastia venosa se restituyó la vía oral. La analgesia posoperatoria se dio de la siguiente manera: Pos operatorio inmediato: buprenorfina 0.02 mg/kg subcutáneos, dosis única. Ocho horas después se inició Paracetamol a dosis de 100 mg/Kg cada 12 horas, vía oral, durante los primeros 3 días, y posteriormente en caso de identificarse signos de dolor: (anorexia, masticación anormal, excesiva masticación, renuencia al movimiento, postración, mordedura en las heridas, cambios de coloración en las heridas, postura anormal, anorexia, área rectal húmeda, lacerada, comportamiento anormal al defecar u orinar, etc.) <sup>81</sup>. En el grupo correspondiente, se reinició la administración oral de Cilostazol a 12 horas del posoperatorio, toda medicación bajo supervisión por parte del médico veterinario, a dosis de 20 mg/kg de peso, dividido en 2 tomas, una cada 12 horas, posología ya utilizada en otros estudios, y que no ha presentado efectos adversos (todas las dosis de medicamento fueron administradas vía oral con una jeringa directamente en la boca del conejo, vigilando que éste ingiriera el 100% de la dosis) <sup>82</sup>.

La evaluación del dolor se realizó cada 12 horas, y se tomó como escala de referencia el formato de criterios de punto final, el cual consta de una escala de 0 a 18 puntos, obtenidos de evaluar la apariencia física, alimentación e ingesta de agua, hidratación, comportamiento no provocado, respuesta de comportamiento a los

estímulos externos, y signos clínicos. Cuando se obtienen de 0 a 4 puntos, se llama al veterinario, considerando ajustes en la analgesia; puntajes de 5 a 9, requerirían de una monitorización más estrecha y de ajustes en la medicación, según recomendaciones del veterinario. Puntajes de 10 a 18 se tomó como punto final humanitario, y se realizaría eutanasia del modelo con Pentobarbital intraperitoneal a dosis de 90 a 210 mg/kg, vigilando hasta la ausencia de signos vitales (**Anexo 2**)

83

**Fase III:** análisis histopatológico. Para obtener la muestra tisular fue necesario realizar eutanasia del modelo y obtención de tejido mediante intervención quirúrgica, 7 días después del primer evento (tiempo en el que se da la mayor expresión de marcadores como: PDFG y HIF-1alpha, y tiempo en el que las células de Músculo liso migran a la íntima y expresan Actina de Músculo liso). Previo a la eutanasia, ya realizada la sujeción, sedación, analgesia y anestesia bajo el mismo protocolo del procedimiento previo; se realizó la última toma de sangre (en la oreja, con aguja de 22 Gauges, 2 ml de muestra). Bajo al mismo protocolo perioperatorio ya mencionado, se realizó una incisión quirúrgica bilateral, para obtener una muestra de la zona previamente trabajada de tejido, en ambas venas femorales en ambos grupos; para obtener un tejido no manipulado que sirvió de control para calibración de las mediciones morfométricas y densitométricas, así como para constructo de cambio en el análisis de resultados. Bajo la misma técnica quirúrgica de disección vascular, se realizó un corte circunferencial, para obtener una muestra de 2 cm de longitud y el tejido se colocó en un recipiente con formaldehído amortiguado (un litro contiene 100ml de formol, 4 gr de fosfato monobásico, 6.5 gr de fosfato dibásico y 900 ml de agua destilada). La eutanasia se realizó con el conejo bajo efectos anestésicos, con Pentobarbital diluido, intravenoso a dosis de 90 a 210 mg/kg, vigilando hasta la ausencia de signos vitales.

Disposición de cadáveres: Los desechos tales como cadáveres, tejidos, líquidos propios de los modelos, materiales punzocortantes, jeringas, agujas hipodérmicas, entre otros; considerados residuos peligrosos biológico- infecciosos, fueron

manejados y eliminados de acuerdo con la Norma NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, así como a la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente. Se tomó como manual operacional la guía de cumplimiento de la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 <sup>84</sup>.

Procesamiento de muestras: Se obtuvieron 2 muestras de tejido de cada modelo (derecha e izquierda), la muestra se insertó y cortó en tres o cuatro bloques de 2–3 mm utilizando la técnica descrita anteriormente. Después de la inserción en parafina, cada pieza se cortó en secciones de 4 micrómetros para el análisis histológico e inmunohistoquímico. Las muestras se evaluaron con tinción de hematoxilina y eosina (H&E) tinción de Masson. Fueron procesadas para su revisión histopatológica por 2 investigadores diferentes, quienes desconocían qué tejido se sometió a barotrauma y a qué grupo farmacológico correspondían. Para el análisis morfométrico se utilizaron las tinciones de Hematoxilina-eosina y para el análisis inmunohistoquímico se utilizaron anticuerpos Actina de músculo liso (SMA), HIF-1alfa y PDGF.

Se midió el área de la luz vascular (definida como: el área interna a la lámina elástica interna) y el área de hiperplasia intimal; en los cortes más representativos se tomaron fotografías a un aumento de 4x para hacer un tratamiento digital de cada una de ellas mediante un analizador de imágenes *Image J (National Institutes of Health)* y calibrado previamente un milímetro en pixeles, en cada fotografía. El resultado de la inmunohistoquímica se reportó por parte de 2 patólogos que realizaron un reporte cualitativo, de la siguiente manera: resultado negativo: total negatividad o menos del 50% de las células “diana” con menor intensidad que el control, resultado débilmente positivo: más del 50% de las células “diana” con menor intensidad que el control, resultado positivo: más del 50% de las células “diana” con mayor intensidad que el control. Se reportaron dichos hallazgos en las 3 capas de las venas <sup>85- 87</sup>.

Las muestras de sangre periférica obtenidas en el día cero (antes del barotrauma) y el día siete (obtención del tejido) para medir las concentraciones séricas de PDGF-BB y HIF-1alpha, fueron almacenadas a -80° pues en un segundo protocolo se

correrán los kits de *RayBio® Rabbit PDGF-BB ELISA* y *RayBio® Human HIF-1 alpha Western blot* (compatible para conejos de Nueva Zelanda), respectivamente<sup>88</sup>.

### **Tamaño de la muestra:**

Según reportes de *Kanamasa* y colaboradores<sup>25</sup>, el área intimal en el sector iliaco-femoral, de conejos de Nueva Zelanda, es de  $0.01 \text{ mm}^2$  con una desviación estándar de  $0.05 \text{ mm}^2$ . Basados en los reportes de *Kakuta* et al.<sup>73</sup> y el antecedente reportado por el Dr. Laparra<sup>74</sup>, se espera un crecimiento de hiperplasia de  $0.8 \text{ mm}^2$ , sin la intervención de medicamentos, una semana después del barotrauma. La reproducibilidad de dichos valores se corroboró con 4 modelos piloto, a los que se sometió únicamente a barotrauma sin acción de medicamentos, obteniendo valores dentro del rango reportado.

Se esperaba un crecimiento de hiperplasia intimal en el grupo de Cilostazol de  $0.5 \text{ mm}^2$ , con una desviación estándar de  $0.18 \text{ mm}^2$ , según resultados del Dr. Laparra.

- Se anticipa que la desviación estándar sea de  $0.18 \text{ mm}^2$ .
- El límite de no inferioridad entre cilostazol y Paclitaxel es una diferencia de  $0.21 \text{ mm}^2$ , considerando que dicha cifra corresponde al 30% de la distancia entre  $0.8 \text{ mm}^2$  y  $0.01 \text{ mm}^2$  y que un procedimiento de revascularización por angioplastia se considera exitoso cuando la estenosis o hiperplasia residual es igual o menor al 30%. De tal manera que el 30% sería una cifra hemodinámicamente y clínicamente determinante. Ya que no existen estudios que hayan comparado a ambos fármacos, el valor se obtuvo mediante los reportes de Kudo<sup>75</sup>, para el efecto de cilostazol en la inhibición de hiperplasia intimal, así como los reportes del Dr. Laparra<sup>74</sup>. Y para Paclitaxel; lo reportado por *Cremers*<sup>76</sup>, sobre el efecto de dicho fármaco en la inhibición de hiperplasia intimal en coronarias de modelos porcinos.
- Suponiendo un error de tipo I del 5% y 80% de potencia.
- La razón de asignación de 1, más 10% de pérdidas por cada grupo (2 conejos, que de no presentarse serían considerados como pilotos para calibraciones).

- 16 Conejos por Grupo
- N: 32 conejos

Se estimó un tamaño de muestra de 16 modelos por grupo, considerando un 10% de pérdidas por cada grupo (en caso de que el modelo presente algún evento considerado como criterio de eliminación durante los 9 días que dura el experimento).

Se utilizó la fórmula para no inferioridad de un ensayo con grupos paralelos, donde se pretende comparar dos promedios:

$$n = \frac{(r + 1)(Z_{1-\beta/2} + Z_{1-\alpha})^2 \sigma^2}{rd_E^2}$$

Donde  $n$  es el tamaño de muestra probabilidad.

$$r = 1$$

$$\sigma = 0.18$$

$$d_E = 0.21$$

$$\alpha = 0.05$$

$$\beta = 0.8$$

$$\underline{n = 14}$$

### Criterios de inclusión:

- Conejos de Nueva Zelanda Machos.
- Mayores a 7 meses y menores a 2 años.
- Peso entre 3 a 4.5 kilogramos.

### Criterios de Exclusión:

- Conejos con patologías agregadas al experimento.
- Antecedente de traumatismos en la región femoral.

### **Criterios de eliminación:**

- Modelos que murieran durante el desarrollo del protocolo.
- Que desarrollen patologías que alteren la hemodinámica drásticamente.
- Modelos que requieran eutanasia por presentar signos de sufrimiento tales como: pérdida de peso mayor a 25%, inapetencia o deshidratación por más de 48 horas, pilo erección, postura encorvada o pupilas dilatadas; por más de 3 días.
- imposibilidad para poder realizar el procedimiento de angioplastia, o para dar los medicamentos.
- Presencia de reacciones adversas a los medicamentos.

### **Definición y operacionalización de variables:**

<b>Variable</b>	<b>Definición teórica</b>	<b>Definición operacional</b>	<b>Tipo de variable</b>	<b>Indicadores</b>
Grosor de la capa intimal	Espacio comprendido entre el endotelio a la lámina basal interna	Medición entre el borde luminal del endotelio a la lámina basal interna.  Se determinó el mayor y el menor grosor de HI, de cada corte transversal.	Cuantitativa	Expresada en micras
Zona de mayor hiperplasia intimal	Al crecimiento la capa íntima, secundario a estrés.	Mayor grosor de la capa íntima expresada en milímetros cuadrados, del endotelio a la lámina basal interna	Cuantitativa	Expresada en micras

Área de Hiperplasia Intimal	Al crecimiento la capa íntima, secundario a estrés.	Borde delimitado trazando un ROI sobre la lámina basal interna, menos el área de la luz vascular.	Cuantitativa	Expresada en milímetros cuadrados
Área de la luz vascular	producto de $\pi$ por el radio (r) al cuadrado	Borde delimitado trazando un ROI alrededor de la luz venosa, tomando como referencia el borde luminal del endotelio venoso.	Cuantitativa	Expresada en milímetros cuadrados
Área de toda la vena	producto de $\pi$ por el radio (r) al cuadrado	Borde delimitado trazando un ROI sobre el borde externo de la adventicia, menos el área de la luz vascular.	Cuantitativa	Expresada en milímetros cuadrados
Expresión cualitativa Inumo histoquímica Con actina de músculo liso, HIF-1alfa, PDGF	Marcador molecular que se expresa en el citoplasma de las células de músculo liso, manifestada por una tinción característica	a) Resultado negativo: total negatividad o menos del 50% de las células "diana" con menor intensidad que el control, b) Débilmente positivo: más del 50% de las células "diana" con menor intensidad que el control	Cualitativa	a) Resultado negativo b) Resultado débilmente positivo c) Resultado positivo

		c) resultado positivo: más del 50% de las células “diana” con mayor intensidad que el control		
--	--	---	--	--

### **Aleatorización**

Los conejos fueron aleatorizados usando una secuencia aleatoria generada en el portal en línea <http://www.randomization.com>. El momento de la asignación fue pre quirúrgico mediante un muestreo probabilístico en conglomerados de 3 conejos por día quirúrgico.

### **Cegamiento**

Se realizó en la evaluación de resultados, tanto por el operador del equipo *Image J*, como de los patólogos que realizaron el reporte de inmunohistoquímica.

### **Análisis estadístico:**

Se compararon los valores basales de ambos grupos con las pruebas de T de Student, “U” Mann-Whitney y Chi cuadrada. La distribución de las variables se evaluó de acuerdo con las medias, desviación estándar, medianas y proporciones, se determinó la normalidad de los valores mediante el sesgo y la curtosis. Los resultados del área de hiperplasia intimal, se expresaron como media y desviaciones estándar y se calculó el intervalo de confianza al 95% (IC 95%). Para considerar no inferioridad, se calculó el IC 95% de la diferencia entre ambos fármacos y se comparó con el límite establecido. Se declaró no inferioridad si el intervalo era menor a 0.21mm<sup>2</sup>.

Los resultados de la inmunohistoquímica se compararon con la prueba de Chi cuadrada entre ambos fármacos, y la prueba de Kruskal-Wallis para comparar los fármacos y los controles.

Se consideró un valor de  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo.



## **INFRAESTRUCTURA**

### **Recursos humanos:**

#### **Investigadores principales:**

Dr. Rubén Argüero Sánchez

Jefe del Servicio de Cirugía, Facultad de Medicina UNAM.

Dr. Carlos A. Hinojosa Becerril.

Subdirector de investigación y Jefe de servicio de angiología y cirugía vascular del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

#### **Co Investigadores:**

Dr. Rodrigo Lozano Corona

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”. Angiología y cirugía vascular.

Lic. En medicina, Especialista en cirugía General, Angiología, Cirugía vascular y endovascular, alumno del programa de Maestría en ciencias Médicas UNAM.

- Responsable del manejo, procedimientos y cuidados peri operatorios de los modelos.

- Encargado de los procedimientos quirúrgicos: cuidado de los modelos en el posoperatorio inmediato y durante 7 días, realizó la obtención de cortes histológicos, ayudante en la evaluación y aplicación de la eutanasia, análisis de datos, redacción del artículo y del protocolo.

Dr. Hugo Laparra Escareño

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”. Angiología y cirugía vascular.

Lic. En medicina, Especialista en Angiología, Cirugía vascular y endovascular, Maestro en ciencias Médicas, alumno de doctorado en Ciencias Médicas UNAM.

- Realizó el análisis de datos, estadística descriptiva e inferencial, cegamiento y aleatorización, ayudó en los procedimientos quirúrgicos y procesamiento de muestras.

Dr. Javier E. Anaya Ayala

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán". Angiología y cirugía vascular.

Lic. En medicina, Especialista en Angiología, Cirugía vascular y endovascular, alumno del programa de Maestría en ciencias Médicas UNAM.

- Ayudó en el procesamiento de datos, análisis estadístico, discusión de resultados, y publicación del protocolo.

Dr. Jesús Javier Baquera Heredia

Centro médico ABC. Especialista en patología quirúrgica. Realizó el procesamiento de las muestras para tinción e inmunohistoquímica, sí como el análisis de laminillas.

Dra. Iris Gabriela Camacho Partida

Centro médico ABC. Especialista en patología quirúrgica. Colaboró en el procesamiento de las muestras para tinción e inmunohistoquímica, sí como en el análisis de laminillas.

Dr. Manuel Villalobos Huerta

Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina, UNAM. Cirujano General.

- Colaborador en los procedimientos de cirugía experimental

Dr. Gerardo Jiménez López

Médico General. Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina, UNAM.

- Colaborador en los procedimientos de cirugía experimental

Enf. Carolina Baños Galeana

Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina, UNAM.

- Colaboradora en los procedimientos de cirugía experimental.

M.V.Z. Andrés Montiel Rodríguez

Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina, UNAM.

Fue el encargado del cuidado anestésico, posanestésico inmediato, y realizó la eutanasia de los modelos.

Alumnos de la licenciatura de medicina de la UNAM, cursando su servicio social en investigación. Auxiliares en el cuidado y alimentación de los modelos experimentales

#### Recursos materiales

- Laboratorio de cirugía experimental de la UNAM: cuenta con quirófano equipado con todos los requerimientos para el protocolo, así como un arco en "C" para realizar estudios endovasculares.

- Bioterio de la Facultad de medicina de la UNAM: Apto para el bienestar de los modelos previo durante y después del protocolo, así como en el procesamiento de los desechos derivados el estudio.

- Laboratorio de biología molecular del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán". Análisis de PDGF y HIF-1 alfa. Almacenamiento y procesamiento de muestras.

- Servicio de cirugía vascular y estadística del INCMNSZ: análisis estadístico y preparación de la publicación.

Servicio de Patología quirúrgica y Molecular el Centro Médico ABC, Campus Observatorio.

## Recursos financieros

Patrocinio por parte de la empresa *Medstent*, distribuidora de material endovascular. Aportaron balones de angioplastia, balones medicados con Paclitaxel, guías endovasculares, así como financiamiento económico para adquirir materiales quirúrgicos, y de procesamiento de datos.

## Convenios de colaboración

1.- Silvera Ciencia e Ingeniería A. C. Donación y distribución de muestras de antígenos para inmunohistoquímica de *Alpha-Smooth Muscle Actin (ACTA2) Antibody, Rabbit PAb, Antigen Affinity Purified Presentation, HIF-1 alpha / HIF1A Antibody, PDGF-A Antibody* (E-10).

2.- Laboratorio de Patología Quirúrgica y Molecular del Centro Médico ABC Observatorio. Procesamiento de muestras, lectura e interpretación de laminillas, así como facilitación de equipos para realización de mediciones e interpretación de inmunohistoquímica.

3.- Laboratorio de medicina trasnacional del Instituto Nacional de Cancerología (INCAN). Almacenamiento y procesamiento de muestras.

## **CONSIDERACIONES ÉTICAS Y/O CARTA DE CONSENTIMIENTO BAJO INFORMACIÓN**

El protocolo se apega a las guías éticas internacionales *Research and testing using animals*, del Reino Unido, así como a directrices nacionales, como lo es la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, sobre las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. Se trata de un estudio categoría D de invasividad, respecto al daño o malestar que causa a los animales, ya que se conlleva 2 procedimientos quirúrgicos, uno con recuperación y otro sin recuperación, así como modificación de agua o alimento para la administración de fármacos y placebo y restricción de agua y alimento por 12 horas en 2 ocasiones. El segundo procedimiento es categoría E, pues se realizó eutanasia de los modelos <sup>77</sup>.

Se propone realizar el estudio en un Bioterio que cuenta con un Comité Interno para el Cuidado y uso de animales de Laboratorio y que cumpla con lo estipulado en las siguientes normas oficiales mexicanas: NOM-003-ZOO-1999 (Sobre los criterios para la operación de laboratorios de pruebas aprobados en materia zoosanitaria) <sup>89</sup>, NOM-029-ZOO-1999 (sobre las características y especificaciones par las instalaciones y equipo de laboratorios de pruebas y/o análisis en materia zoosanitaria), entre otras <sup>90</sup>.

## **METAS POR AÑO**

Junio-septiembre 2017: Presentación y aprobación de protocolo por comité correspondiente.

Noviembre 2017: Inicio de actividades en Bioterio UNAM, con 3 pilotos de modelos de hiperplasia, de los cuales se corroboró la delta de daño del modelo de angioplastia.

Diciembre 2017: análisis histopatológico de los tejidos obtenidos en los 4 pilotos.

Abril a mayo 2018: realización de los procedimientos en 14 conejos

Junio a julio 2018: realización de los procedimientos en 14 conejos restantes.

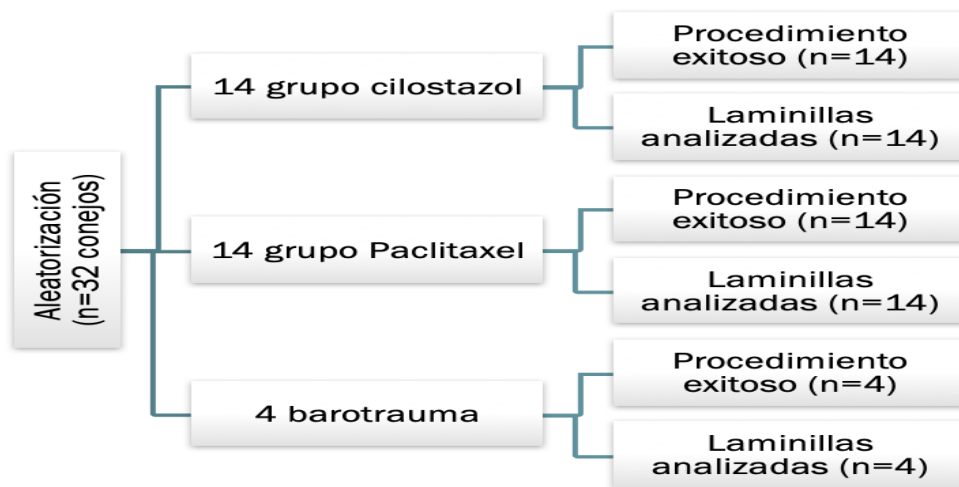
Agosto 2018: análisis histopatológico y sérico.

Septiembre 2018: análisis estadístico.

### 3. RESULTADOS

En el periodo de abril a agosto del 2019 se intervinieron 32 conejos de Nueva Zelanda, acorde al calendario trazado desde el inicio de la investigación. En cuatro de ellos (pilotos) se realizó el fenómeno de hiperplasia intimal con el modelo de angioplastia en una vena femoral, y se comparó con la vena contralateral (sin barotrauma), se comprobó el 60% (DE 10%) de aumento en el grosor del espacio sub intimal, como lo descrito por el Dr. Laparra <sup>74</sup>. Los otros 28 conejos fueron asignados en cada grupo de medicamento (14 por grupo), sin haber presentado pérdidas o eliminación de los mismos.

**Figura 4.** Resumen del ensayo.



En la **tabla 1** se resumen las características basales de cada grupo. Como complicación se presentaron 2 dehiscencias de herida, una para cada grupo, de medicamentos, no fueron consideradas como criterio de eliminación, pues sólo comprometían la capa más externa de la herida (la piel) y no hubo cambios macroscópicos evidentes en la zona intervenida.

**Tabla 1:** Características basales de los modelos experimentales.

<b>Variables</b>	<b>Grupo Cilostazol</b>	<b>Grupo Paclitaxel</b>	<b>Valor de P</b>
Sexo			N/S
Macho	14 (100%)	14 (100%)	
Edad	10.75 (2.21)	10.9 (3.13)	N/S
Peso	3,677 (334)	3,820 (320)	N/S
Angioplastia	14 (100%)	14 (100%)	N/S
Medicación	14 (100%)	14 (100%)	N/S
Obtención de tejido	14 (100%)	14 (100%)	N/S
Complicaciones	1 (7%)	1 (7%)	N/S

Valores totales y porcentaje entre paréntesis, o medias y desviación estándar entre paréntesis.

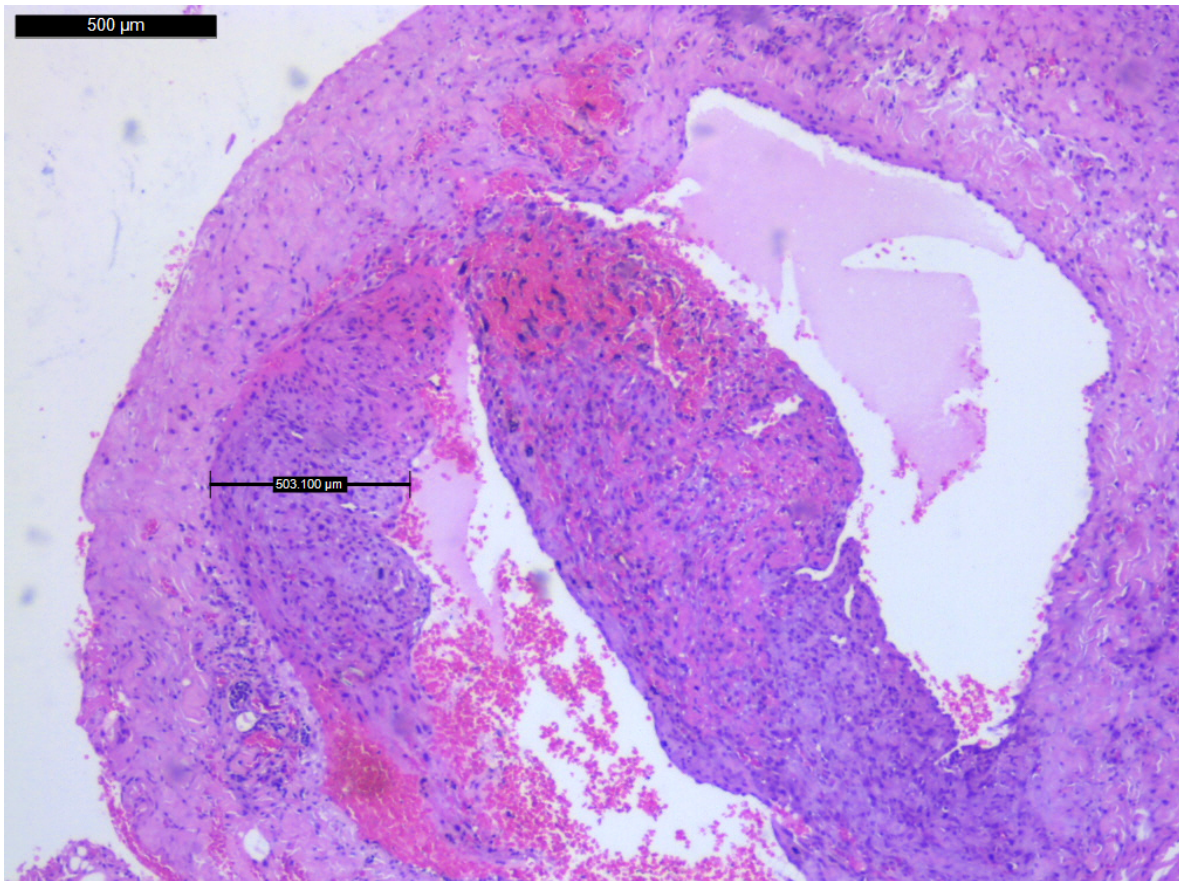
Se obtuvieron 64 muestras de tejido fijado en formaldehído (14 de venas tratadas con cilostazol, 14 tratadas con Paclitaxel y 28 venas controles), de las cuales se procesaron: 64 laminillas con tinción de Hematoxilina y Eosina (H&E), 64 laminillas con tinción de bandas elásticas de Verhoeff y 10 laminillas con tinción de Masson (respecto a éstas últimas, los patólogos las solicitaron en algunos casos, porque consideraban necesaria dicha tinción para discernir mejor las capas de la pared vascular).

Se entregaron las laminillas codificadas, para cegar a los patólogos que les analizaron, sobre el tratamiento que habían recibido. Se les informó únicamente que se trataban de venas femorales de conejos, sin comentarles que éstas podrían contener HI o alguna otra alteración.

Del grupo de venas sometidas a barotrauma, todas fueron reportadas como anormales, de la siguiente manera: agregados inflamatorios y fibroblásticos, eritrocitos en la pared vascular, presencia de trombo intraluminal, o engrosamiento de las 3 capas de la vena (fenómeno de arteriolización), y crecimiento del espacio intimal (figura 5).



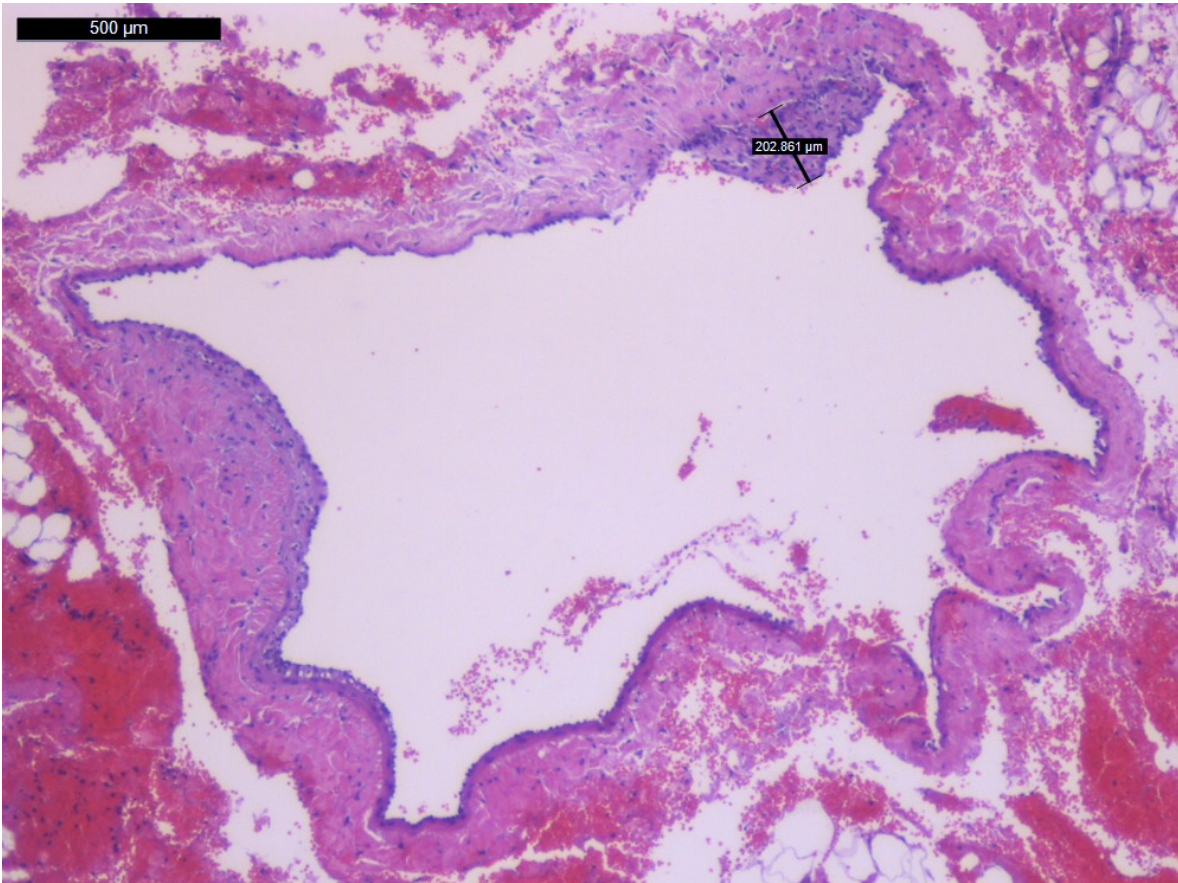
**Figura 5.**



Corte transversal de segmento de vena con tinción de H&E (aumentada 40 veces). Se observa hiperplasia dependiente de la capa íntima (segmento medido desde el endotelio a la lámina basal interna) y una proliferación fibroblástica y células inflamatorias que ocluyen el 90% de la luz del vaso. También se observa hemorragia focal que diseña la pared del vaso. Es notable el engrosamiento de la pared del vaso a expensas de las tres capas, fenómeno conocido como arteriolización.

Del grupo de cilostazol se reportaron, 4 laminillas fueron reportadas como normales, en el resto se reportaron de igual manera agregados inflamatorios y fibroblásticos en la luz vascular (n=2), presencia de eritrocitos en la pared vascular (n=4), engrosamiento de las 3 capas de la vena (fenómeno de arteriolización) (n=3) y crecimiento del espacio intimal (en 6 de ellas) (figura 6).

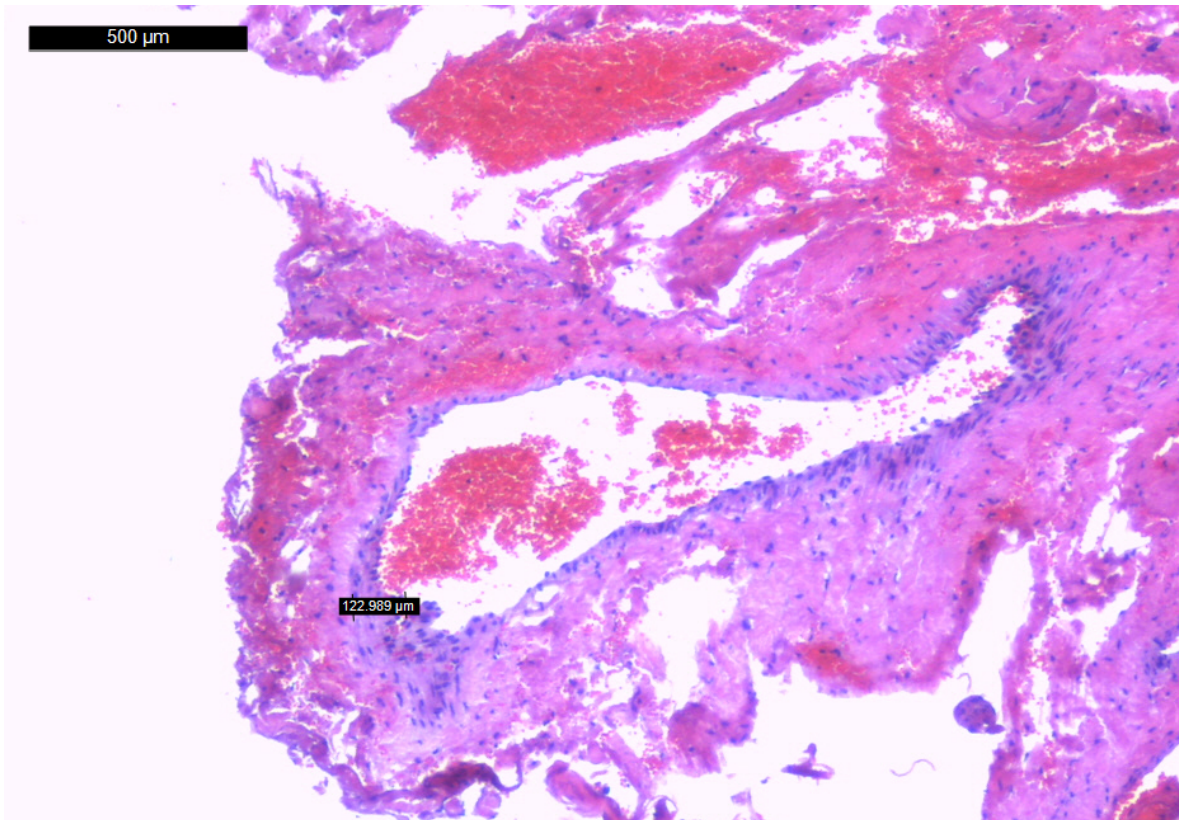
**Figura 6.**



Corte transversal de segmento de vena con tinción de H&E (aumentada 40 veces). Se observan segmentos de engrosamiento endotelial y una zona menor al 10% de la luz del vaso, con hiperplasia dependiente de la capa íntima (segmento medido desde el endotelio a la lámina basal interna).

Del grupo de venas sometidas a angioplastia medicada con paclitaxel, 2 de ellas fueron reportadas como normales, en 6 de ellas se reportó únicamente proliferación fibroblástica y células inflamatorias a nivel de la luz vascular, en 4 piezas se reportó un remodelamiento positivo de la pared, es decir hiperplasia intimal que crecía hacia la pared del vaso, sin ocluir hacia la luz del mismo (Figura 7).

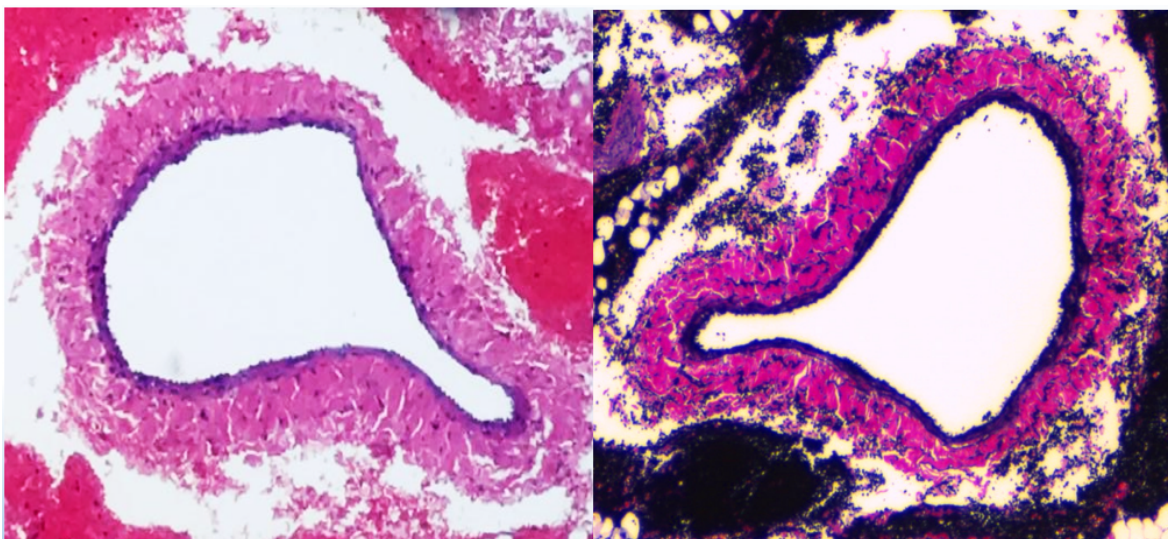
**Figura 7.**



Corte transversal de segmento de vena con tinción de H&E (aumentada 40 veces). Se observan dos zonas con hiperplasia dependiente de la capa íntima (segmento medido desde el endotelio a la lámina basal interna) que corresponden a menos del 20% de la luz vascular pero que crece hacia la pared del mismo y no hacia la luz, además de engrosamiento de la pared venosa a expensas de las 3 capas.

Del grupo de venas control, se analizaron 32 laminillas, de las cuales 28 fueron reportadas como normales, en 4 de ellas se reportó proliferación fibroblástica y células inflamatorias a nivel de la luz vascular, así como engrosamiento de todo el vaso (Figura 8). Resultados de todos los grupos condensados en la **tabla 2**.

**Figura 8.**



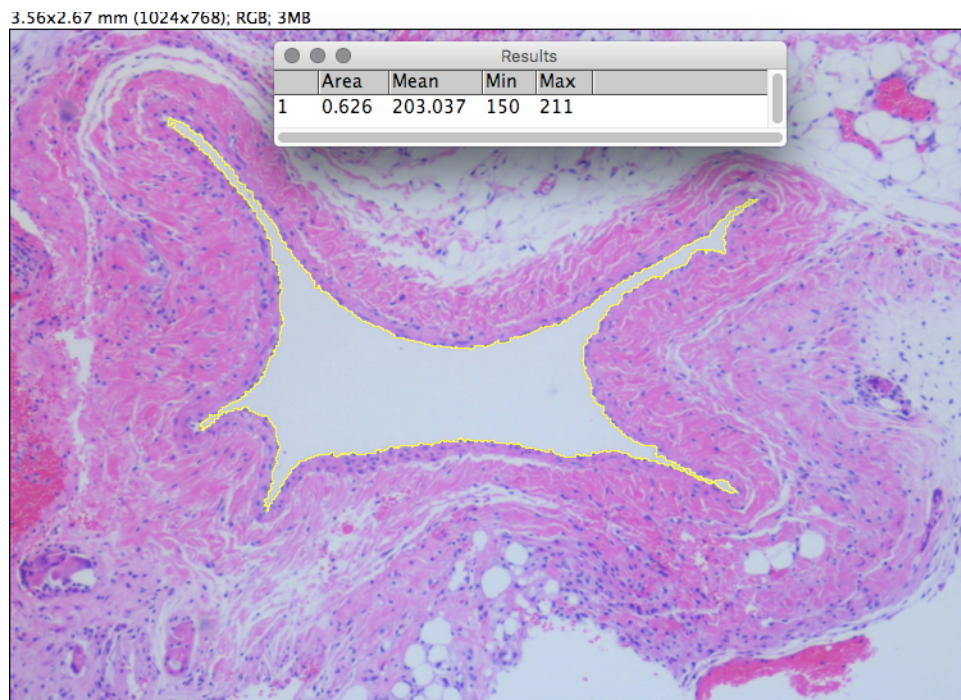
Corte transversal de segmento de vena femoral (aumentada 40 veces). A la izquierda con tinción de H&E, se observa regularidad de la luz vascular, así como la pared uniforme. A la derecha tinción de fibras elásticas, donde hay mayor contraste entre el endotelio y la capa muscular (color más oscuro), respecto al resto del vaso (coloración rosa).

**Tabla 2.** Reporte histopatológico cualitativo por grupo.

<b>Características histológicas</b>	<b>cilostazol</b>	<b>Paclitaxel</b>	<b>Barotrauma</b>	<b>Control</b>
Normal	4	2	0	28
Agregados inflamatorios/ fibroblásticos	2	4	3	0
Disección	2	3	2	0
Trombo intraluminal	2	5	2	4
Engrosamiento	3	2	4	4
Hiperplasia intimal	6	4	4	0
Arteriolización	4	2	2	0

Respecto a las mediciones o análisis morfométrico, la primera que se obtuvo fue el área de la luz vascular, misma que se determinó en las fotos representativas tomadas a cada laminilla (los patólogos las eligieron). Previa calibración, se obtuvo con el programa ImageJ (Figura 9). Para los controles se obtuvo una media luminal de  $0.939 \text{ mm}^2$  (DE 0.70, IC 95% 0.66 a  $1.20 \text{ mm}^2$ ), para las venas con barotrauma de  $2.64 \text{ mm}^2$  (DE 1.08, IC 95% 1.58 a  $3.71 \text{ mm}^2$ ), grupo de cilostazol fue  $1.17 \text{ mm}^2$  (DE 1.02, IC 95% 0.56 a  $1.77 \text{ mm}^2$ ) y para el grupo de Paclitaxel de  $1.10 \text{ mm}^2$  (DE 1.0, IC 95% 0.47 a  $1.72 \text{ mm}^2$ ).

**Figura 9.**

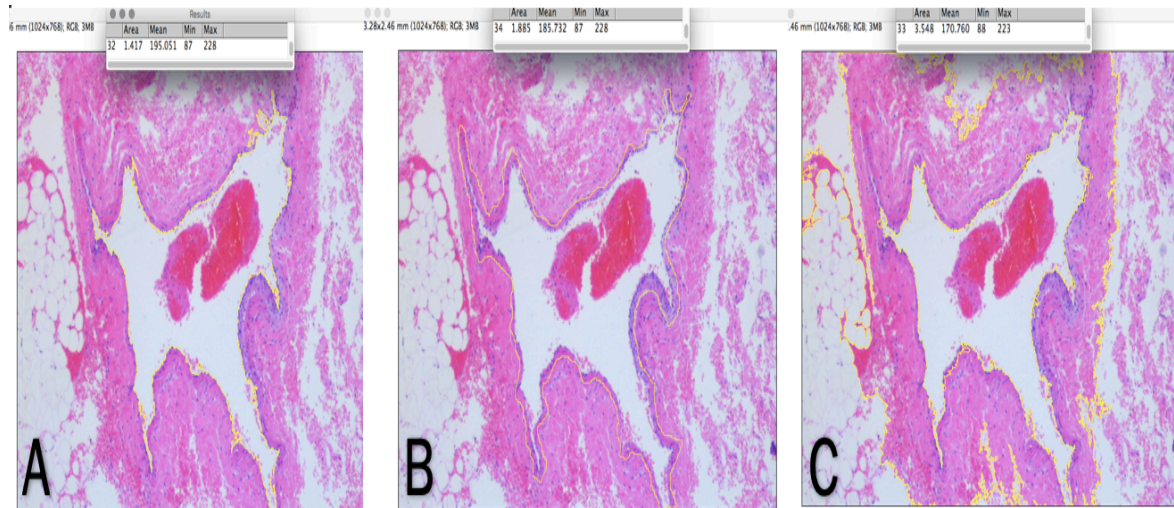


Corte transversal de segmento de vena femoral con tinción de H&E (aumentada 40 veces), que Ejemplifica cómo se obtuvo el área luminal en cada corte.

Utilizando el mismo principio de medición, posteriormente se obtuvo una delimitación del borde intimal, tomando como referencia la lámina basal. El programa arrojaba el valor de un área; a dicha medida se le restó el área de la luz vascular, para obtener el área intimal (el desenlace primario del presente protocolo). Finalmente, se demarcó el borde de todo el vaso y el programa arrojaba un valor de

área, al cual se le restó el área de la luz vascular para determinar así el área de todo el vaso (figura 10).

**Figura 10.**

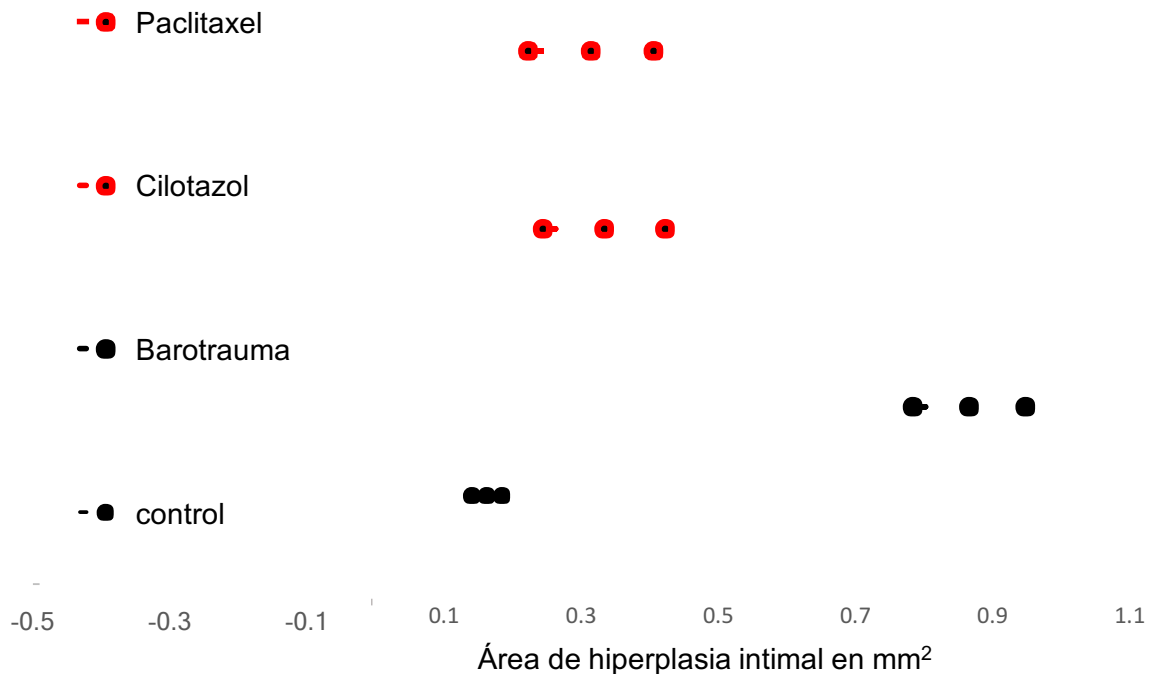


Corte transversal de segmento de vena con tinción de H&E (aumentada 40 veces), que ejemplifica cómo se determinó el área luminal (A), el área de hiperplasia intimal (B) y el grosor de todo el vaso (C).

En cuanto al área de hiperplasia intimal, los valores obtenidos fueron: controles con una media de  $0.160 \text{ mm}^2$  (DE 0.05, IC 95% 0.13 a  $0.18 \text{ mm}^2$ ), para las venas con barotrauma de  $0.86 \text{ mm}^2$  (DE 0.08, IC 95% 0.78 a  $0.94 \text{ mm}^2$ ), en el grupo de cilostazol fue  $0.33 \text{ mm}^2$  (DE 0.15, IC 95% 0.24 a  $0.42 \text{ mm}^2$ ) y para el grupo de Paclitaxel de  $0.31 \text{ mm}^2$  (DE 0.14, IC 95% 0.22 a  $0.40 \text{ mm}^2$ ). El Paclitaxel y el cilostazol tuvieron una reducción en la expresión de la hiperplasia intimal de 61% y 63% respectivamente, al compararse con los modelos de barotrauma realizados en los conejos pilotos (figura 11).

**Figura 11.**

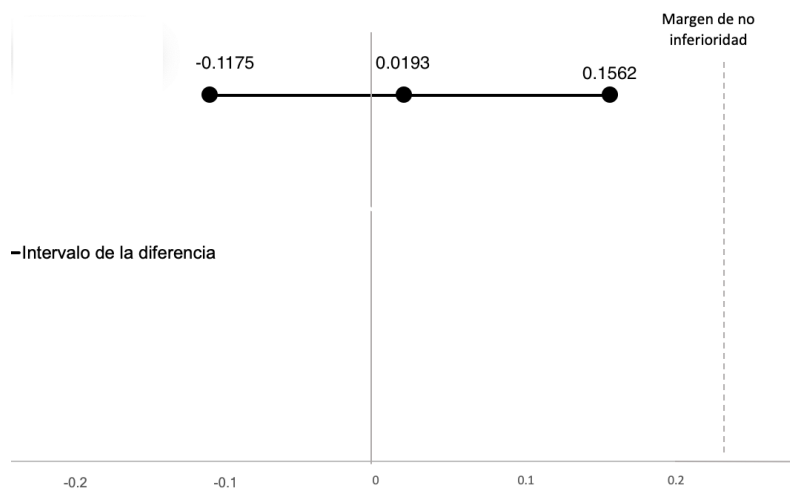
Resultados sobre el área de hiperplasia intimal con intervalos de confianza al 95%.



La diferencia entre ambos fármacos fue de  $0.0193 \text{ mm}^2$  (IC 95%  $-0.1175$  a  $0.156 \text{ mm}^2$ ), de tal manera que se puede deducir no inferioridad de cilostazol, comparado con Paclitaxel ya que el intervalo de la diferencia no rebasó la diferencia clínicamente significativa planteada de  $0.21 \text{ mm}^2$ , en la inhibición de la hiperplasia intimal en venas femorales de conejos de Nueva Zelanda, cuando ésta se mide 7 días después de ser provocada (Figura 12).

**Figura 12.**

Diferencia entre el área de hiperplasia intimal con Cilostazol y Paclitaxel más intervalos de confianza al 95%.



En cuanto al área de todo el vaso, los resultados fueron los siguientes: controles con una media de  $0.390 \text{ mm}^2$  (DE 0.20, IC 95% 0.32 a  $0.47 \text{ mm}^2$ ), para las venas con barotrauma de  $2.18 \text{ mm}^2$  (DE 0.57, IC 95% 1.61 a  $2.75 \text{ mm}^2$ ), en el grupo de cilostazol fue  $1.62 \text{ mm}^2$  (DE 0.99, IC 95% 1.03 a  $2.21 \text{ mm}^2$ ) y para el grupo de Paclitaxel de  $1.28 \text{ mm}^2$  (DE 0.72, IC 95% 0.83 a  $1.7 \text{ mm}^2$ ).

La última variable morfométrica fue la medición de la mayor y menor zona de hiperplasia intimal. Los resultados fueron los siguientes para la zona de mayor HI: controles con una media de  $31.9 \mu\text{m}$  (DE 15.6, IC 95% 26.01 a  $37.83 \mu\text{m}$ ), para las venas con barotrauma de  $395.61 \mu\text{m}$  (DE 123, IC 95% 274 a  $516 \mu\text{m}$ ), en el grupo de cilostazol fue  $261 \mu\text{m}$  (DE 273, IC 95% 99 a  $422 \mu\text{m}$ ) y para el grupo de Paclitaxel de  $216 \mu\text{m}$  (DE 273, IC 95% 47 a  $386 \mu\text{m}$ ).

En cuanto a la zona de menor HI se obtuvo: controles con una media de  $13 \mu\text{m}$  (DE 5.4, IC 95% 11 a  $15 \mu\text{m}$ ), para las venas con barotrauma de  $33.7 \mu\text{m}$  (DE 7.5, IC 95% 24 a  $41 \mu\text{m}$ ), en el grupo de cilostazol fue  $21 \mu\text{m}$  (DE 18, IC 95% 10.3 a  $32.2 \mu\text{m}$ ) y para el grupo de Paclitaxel de  $16.6 \mu\text{m}$  (DE 10.1, IC 95% 10.3 a  $22.6 \mu\text{m}$ ).



### Análisis densitométrico de inmunohistoquímica

Se realizó la tinción inmunohistoquímica en las piezas de patología con los siguientes anticuerpos:

- *Alpha-Smooth Muscle Actin* ([ACTA2], Rabbit PAb, purificada de afinidad antigénica, presentación de 200µg, Marca *Sino Biological*, EUA), dilución 1 a 100. Se usó como control positivo un corte de apéndice cecal humana.

- PDGF-A ((E-10), anticuerpo de ratón monoclonal de cadena ligera, presentación de 200µg/ml, Marca *Santa Cruz*, EUA), dilución 1 a 100. Se usó como control positivo un corte de amígdala humana.

- HIF-1a ((28b), anticuerpo monoclonal de ratón IgG1 de cadena ligera Kappa, presentación de 200µg/ml, Marca *Sino Biological*, EUA). dilución 1 a 100. Se usó como control positivo un corte de vejiga humana.

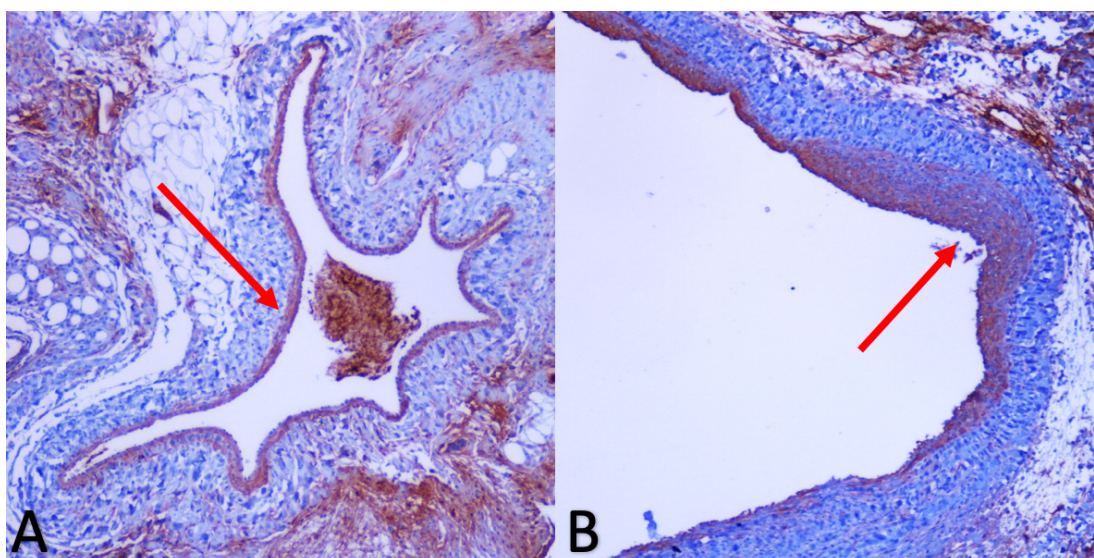
De las 64 muestras de tejido fijado en formaldehído (14 tratadas con cilostazol, 14 tratadas con Paclitaxel y 28 venas controles), 64 fueron teñidas con anticuerpos de ACTA2, 64 I con PDGF-A y 64 más con HIF-1alpha. De los controles, 3 laminillas fueron excluidas por no ser valorables (en las 3 el anticuerpo no logró tinciones óptimas), del grupo de Paclitaxel 2 laminillas y de cilostazol 2 laminillas más, fueron excluidas (el anticuerpo no logró tinciones óptimas), se analizaron en total 185 laminillas. Al representar pérdidas menores al 20%, se consideró aceptable no repetir las. No fueron excluidas laminillas de venas sometidas únicamente a barotrauma. Los resultados reportados por los dos patólogos se muestran en la **tabla 3**. Para el caso de actina, un marcador que es positivo en todos los vasos (en la capa media), el criterio de positividad fue cuando éste se encontraba fuera de la capa muscular, hacia el espacio subintimal (Figura13). El PDGF, un marcador de igual manera positivo en condiciones normales en el endotelio venoso, se consideró positivo cuando éste se encontraba en zona subintimal, capa media y adventicia (Figura 14). El HIF-1alpha, se encuentra positivo únicamente en hipoxia, por lo que los criterios de positividad fueron, encontrarlo de forma débil o francamente positiva en cualquier capa del vaso (figura 15).

**Tabla 3.** Resultados cualitativos de inmunohistoquímica.

Grupo	Resultado cualitativo	ACTA2	PDGF	HIF-1 $\alpha$
Cilostazol N=12	Negativo	1	2	0
	Débilmente positivo	8	7	3
	Positivo	3	3	9
Paclitaxel N=12	Negativo	1	2	2
	Débilmente positivo	4	9	9
	Positivo	7	1	1
Control N=25	Negativo	23	15	20
	Débilmente positivo	2	7	5
	Positivo	0	3	0
Barotrauma N=5	Negativo	0	0	0
	Débilmente positivo	3	4	2
	Positivo	2	1	3

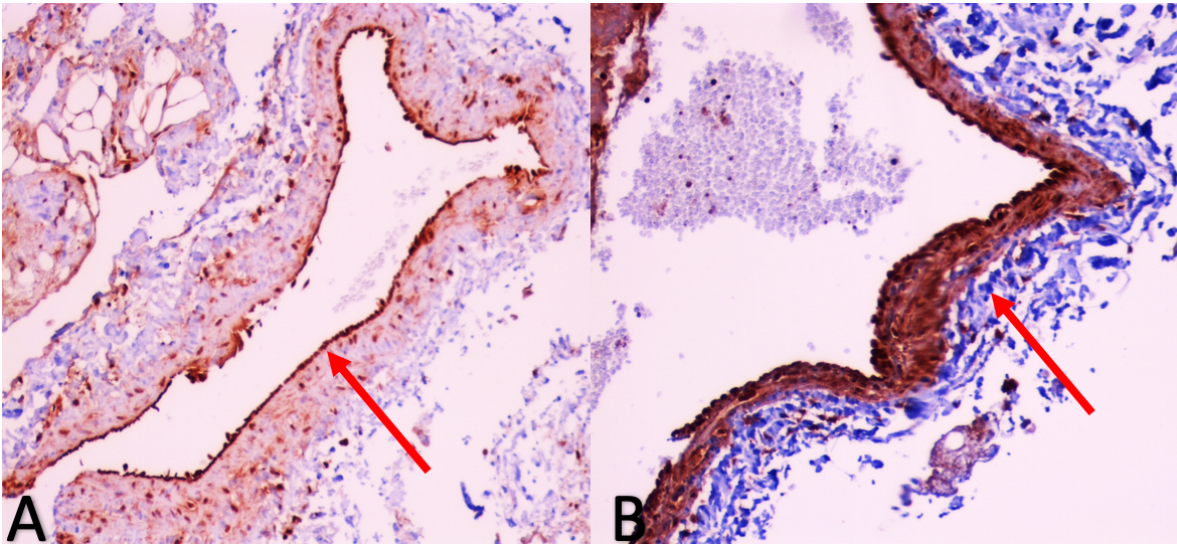
ACTA2: Actina de músculo liso, PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas, HIF-1 $\alpha$ : factor inducible por hipoxia 1 alfa.

**Figura 13.**



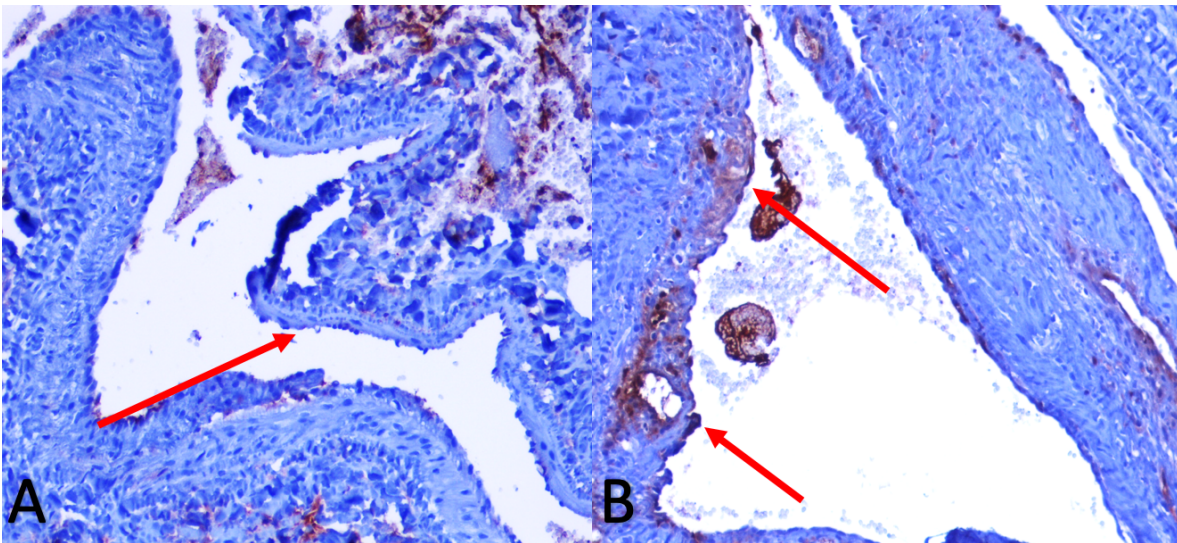
Corte transversal de segmento de vena con anticuerpo de ACTA2. **A:** resultado negativo, pues el marcador se expresó en el sitio habitual (flecha roja, foto con aumento 4x). **B.** Resultado positivo, pues el marcador se expresó en un territorio mayor al habitual (flecha roja, foto con aumento 10x).

**Figura 14.**



Corte transversal de segmento de vena con anticuerpo de PDGF. **A:** resultado negativo, pues el marcador se expresó con mayor intensidad en el sitio habitual (flecha roja, foto con aumento 4x). **B.** Resultado positivo, pues el marcador se expresó con gran intensidad en un territorio mayor al habitual (flecha roja, foto con aumento 10x).

**Figura 15.**



Corte transversal de segmento de vena con anticuerpo de HIF-1  $\alpha$ . **A:** resultado negativo, pues el marcador no se expresó (flecha roja, foto con aumento 4x). **B.** Resultado débilmente positivo, pues el marcador se expresó en la zona de hiperplasia intimal (flecha roja, foto con aumento 4x).

La prueba de Chi cuadrada resultó no significativa entre Paclitaxel y Cilostazol en cuanto a la expresión de Actina y PDGF. Fue significativa en la diferencia de HIF-1 alfa ( $p= 0.001$ ), para los valores positivos. Las diferencias entre los resultados de todos los anticuerpos entre medicamentos y los controles, fueron significativas ( $p= 0.001$ ), excepto en PDGF para cilostazol y sus controles, para los resultados positivos.

#### 4. DISCUSIÓN

A nuestro conocimiento, éste es el primer ensayo clínico experimental de no inferioridad que se realiza para comparar el efecto de Paclitaxel vs Cilostazol en la inhibición de la hiperplasia intimal venosa, en conejos de Nueva Zelanda, 7 días después de haber sometido dicha vena a barotrauma. Aunque se trata de medicamentos con farmacocinética y farmacodinamia diferentes, así como el tiempo de prescripción e indicaciones diferentes, en la práctica real su uso se ha expandido a territorios anatómicos y nosológicos similares, más allá de lo inicialmente descrito y han coincidido en su uso para el tratamiento de la enfermedad vascular periférica; existen reportes sobre el efecto inhibitorio que ejercen sobre la HI arterial, en ambos fármacos<sup>60-67</sup>. Por otro lado, el estudiarles de forma conjunta nos ha permitido indagar en posibles efectos sobre vías moleculares que pudieran participar en la hiperplasia intimal venosa.

Nuestros resultados sugieren no inferioridad de cilostazol, comparado con Paclitaxel respecto a la inhibición del área de hiperplasia intimal venosa en etapas tempranas. Estos resultados pueden tener relevancia clínica; para el Paclitaxel, las ventajas serían que se administra en una sola ocasión, no aumenta riesgo de sangrado, además, la dosis de 2 a 3.5 microgramos no ha presentado los efectos anafilácticos descritos para dosis oncológicas. En el caso de Cilostazol que, puede ser de ayuda en pacientes con claudicación, o necesidad de antiagregación plaquetaria prolongada; aunada a la necesidad de inhibir la hiperplasia intimal. Posiblemente estos resultados alienten a continuar las investigaciones sobre el efecto de

Cilostazol y Paclitaxel en la hiperplasia intimal venosa. Sería interesante en otros estudios, valorar el efecto que tienen dichos medicamentos usados de forma conjunta, ya que, a nuestro conocimiento, no existen hasta el momento descripciones de efectos benéficos o perjudiciales al usarse de forma concomitante.

Respecto a los resultados del análisis morfométrico, el área de hiperplasia intimal representó el grosor de las capas celulares de reciente formación, secundario al aumento en el número de células de músculo liso, estimuladas por el barotrauma. Fue considerada como el desenlace primario para el presente protocolo, por la intención de estudiar la respuesta celular, más allá de los cambios en el diámetro interno o externo del vaso. Además, el área de HI ha sido reportada por otros autores como una capa vascular con variaciones importantes después del barotrauma, refiriéndose en la mayoría de ellos como una variable de distribución normal <sup>73-76</sup>, cumpliéndose dicha distribución en los resultados que obtuvimos. Por su parte, el área de la luz vascular, así como el diámetro externo del vaso presentaron distribución no paramétrica. Creemos que la variación entre dichos valores se debe a que, pueden verse modificados en el tejido explantado por cambios propios de las piezas sometidas a formol, así como la retracción o deformación que sufren las muestras al ser procesadas para su análisis al microscopio. Las arterias, por ejemplo, tienden a mantener una forma circular después de ser procesadas para su análisis histopatológico (debido al grosor otorgado por la capa media); a diferencia de las venas que tienden a deformarse, y por ello la variación en el lumen, diámetro interno y externo (figura 1) <sup>91</sup>.

Aunque los resultados sobre el área de la luz vascular y el área de todo el vaso presentaron distribución libre, con DE amplias (excepto en las venas control), permiten identificar una tendencia: el vaso permanece dilatado después de 7 días del barotrauma, pero dicha dilatación podría ser menor, si se agrega Cilostazol o Paclitaxel, ya que el diámetro externo de las venas con dicho fármaco, fue igual entre ellos, pero diferente respecto al control y al grupo de venas con barotrauma. Tal fenómeno podría significar que el vaso tiende a volver a su diámetro original (característica fundamental para que conserven sus funciones). Sin embargo,

supuesto tendría que ser valorado mediante otros métodos, de forma longitudinal e idealmente, bajo condiciones hemodinámicas reales. Herdeg y Cols.<sup>67</sup> reportaron que el Paclitaxel en modelos animales, podría preservar la capacidad contráctil de los vasos y evitar la deformación del mismo, en tres mediciones, a los 7, 28 y 56 días después de haberles sometido a barotrauma.

Por su parte, los reportes histopatológicos en ambos fármacos, también arrojan resultados interesantes, por ejemplo, Cilostazol y Paclitaxel no tuvieron diferencia en cuanto al área de HI, pero hubo tendencia hacia una remodelación positiva en éste último grupo, es decir, una proliferación de la capa íntima hacia la pared del vaso que no causa alteraciones hemodinámicas tan marcadas, contrario al caso de la remodelación negativa (crecimiento de la HI hacia la luz vascular y por lo tanto, obliterante). Algunos reportes relacionan a la remodelación negativa, como una zona de hiperplasia con mayor actividad inflamatoria y por ende peor pronóstico post revascularización endovascular<sup>92</sup>. Mintz y Cols. reportaron asociación entre la remodelación negativa y la expresión de HI después de colocar un Stent medicado con Paclitaxel, en pacientes con enfermedad coronaria<sup>93</sup>. Aunque existen controversias sobre el papel que juega la remodelación positiva o negativa en la permeabilidad de un vaso post angioplastia, se ha visto que dicha respuesta es modificada por el mecanismo de acción de cada fármaco<sup>92</sup>. También es de destacarse mayor “arteriolización” en el grupo de cilostazol, lo que concuerda con el trabajo del Dr. Laparra, cuyas imágenes muestran venas con engrosamiento intimal uniforme cuyas características histomorfológicas son similares a las de una arteria<sup>74</sup>.

Por otro lado, los resultados de inmunohistoquímica, permiten hacer algunas inferencias sobre el mecanismo de acción de ambos fármacos en la respuesta vascular al barotrauma, que no habían sido estudiados en conjunto y de forma comparativa. A decir de la Actina de músculo liso, no hubo diferencias en su expresión entre ambos fármacos, pero si una tendencia a mayor nivel en el grupo de Paclitaxel, representado por mayor intensidad a nivel intracelular, principalmente en la capa media y subintimal de las venas. Esto puede deberse posiblemente, a un

mayor número de células musculares lisas maduras, o a mayor crecimiento de éste grupo celular (en futuros análisis podríamos hacer un conteo celular de la HI). En CML maduras, las fibras de actina se encuentran bien organizadas y expresan más éste biomarcador. Dicha estabilidad se altera en condiciones de estrés y las CML cambian a una forma secretora, disminuyendo así la cantidad de Actina. Gómez-Alvis y Cols. reportaron mayor actividad contráctil en la capa media de venas de mamíferos sometidos a tratamiento con Paclitaxel<sup>94</sup>. Por lo tanto, una tendencia a mayor expresión de Actina en el grupo de Paclitaxel, podría significar mayor número de CML maduras, ya que se han descrito efectos estabilizadores para éste fármaco, y para cilostazol se han reportado propiedades antiproliferativas<sup>58</sup>.

En cuanto a la captación de PDGF, fue similar en ambos fármacos, pero con menor expresión comparados con venas sometidas únicamente a barotrauma. Por otro lado, fue el marcador más positivo en las venas control (comparado con HIF-1a y la AML, anticuerpos que fueron negativos en venas sanas), es decir, el estrés quirúrgico al que fueron sometidas todas las venas analizadas (sin requerir de barotrauma), al parecer fue suficiente para su mayor expresión. La razón de valorar PDGF a nivel de tejidos, fue para determinar el papel que juega en cada capa vascular, pues se sabe que su expresión también puede ser dada por células circulatorias, por ende, su medición en plasma habría reflejado dichos valores (tanto plasmáticos como a nivel vascular). Una constante en las venas control fue la integridad del endotelio, representado por una captación lineal e ininterrumpida del antígeno de PDGF. Esto a su vez, se tradujo por los patólogos como integridad endotelial. En las venas sometidas a barotrauma, se observó gran discontinuidad de éste marcador, lo que se interpretó como lesión endotelial. Tang y Cols<sup>29</sup>. mencionan que después de una angioplastia más del 80% de las células endoteliales sufren apoptosis, por lo que el proceso de reparación celular es muy activo en etapas tempranas después del barotrauma. Derivado del efecto sobre el GMPC y el óxido nítrico, secundario a la inhibición de la fosfodiesterasa III, al cilostazol se le ha atribuido un efecto benéfico en la re endotelización vascular. En el presente estudio, se encontró una tendencia hacia mayor continuidad endotelial en el grupo de cilostazol. Por lo tanto, podría haber mayor regeneración endotelial

y, por ende, una recuperación de la función vascular optimizada por dicho fármaco.

Por su parte, el HIF-1 alfa, es un marcador que de forma más reciente se ha relacionado en la génesis de la hiperplasia intimal, su expresión promueve angiogénesis, además de apoptosis y migración celular<sup>54</sup>. Estudios mencionan un mayor aumento a nivel sérico de éste marcador en el contexto de la hiperplasia intimal, su presencia se ha determinado como crucial, por ejemplo, para la cicatrización de heridas, pero en la HI al parecer su inhibición disminuye la proliferación y migración de CML<sup>95</sup>. Laparra *et al*<sup>74</sup>, reportaron mayor expresión de HIF-1alfa después de barotrauma, respecto a venas control. Por esta razón, en el presente estudio se trataba de identificar qué medicamento podría inhibir más la expresión de HIF-1alfa, además de establecer si el aumento de HIF-1 alfa estaría correlacionado con aumento en PDGF, ya que se han descrito mecanismos de “*feedback*” entre ellos, pero no fue así. El HIF-1alfa, se encontró con mayor positividad en el grupo de cilostazol, donde a su vez, el PDGF no mostró diferencias significativas con los controles. Por otra parte, se ha descrito un efecto antagonista entre HIF-1 alfa y Paclitaxel en el terreno de la oncología. Los tumores sólidos (en su mayoría con centros hipóxicos o necróticos) expresan mayores niveles de HIF-1 alfa, y por otro lado (sin que esto sea necesariamente causalidad) responden menos a tratamiento con taxanos. Una posible explicación es que HIF-1 alfa participa en la expresión de la tubulina III beta, lo que le confiere resistencia a los taxanos<sup>96</sup>. Pero en la fisiopatología de la hiperplasia intimal, el HIF-1 alfa y el Paclitaxel pueden tener una interacción diferente, ya que se expresó menos cuando se administró éste fármaco, en relación al grupo de barotrauma y al grupo de cilostazol.

Con los resultados encontrados en el presente protocolo, se abren posibilidades sobre ciertas similitudes en vías de acción moleculares entre ambos fármacos. Se han descrito efectos en la inhibición del HIF-1 alfa, PDGF, migración y diferenciación de CML, así como vías anti inflamatorias para ambos fármacos<sup>63-73</sup>. Otra vía que podrán compartir en común (y que no fue estudiada en el presente estudio), es en la activación de la AMPK (proteína kinasa activada por AMP), descrita ya para cilostazol<sup>97</sup>. Por otro lado, las vías de PPAR- gamma, parecen ser inhibidas por



Paclitaxel y activadas por cilostazol, lo cual, en su uso conjunto, podrían verse compensadas a favor de la función endotelial<sup>98-100</sup>.

### **Limitaciones de estudio**

Se trata de un estudio experimental, los fenómenos se encuentran muy controlados, en el escenario clínico otros factores podrían estar relacionados a la formación de eventos hiperplásicos.

Las dosis de Cilostazol utilizadas (20 mg/kg de peso), no correlacionan con las dosis recomendadas en humanos, lo que podría limitar la transferencia de los resultados obtenidos en modelos experimentales, al terreno clínico.

Varios medicamentos, así como vías metabólicas se han relacionado a la HI, lo que, llevado a la práctica clínica, no siempre es consistente. La medición transversal a los 7 días no contempla todo el fenómeno de hiperplasia. Un estudio longitudinal con varias mediciones habría aportado mejor entendimiento en cómo se comporta dicho fenómeno a través del tiempo.

Los reportes de inmunohistoquímica permiten ver en qué zonas de la pared venosa se expresa el anticuerpo, pero no permiten saber con certeza cuantitativa su expresión. La tinción de los diferentes anticuerpos de igual manera es multifactorial, por lo cual no se puede inferir causalidad. Dichos resultados serán posteriormente comparados con los niveles de PDGF, HIF-1alfa y AML (mediante prueba de ELISA y/o Western blot), en muestras de tejido vascular crio preservado y a nivel sérico, que fueron obtenidas en todos los modelos, y serán procesadas para presentarse en un futuro protocolo, así como un recálculo del tamaño de la muestra para dichas inferencias.

## **5. CONCLUSIÓN**

El Cilostazol es no inferior al Paclitaxel en la inhibición de Hiperplasia intimal en venas femorales de conejos de Nueva Zelanda, cuando se realiza la medición 7 días después de haberles realizado barotrauma mediante angioplastia. Ambos fármacos presentan una expresión similar de anticuerpos para PDGF y ACM, con tendencia a mayor elevación de HIF-1alfa en venas tratadas con Cilostazol.

## 6. REFERENCIAS:

- 1.- Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG, et al. Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II). *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2007;33 Suppl 1:S1-75.
- 2.- Rosamond W, Flegal K, Friday G, Furie K, Go A, Greenlund K, et al.: Heart disease and stroke statistics – 2007 update: a report from the american heart association statistics committee and stroke statistics Sub-committee. *Circulation* 2007, 115: e69-171.
- 3.- Crowther MA, Roberts J, Roberts R, Johnson M, Stevens P, Skingley P, et al: Fibrinolytic variables in patients with recurrent venous thrombosis: a prospective cohort study. *Thromb Haemost* 2001; 85:390–394.
- 4.- Delot EC, Shneyder N, Zhang H, Bachiller E. Abnormal venous and arterial patterning in chordin mutants. *Dev Dyn* 2007; 236:2586–2593.
- 5.- Raffetto JD, Yu P, Roslan OM, Xia Y, Khalil RA. Endothelium-dependent nitric oxide and hyperpolarization-mediated venous relaxation pathways in rat inferior vena cava. *J Vasc Surg* 2012; 55:1716–1725.
- 6.- Henke PK, Varma MR, Moaveni DK, Dewyer NA, Moore AJ, Lynch EM, et al. Fibrotic injury after experimental deep vein thrombosis is determined by the mechanism of thrombogenesis. *Thromb Haemost* 2007; 98:1045–1055.
- 7.- Eriksson EE, Karlof E, Lundmark K, Rotzius P, Hedin U, Xie X. Powerful inflammatory properties of large vein endothelium in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:723–728.
- 8.- Davis GE, Senger DR. Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ Res* 2005; 97:1093–1107.
- 9.- Meissner MH, Moneta G, Burnand K, Gloviczki P, Lohr MJ, Lurie F, et al. The hemodynamics and diagnosis of venous disease. *J Vasc Surg* 2007; 46: 4S–24S.
- 10.- Sumner DS. Vascular physiology: essential hemodynamic principles. In Rutherford RB, editor: *Vascular surgery*, ed 6, Philadelphia, 2005, WB Saunders, pp 75–123.

- 11.- Nanjo H, Sho E, Komatsu M, Sho M, Zarins CK, Masuda, H. Intermittent short-duration exposure to low wall shear stress induces intimal thickening in arteries exposed to chronic high shear stress. *Exp Mol Pathol* 2006; 80: 38-45.
- 12.- Newby AC, Zaltsman AB. Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. *J Pathol* 2000; 190:300-309.
- 13.- Kudo T, Chandra, FA, Ahn SS. Long-term outcomes and predictors of iliac angioplasty with selective stenting." *J Vasc Surg* 2005; 42: 466-475.
- 14.- Davies MG, Hagen PO. Pathobiology of intimal hyperplasia. *Br J Surg* 1994; 81: 1254-1269.
- 15.- Weissman NJCM, Mintz GS, Laird JR Jr, Satler LF, Canos D, Leon MB. Carotid artery intravascular ultrasound: safety and morphologic observations during carotid stenting in 102 patients. *J Am Coll Cardiol* 2000;35(Suppl):10A.
- 16.- Tanaka K, Sata, M, Hirata Y, Nagai R: Diverse contribution of bone marrow cells to neointimal hyperplasia after mechanical vascular injuries. *Circ Res* 2003; 93: 783-90.
- 17.- Kuhnel TS, Muller GH. Experimental animal studies of clip-induced microvascular trauma. *Microsurgery* 2004; 24:241-7.
- 18.- Schulz E, Jansen T, Wenzel P, Daiber A, Munzel T. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal* 2008;10: 1115-26.
- 19.- Miano JM, Vlastic N, Tota RR, Stemerman MB. Localization of Fos and Jun proteins in rat aortic smooth muscle cells after vascular injury. *Am J Pathol* 1993; 142: 715- 24.
- 20.- Heydarkhan-Hagvall S, Esguerra M, Helenius G, Soderberg R, Johansson BR, Risberg B. Production of extracellular matrix components in tissue-engineered blood vessels. *Tissue Eng* 2006; 12: 831-842.
- 21.- Johnson JL, Van Eys GJ, Angelini GD, George SJ. Injury induces dedifferentiation of smooth muscle cells and increased matrix-degrading metalloproteinase activity in human saphenous vein. *Arterioscler Thromb Vasc.Biol* 2001; 21: 1146-1151.

- 22.- Murphy G, Gavrilovic, J. Proteolysis and cell migration: creating a path?" *Curr Opin Cell Biol.* 2001; 11: 614-621.
- 23.- Kher NMD, Marsh JMD. Pathobiology of atherosclerosis-a brief review. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 2004; 6: 665-672.
- 24.- Chiquet M, Renedo AS, Huber F, et al. How do fibroblasts translate mechanical signals into changes in extracellular matrix production? *Matrix Biol* 2003; 22: 73–80.
25. – Kanamasa K, Otani N, Ishida N, Inoue Y, Ikeda A, Morii H, et al. Suppression of cell proliferation by tissue plasminogen activator during the early phase after balloon injury minimizes intimal hyperplasia in hypercholesterolemic rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2001; 37:155-62.
- 26.- Joner M, Morimoto K, Kasukawa H, Steigerwald K, Merl S, Nakazawa G, et al. Site-specific targeting of nanoparticle prednisolone reduces in-stent restenosis in a rabbit model of established atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28:1960-6.
- 27.- Lippolis L, Sorrentino R, Popolo A, Maffia P, Nasti C, d'Emmanuele di Villa Bianca R, et al. Time course of vascular reactivity to contracting and relaxing agents after endothelial denudation by balloon angioplasty in rat carotid artery. *Atherosclerosis.* 2003; 171:171-9.
- 28.- Touyz RM. Reactive oxygen species in vascular biology: role in arterial hypertension. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2003; 1:91-106.
- 29.- Inoue T, Croce K, Morooka T, Sakuma M, Node K, Simon DI. Vascular inflammation and repair implications for re-endothelialization, restenosis, and stent thrombosis. *JACC Cardiovasc Interv.* 2011; 4: 1057-66.
- 30.-Kempin W, Kaule S, Reske T, Grabow N, Petersen S, Nagel S, et al. In vitro evaluation of paclitaxel coatings for delivery via drug-coated balloons, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2015; 96: 322–328.
- 31.- Rodríguez-Piñeiro M, Linares-Palomina JP, García-Róspide V, Salmerón-Febres M, Moreno-Escobar J, Urbano-Valero G, et al. Nuevo modelo experimental en hiperplasia intimal en la rata. *Angiología* 1996; 1: 7-16.
- 32.- Ward MR, Tsao PS, Agrotis A, Dilley RJ, Jennings GL, Bobik A. Low blood flow after angioplasty augments mechanisms of restenosis: inward vessel remodeling,

cell migration, and activity of genes regulating migration. *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology* 2001; 21: 208-13.

33.- Masuda H, Goto M, Tamaoki S, Azuma H. Accelerated intimal hyperplasia and increased endogenous inhibitors for NO synthesis in rabbits with alloxan-induced hyperglycaemia. *Br J Pharmacol* 1999; 126: 211-218.

34.- Lu X, Guo X, Linares C, Kassab GS. A new method to denude the endothelium without damage to media: structural, functional, and biomechanical validation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 286: H1889-1894.

35.- Chesler NC, Ku DN, Galis ZS. Transmural pressure induces matrix-degrading activity in porcine arteries ex vivo. *Am.J.Physiol* 1999; 277: H2002-H2009.

36.- Korshunov VA, Berk BC. Flow-induced vascular remodeling in the mouse: a model for carotid intima-media thickening." *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 2185-2191

37.- Asada H, Paszkowiak J, Teso D, Alvi K, Thorisson A, Frattini JC, et al. Sustained orbital shear stress stimulates smooth muscle cell proliferation via the extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 pathway." *J.Vasc.Surg.* 2005; 42: 772-780.

38.- Lehoux S, Castier Y, Tedgui A. Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. *J Intern Med.*2006; 25: 381-392.

39.- Zhan Y, Kim S, Izumi Y, Izumiya Y, Nakao T, Miyazaki, et al. Role of JNK, p38, and ERK in platelet-derived growth factor-induced vascular proliferation, migration, and gene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 795-801.

40.- Lu X, Guo X, Linares C, Kassab, GS. A new method to denude the endothelium without damage to media: structural, functional, and biomechanical validation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 286: H1889-1894.

41.- Lehoux S, Esposito B, Merval R, Loufrani L, Tedgui, A. Pulsatile stretch-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in organ culture of rabbit aorta involves reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 2366-72.

42.- Lemma M, Innorta A, Pettinari M, Mangini A, Gelpi G, Piccaluga M, et al. Flow dynamics and wall shear stress in the left internal thoracic artery: composite arterial

graft versus single graft." *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2006; 29: 473-478.

43.- Lehoux S, Tedgui, A. Cellular mechanics and gene expression in blood vessels. *J. Biomech.*2003; 36: 631-643.

44.- Lehoux S, Castier Y, Tedgui A. Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. *J Intern Med.*2006; 259: 381-392.

45.- Clark JM, Glogov S. Transmural organization of the arterial media. The lamellar unit revisited. *Arteriosclerosis* 1985. 5; 1:19–34.

46.- Davis NP, Han HC, Wayman B, Vito, R. Sustained axial loading lengthens arteries in organ culture. *Ann Biomed Eng.* 2005; 33: 867-877.

47.- Stark GB, Hong C, Futrell JW. Rapid elongation of arteries and veins in rats with a tissue expander. *Plast Reconstr Surg.* 1987; 80: 570-581.

48.- Ruiz-Razura A, Sozer SO, Layton EG, Hill LH, Cohen BE. Comparative study between acute intraoperative arterial elongation and the use of the interpositional vein graft for arterial reconstruction. *J Reconstr Microsurg.* 1995;11:145-150.

49.- Fuertes L, Santonja C, Kutzner H, Requena L. Inmunohistoquímica en dermatopatología: revisión de los anticuerpos utilizados con mayor frecuencia. *Actas Dermosifiliogr* 2013;104:99-127

50.- Chen L, De Wispelaere A, Dastvan F, Osborne WRA, Blechner C, Windhorst S, et al. Smooth muscle- $\alpha$  actin inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and migration by inhibiting rac1 activity. *PLoS ONE* 2016: e0155726.

51.- Caplice NM, Aroney NC, Bett JN, Cameron J, Campbell JH, Hoffmann N, et al. growth factors released into the coronary circulation after vascular injury promote proliferation of human vascular smooth muscle cells in culture. *JACC* 1997;29:1536–41.

52.-Tanizawa S, Ueda M, van der Loos CH, van der Wal AC, Becker AE. Expression of platelet derived growth factor B chain and receptor in human coronary arteries after percutaneous transluminal coronary angioplasty: an immunohistochemical study. *Heart* 1996; 75:549-556

- 53.-Sung KC, Kim KS, Lee S. Hypoxic Regulation of VEGF, HIF-1(alpha) in Coronary C collaterals development. *The Korean Journal of Internal Medicine* 2005;20:295-302.
- 54.- Lim CS, Kiriakidis S, Sandison A, Paleolog EM, Davies AH. Hypoxia-inducible factor pathway and diseases of the vascular Wall. *J Vasc Surg* 2013;58:219-30.
- 55.- Bos R, Van Diest PJ, de Jong JP, Vander Groep P, vander Valk P, vander Wall E. Hypoxia-inducible factor-1a is associated with angiogenesis, and expression of bFGF, PDGF-BB, and EGFR in invasive breast cancer. *Histopathology* 2005; 46:31–36.
- 56.- Tang Z, Wang A, Yuan F, Yan Z, Liu B, Chu JS, et al. Differentiation of multipotent vascular stem cells contributes to vascular diseases. *Nature* 2012;3:875
- 57.- Xia Y, Choi HK, Lee K. Recent advances in hypoxia-inducible factor (HIF)-1 inhibitors. *European Journal of Medical Chemistry* 2012; 49: 24-40.
- 58.- Fujinaga K, Onoda K, Yamamoto. Locally applied cilostazol suppresses neointimal hyperplasia by inhibiting tenascin-C synthesis and smooth muscle proliferation in free artery grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004; 128: 357–63.
- 59.- Toma N, Imanaka-Yoshida K, Takeuchi T. Tenascin-C coated platinum coils for acceleration of organization of cavities and reduction of lumen size in a rat aneurysm model. *J Neurosurg* 2005; 103: 681–6.
- 60.- Takai S, Jin D, Nishimoto M. Cilostazol suppresses intimal formation in dog grafted veins with reduction of angiotensin II-forming enzymes. *Eur J Pharmacol* 2001; 411: 301–4.
- 61.- Weintraub WS. The vascular effects of cilostazol. *Can J Cardiol.* 2006; 22(Suppl B):56B-60B.
- 62.- Hong KW, Kim KY, Shin HK, Lee JH, Choi JM, Kwak YG, et al. Cilostazol prevents tumor necrosis factor-alpha-induced cell death by suppression of phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 phosphorylation and activation of Akt/cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306:1182-90.



- 63.- Sollott SJ, Cheng L, Pauly RR, Jenkins GM, Monticone RE, Kuzuya M, et al. Taxol inhibits neointimal smooth muscle cell accumulation after angioplasty in the rat. *J Clin Invest* 1995; 95: 1869-76.
- 64.- Axel DI, Kunert W, Goggelmann C, Oberhoff M, Herdeg C, Kuttner A, et al. Paclitaxel inhibits arterial smooth muscle cell proliferation and migration in vitro and in vivo using local drug delivery. *Circulation* 1997; 96: 636-45.
- 65.- Katsanos K, Spiliopoulos S, Karunanithy N, Krokidis M, Sabharwal T, Taylor P. Bayesian network meta-analysis of nitinol stents, covered stents, drug-eluting stents, and drug-coated balloons in the femoropopliteal artery. *J Vasc Surg* 2014; 59: 1123-1133 e8.
- 66.- Katsanos K, Karnabatidis D, Kitrou P, Spiliopoulos S, Christeas N, Siablis D. Paclitaxel-coated balloon angioplasty vs. plain balloon dilation for the treatment of failing dialysis access: 6-month interim results from a prospective randomized controlled trial. *J Endovasc Ther* 2012; 19: 263-72.
- 67.- Herdeg C, Oberhoff M, Baumbach A, Blattner A, Axel DI, Schroeder S, et al. Local paclitaxel delivery for the prevention of restenosis: biological effects and efficacy in vivo. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35:1969-76.
- 68.- Harkness EJ, Wagner Ej. The biology and medicine of rabbits and rodents. 4<sup>a</sup> ed. Baltimore: Williams and Wilkins;1995.
- 69.- Zhang Y, Ge W, Yuan B, Zhang X, Cao K. Histomorphological observation in arterial remodeling following New Zealand rabbit auto-extremity artery transplantation. *Journal of Nanjing Medical University*. 2007; 6:367-37.
- 70.- Hilbery AD. Manual de anestesia de los pequeños animales. Zaragoza, España: Acribia; 1992.
- 71.-Guarnier JV, Schabdach GD, Stock AD, Keller SL. The effects of commercially available sodium pentobarbital formulations on plasma hemoglobin levels in New Zealand white rabbits. *Contem Top Anim Lab Sci*. 1999; 38: 617-621.
- 72.- Gografe SI, Wilson JS, Johnson BL, Rushing G, Brower A. Successful management of long term general anesthesia in rabbits used as animal model of human disease. *Contem Top Anim Lab Sci*. 2003;42: 16-19.

- 73.- Kakuta T, Currier JW, Hudenschild CC, Ryan TJ, Faxon DP. Differences in compensatory vessel enlargement, not intimal formation, account for restenosis after angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit model. *Circulation*. 1994; 89: 2809-2815.
- 74.- Laparra H, Hinojosa CA. Efecto de cilostazol en la formación de hiperplasia intimal del endotelio venoso en un modelo experimental de fuerza tensional radial. Tesis para obtener el título de maestro en ciencias médicas. México: Universidad Nacional Autónoma de México. División de posgrado. 2016. 39 h.
- 75.- Kudo FA, Kondo Y, Muto A, Miyazaki K, Dardik A, Nishibe M, et al. Cilostazol suppresses neointimal hyperplasia in canine vein grafts. *Surg Today* 2009; 39:128–132.
- 76.- Cremers B, Schmitmeier S, Clever YP, Gershony G, Speck U, Scheller B. Inhibition of neo-intimal hyperplasia in porcine coronary arteries utilizing a novel paclitaxel-coated scoring balloon catheter. *Catheter Cardiovasc Interv* 2014; 84:1089–1098.
- 77.- Secretaría de Agricultura, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Norma Oficial Mexicana NOM 062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio
- 78.- Secretaría de Agricultura, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Norma Oficial Mexicana NOM-051-ZOO-1995, Trato humanitario en la movilización de animales.
- 79.- Guzeloglu M, Reel B, Atmaca S, Bagriyanik A, Hazan E. The effects of PPAR $\gamma$  agonist rosiglitazone on neointimal hyperplasia in rabbit carotid anastomosis model. *Journal of Cardiothoracic Surgery*. 2012; 7:57. doi:10.1186/1749-8090-7-57.
- 80.- Stolzenburg N, Breinl J, Bienek S, et al. Paclitaxel-Coated Balloons: Investigation of Drug Transfer in Healthy and Atherosclerotic Arteries – First Experimental Results in Rabbits at Low Inflation Pressure. *Cardiovascular Drugs and Therapy*. 2016; 30: 263-270. doi:10.1007/s10557-016-6658-1.
- 81.- Broadstone RV. Prolongued anesthetic recovery. *Clin Tech Small Ani Pract*. 1999;14: 56-64.

- 82.- American College of Veterinary Anesthesiologist. Position paper of the treatment of pain in animals. *JAMA*. 1998; 123: 628-30.
- 83.- Martini L, Nello LR, Cinotti S, Fini M, Giaverasi G, Giordano R. Evaluation of pain and stress levels of animals used in experimental. *J Sur Res*. 2000; 88: 1.
- 84.- Secretaría de Agricultura, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.
- 85.- Pazzaglia UE, Bonaspetti G, Rodella LF, Ranchetti F, Azzola F. Design, morphometry and development of the secondary osteonal system in the femoral shaft of the rabbit. *Journal of Anatomy*. 2007;211(3):303-312. doi:10.1111/j.1469-7580.2007.00782.
- 86.- Touchard AG, Schwartz RS. Modelos preclínicos de reestenosis: retos y éxitos. *Rev Esp Cardiol Supl*. 2013; 13:13-19.
- 87.- Koh, J. *et al*. A comprehensive immunohistochemistry algorithm for the histological subtyping of small biopsies. *Histopathology*. 2014;65:868-78.
- 88.- Wang B, Zhang M, Takayama T, et al. BET Bromodomain Blockade Mitigates Intimal Hyperplasia in Rat Carotid Arteries. *EBioMedicine*. 2015;2(11):1650-1661.
- 89.- Secretaría de Agricultura, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Norma Oficial Mexicana NOM-003-ZOO-1999, Sobre los criterios para la operación de laboratorios de pruebas aprobados en materia zoosanitaria.
- 90.- Secretaría de Agricultura, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Norma Oficial Mexicana NOM-029-ZOO-1999, sobre las características y especificaciones par las instalaciones y equipo de laboratorios de pruebas y/o análisis en materia zoosanitaria.
- 91.- Fitridge R, Thompson M, editors. *Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists* [Internet]. Adelaide (AU): University of Adelaide Press; 2011. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534260/>

- 92.- Kang WC, Ahn T, Moon CI, Lee K, Han SH, Shin EK, et al. Comparison of the effect preinterventional arterial remodeling on intimal hyperplasia after implantation of a sirolimus or Paclitaxel-eluting Stent. *Cardiology* 2010;116:117–122
- 93.- Mintz GS, Tinana A, Hong MK, et al. Impact of preinterventional arterial remodeling on neointimal hyperplasia after implantation of (non-polymer-encapsulated) paclitaxel-coated stents: a serial volumetric intravascular ultrasound analysis from the ASsian Paclitaxel-Eluting Stent Clinical Trial (ASPECT). *Circulation* 2003;108:1295–1298.
- 94.- Gómez-Alvis A, Rinaldi G, Rebolledo A, Milesi V, Sanz N, Tommasi J, et al. The antineoplastic agent Paclitaxel (Taxol) increases contractile activity in human saphenous veins and human mammary arteries. *Cancer Invest*, 2000;18: 327-35.
- 95.- Wan J, Lata C, Santilli A, Green D, Roy S, Santilli S. Supplemental oxygen reverses hypoxia-induced smooth muscle cell proliferation by modulating HIF- $\alpha$  and VEGF levels in a rabbit arteriovenous fistula model. *Ann Vasc Surg*. 2013;28(3):725-36.
- 96.- Samanta D, Gilkes DM, Chaturvedi P, Xiang L, Semenza GL. Hypoxia-inducible factors are required for chemotherapy resistance of breast cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(50):E5429-38.
- 97.- de Motta DA, de Brito FC. Cilostazol exerts antiplatelet and anti-inflammatory effects through AMPK activation and NF- $\kappa$ B inhibition on hypercholesterolemic rats. *Fundam Clin Pharmacol*. 2016 Aug;30:327-37.
- 98.- Sharma M, Tuaine J, McLaren B, et al. Chemotherapy Agents Alter Plasma Lipids in Breast Cancer Patients and Show Differential Effects on Lipid Metabolism Genes in Liver Cells. *PLoS One*. 2016;11(1):e0148049. Published 2016 Jan 25. doi:10.1371/journal.pone.0148049
- 99.- Sanada F, Kambara Y, Taniyama Y, Otsu R, Carracedo M, Ikeda-Iwabu Y, et al. Induction of Angiogenesis by a Type III Phosphodiesterase Inhibitor, Cilostazol, Through Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  and cAMP Pathways in Vascular Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36:545-552

100.- Smallridge RC, Copland JA, Brose MS, et al. Efatutazone, an oral PPAR- $\gamma$  agonist, in combination with paclitaxel in anaplastic thyroid cancer: results of a multicenter phase 1 trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(6):2392-400.

## 7. ANEXOS

### Anexo 1. Punto de fin humanitario para los modelos experimentales.

#### Formato de criterios de punto final

Animal #: \_\_\_\_\_ Especie: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

Fecha inoculación 1 (inmunización): \_\_\_\_\_ Fecha inoculación 2 (reto): \_\_\_\_\_

	Parámetro	Score	Fecha											
<b>Apariencia física</b>	Normal	0												
	Falta general de acicalamiento	1												
	Pelo duro, enrojecimiento de ojos y/o nariz	2												
	Piloerección, postura encorvada, pupilas dilatadas	3												
<b>Alimentación e ingesta de agua</b>	Normal	0												
	< 10% pérdida de peso	1												
	10-15% pérdida de peso	2												
	> 20% pérdida de peso	3												
<b>Hidratación</b>	Normal	0												
	Prueba de pellizco de la piel anormal	3												

<b>Comportamiento no provocado</b>	Normal	0												
	Cambios menores	1												
	Movilidad reducida, asilado pero alerta	2												
	Automutilación, muy inquieto o inmóvil	3												
<b>Respuestas de comportamiento a los estímulos externos</b>	Normal	0												
	Depresión menor o exageración de la respuesta	1												
	Respuestas moderadamente anormales	2												
	Reacciones violentas o en estado de coma	3												
<b>Signos clínicos</b>	Frecuencia respiratoria normal	0												
	Cambios leves en el ritmo de la respiración	1												
	Aumento de la frecuencia respiratoria abdominal	2												
	Respiración abdominal marcada, cianosis	3												
<b>* Total (0-18)</b>														

\* 0-4 = Notificar al veterinario; 5-9 = Monitorear cuidadosamente; 10-18 = Eutanasia

#### Criterios de punto final:

Adicional a la escala de punto final, los animales deben ser eutanasiados si:

- La pérdida de peso es mayor al 25%
- Inapetencia o deshidratación por mas de 48 horas.