



## **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS  
Y DE LA SALUD  
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN “SALVADOR ZUBIRÁN”**

**“EFECTO DE CILOSTAZOL EN LA FORMACIÓN DE HIPERPLASIA INTIMAL DEL  
ENDOTELIO VENOSO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE FUERZA TENSIONAL  
RADIAL”**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**PRESENTA:  
HUGO LAPARRA ESCAREÑO**

**TUTOR:  
DR. CARLOS ARTURO HINOJOSA BECERRIL  
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN “SALVADOR ZUBIRÁN”**

**MIEMBROS DE COMITÉ TUTORIAL:**

**DRA. MARÍA DEL CARMEN JIMÉNEZ MARTÍNEZ - INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA F.A.P.  
CONDE DE VALENCIANA**

**DRA. MARÍA JOSEFINA ALBERÚ GÓMEZ - INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y  
NUTRICIÓN “SALVADOR ZUBIRÁN”**

**DR FERNANDO VILLEGAS ÁLVAREZ – INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA**

**DR. SERGIO MORENO JIMÉNEZ – INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA**

**CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO DE 2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
1.1 HIPERPLASIA INTIMAL.....	4
1.2 LA MAGNITUD DEL PROBLEMA CLÍNICO.....	6
1.2.1 HIPERPLASIA INTIMAL EN INJERTOS ARTERIALES.....	6
1.2.2 HIPERPLASIA INTIMAL EN ACCESOS VASCULARES.....	7
1.3 FISIOPATOLOGÍA DE ESTENOSIS EN DERIVACIONES ARTERIALES Y ACCESOS VASCULARES.....	8
1.3.1 DIFERENCIAS EN LA GENERACIÓN DE HIPERPLASIA INTIMAL ENTRE ARTERIAS Y VENAS.....	8
1.3.2 PASOS PARA EL DESARROLLO DE HIPERPLASIA INTIMAL VENOSA.....	11
1.4 FUERZAS HEMODINÁMICAS EN LA GENERACIÓN DE HIPERPLASIA INTIMAL.....	12
1.4.1 FUERZAS MECÁNICAS DE TENSIÓN RADIAL.....	13
1.4.1.1 EFECTOS MORFOLÓGICOS.....	14
1.4.1.2 EFECTO EN EL FENOTIPO DE LAS CML.....	14
1.4.2 RECEPTORES Y TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES.....	14
1.4.3 EXPRESIÓN DE PDGF.....	15
1.5 ESTRATEGIAS PROPUESTAS PARA REDUCCIÓN DE HIPERPLASIA INTIMAL.....	16
1.5.1 EFECTO DE FÁRMACOS ANTIAGREGANTES PLAQUETARIOS.....	17
1.5.2 CILOSTAZOL.....	17
<b>2. HIPÓTESIS</b>	<b>18</b>
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>19</b>
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>19</b>
<b>5. METODOLOGÍA</b>	<b>20</b>
5.1 MODELO EXPERIMENTAL DE FUERZA TENSIONAL RADIAL.....	20
5.1.2 CÁLCULO DEL TAMAÑO DE MUESTRA.....	22
5.1.3 DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA QUIRÚRGICA.....	23
<b>6. ANÁLISIS</b>	<b>26</b>

6.1 ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO.....	26
6.2 INMUNOHISTOQUÍMICA.....	28
6.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	28
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>28</b>
7.1 EL MODELO EXPERIMENTAL .....	28
7.2 CAMBIOS HISTOPATOLÓGICOS SECUNDARIOS A UNA LESIÓN VASCULAR POR SOBREDISTENSIÓN DEL ENDOTELIO VENOSO.....	29
7.3 EVALUACIÓN DE LOS NIVELES SÉRICOS DE PDFG CON TÉCNICA DE ELISA.....	30
7.3.1 GRUPO CONTROL.....	31
7.3.2 GRUPO EXPERIMENTAL.....	31
<b>8. DISCUSIÓN</b>	<b>33</b>
<b>9. CONCLUSIÓN</b>	<b>34</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>35</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 HIPERPLASIA INTIMAL

La hiperplasia intimal es una respuesta celular y molecular en el endotelio vascular, caracterizada por una proliferación continua, anormal, excéntrica, predominantemente de células musculares lisas. Posteriormente hay proliferación de tejido conectivo y matriz extracelular, siendo el resultado final la hiperplasia de la pared del vaso y la estenosis luminal. En derivaciones arteriales y accesos vasculares lisis proximal por invasión anastomosis arterial. La lesión endotelial secundaria al trauma quirúrgico y las turbulencias del flujo juegan un papel importante<sup>1</sup>.

La hiperplasia intimal fue identificada como una complicación de las reconstrucciones arteriales en 1906, cuando Corl y Guthrie observaron la formación de un "engrosamiento translúcido" semejante al endotelio en las anastomosis de injertos venosos implantados en arterias. Habitualmente la hiperplasia intimal se presenta como una reacción normal al trauma endoluminal pero puede ocurrir fisiológicamente como se observa en el sitio de cierre espontáneo del conducto arterioso después del nacimiento.

El proceso de hiperplasia intimal envuelve una cadena de reacciones celulares, moleculares e inmunológicas, que varían en su intensidad y expresión dependiendo del tipo de trauma inicial, de la localización en el sistema arterial o venoso y de factores asociados<sup>2</sup>.

Una limitación importante de las intervenciones vasculares periféricas para el tratamiento de lesiones isquémicas es que inevitablemente dañan a los vasos. Más del 20% de todas las intervenciones fallan debido a estenosis. La falla ocurre en una etapa temprana (en las primeras horas) debido a problemas técnicos y más tarde (1-12 meses) debido a la "intimalización" por lesión. En etapas más avanzadas (> 12 meses) la falla resulta a causa de aterosclerosis subyacente.

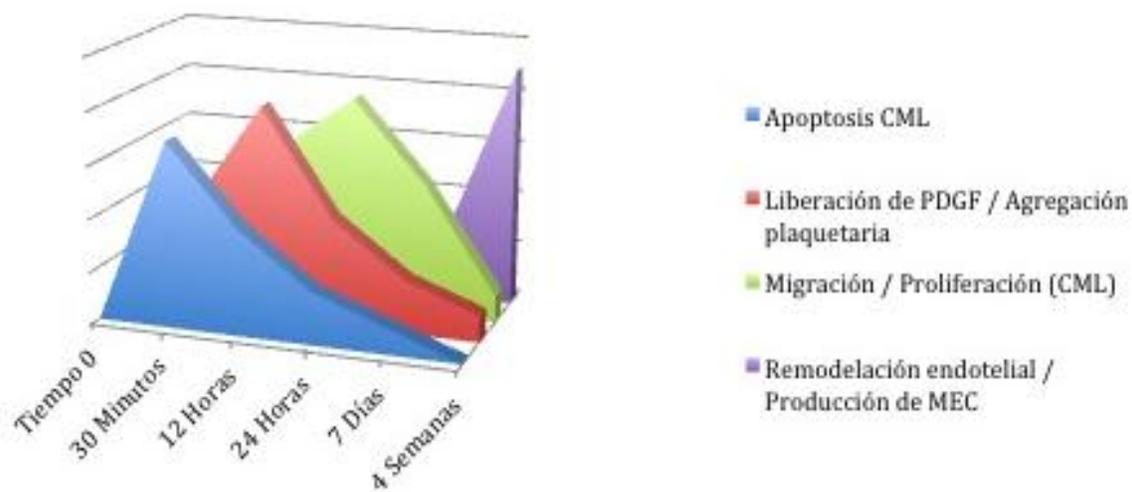
El trauma directo a la pared arterial provocado por disección, tensión, suturas o angioplastia provoca invariablemente una denudación del endotelio, lo cual promueve la apoptosis de células musculares lisas. Esta agresión al endotelio además provoca la deposición inmediata de plaquetas en el sitio secundario a la liberación de factor de crecimiento derivado de plaquetas.

La inflamación es un proceso fundamental en la generación de hiperplasia intimal. La adhesión y migración leucocitaria también parece depender de la función plaquetaria. Además los conglomerados plaquetarios funcionan como un andamio sobre el cual las células de musculares lisas migran, sintetizan y degradan los componentes de la matriz extracelular.

La secuencia de eventos posterior a una lesión inducida por balón se resume en la *Figura 1*. En una etapa inicial (primeros 30 minutos) hay pérdida de hasta el 70% de células musculares lisas (CML) de la capa media posterior al inicio de su apoptosis.

A las 12 horas, se produce un pico de liberación factor de crecimiento derivado de plaquetas y radicales libres. Este factor de crecimiento es un quimioatrayente importante que estimula la migración de CML de la capa media hacia la capa íntima principalmente dentro de los primeros 7 días, siendo su máxima actividad hacia el séptimo día, tiempo en el cual tasa de proliferación de estas células aumenta del 0,06% antes de la lesión al 10% - 40%. Las células musculares lisas aún viables pasan del estado fenotípico contráctil (quiescente) hacia el de síntesis.

En la capa media la actividad de las CML vuelve a su estado basal a las cuatro semanas, a partir de este punto comienza el proceso de remodelación endotelial en donde las metaloproteinasas juegan un papel primordial<sup>3</sup>. Finalmente las CML en la superficie endoluminal sin endotelizar continúan proliferando a baja velocidad.



**Secuencia de eventos posterior a una lesión endotelial. CML (células musculares lisas). MEC (matriz extracelular).**

## 1.2 LA MAGNITUD DEL PROBLEMA CLÍNICO

La hiperplasia intimal produce estenosis en las venas usadas como injerto para derivaciones arteriales en pacientes con patología aterosclerótica o en la porción venosa de fístulas arteriovenosas usadas en pacientes con hemodiálisis. La estenosis y trombosis son las causas más frecuentes de falla de una derivación arterial o acceso vascular.

### 1.2.1 HIPERPLASIA INTIMAL EN INJERTOS ARTERIALES

Las reconstrucciones arteriales en las cuales se usa un injerto venoso habitualmente fallan a causa de estenosis y trombosis secundaria. La incidencia de este resultado desfavorable a dos años es tan alto como 30% después de derivaciones femoropoplíteas en las cuales se utiliza vena safena como injerto autólogo. La hiperplasia intimal con acumulación de células musculares lisas y matriz extracelular con evidencia de intensa proliferación y apoptosis celular es la principal causa de falla en este tipo procedimientos<sup>4</sup>.

### 1.2.2 HIPERPLASIA INTIMAL EN ACCESOS VASCULARES

En la población que requiere terapia sustitutiva de la función renal, la cual se estima en aproximadamente 230,000 pacientes en Estados Unidos, la hiperplasia intimal que condiciona falla del acceso vascular representa una de las principales causas de morbilidad en este grupo poblacional. En este país los costos relacionados a la falla del acceso vascular se calculan en más de un billón de dólares al año<sup>5</sup>.

Según los estándares de tratamiento en pacientes no candidatos a trasplante renal, la hemodiálisis es el tratamiento más adecuado. Para realizar este tipo de terapia de sustitución renal el paciente debe de tener un acceso vascular que permita el intercambio de sangre entre el paciente y la máquina de hemodiálisis con un adecuado flujo y presión.<sup>6</sup>

El acceso vascular ideal debe de reunir, al menos tres requisitos: permitir el acceso seguro y continuo al sistema vascular, proporcionar flujos suficientes para suministrar la dosis de hemodiálisis programada, y carecer de complicaciones. Existen diferentes tipos de acceso: fístula arteriovenosa, injerto vascular protésico y catéter central.<sup>7</sup> La fístula arteriovenosa es una anastomosis que se realiza entre una arteria y una vena<sup>8</sup>. Según las guías NKF-KDOQI (2006), el mejor acceso vascular es la fístula arteriovenosa autóloga, recomendando utilizar este tipo de acceso en más del 65% de pacientes en una unidad de hemodiálisis. La base de esta preferencia son las bajas tasas de complicaciones (episodios de infección, trombosis, salvamento de acceso), hospitalizaciones y muerte comparando fístulas autólogas con catéter venoso y fístulas con injerto<sup>9</sup>.

Se ha estimado que la disfunción de accesos vasculares es responsable del 20% de todas las hospitalizaciones en pacientes con hemodiálisis. A pesar de ser el acceso ideal las fístulas arteriovenosas autólogas tienen un índice de permeabilidad primaria al año variable, oscilando entre el 40 y el 80%<sup>10</sup>.

Las causas de disfunción temprana del acceso vascular son falla técnica, deficiente planeación preoperatoria, patología cardiovascular concomitante (principalmente insuficiencia cardíaca) y referencia tardía al servicio de nefrología<sup>11</sup>. Sin embargo, dentro de éstas, la principal causa de disfunción de un acceso vascular es *la estenosis venosa como resultado de hiperplasia intimal*<sup>12</sup>.

### 1.3 FISIOPATOLOGÍA DE ESTENOSIS EN DERIVACIONES ARTERIALES Y ACCESOS VASCULARES

Cuando una vena es implantada en un sistema de alto flujo y presión ocurre necesariamente denudación del endotelio que será mayor o menor dependiendo de las condiciones de preparación del injerto, el trauma durante la disección, la presión utilizada para la dilatación del conducto y el tipo de solución utilizada. El engrosamiento intimal es mayor en la porción venosa de una anastomosis arterial. La velocidad del flujo está directamente relacionada con el estrés de cizalla y el estrés tensional sobre el endotelio venoso favoreciendo la adhesión de plaquetas y leucocitos<sup>13</sup>.

Normalmente las células musculares lisas de la capa media se encuentran en una fase inactiva. Éstas son células bien diferenciadas y se caracterizan por tener en su estructura abundantes proteínas contráctiles predominantemente actina y miosina, pero con pobre retículo endoplásmico rugoso. Después del trauma, las células musculares adquieren un abundante retículo endoplásmico e inician la síntesis de matriz extracelular<sup>14</sup>.

#### 1.3.1 DIFERENCIAS EN LA GENERACIÓN DE HIPERPLASIA INTIMAL ENTRE ARTERIAS Y VENAS

Mucha de la investigación actual sobre hiperplasia intimal se enfoca en estos procesos en el riñón. Los vasos en el "otro lado de la biología vascular", no sólo en las arterias sino en las venas son estructural y funcionalmente diferentes de las arterias<sup>15</sup>.

Tanto las venas como las arterias están constituidas por las mismas capas, la capa íntima que contiene células endoteliales, la túnica media que está compuesta por células musculares lisas, elastina y colágeno; y la capa más externa o adventicia que contiene fibroblastos, colágeno y elastina.

Sin embargo existen diferencias importantes en las venas. Constituidas por una capa de células musculares más delgada comparada con las arterias pero teniendo la capacidad de almacenar el 70% del volumen circulante, las venas son importantes reguladores de la homeostasis cardiovascular<sup>15</sup>.

Debido a estas diferencias estructurales, existen también diferencias importantes tanto en la contractilidad como en las propiedades sintéticas de arterias y venas las cuales pueden impactar de forma significativa en la función cardiovascular. En las venas la contracción en respuesta a receptores agonistas es menor comparado con la respuesta de las arterias. El tiempo requerido para alcanzar su contracción máxima es más corta para una vena que para una arteria. Se han encontrado diferencias significativas en la producción de especies reactivas de oxígeno y marcadores de estrés oxidativo.

Diferentes resultados de arterias y venas usados como injertos en derivaciones arteriales ha impulsado la investigación comparando estos dos tipos de vasos sanguíneos y los factores que pueden influenciar su permeabilidad a largo plazo. El mejor ejemplo para este concepto son los resultados de injertos de vena safena comparados con injertos de arteria mamaria interna para puentes coronarios.

La vena safena mayor y la arteria mamaria interna se han utilizado de forma frecuente y rutinaria como injertos en cirugía de puentes coronarios para patología aterosclerótica<sup>16</sup>. La vena safena autóloga es el injerto utilizado con más frecuencia debido a su localización,

longitud y fácil procuración, sin embargo a costa de permeabilidades más reducidas debido a una tasa más elevada de estenosis. Después del primer año de revascularización miocárdica más de 15% de los injertos venosos se encuentran ocluidos<sup>17</sup>. A partir del primer año las tasas de trombosis son tan altas como 4% por año, resultando únicamente 50% de permeabilidad primaria a 10 años de la cirugía<sup>18</sup>. En contraste con la vena safena, la arteria mamaria interna ha demostrado tener más resistencia a la estenosis con tasas de permeabilidad tan altas como 80% a 10 años después del procedimiento<sup>19</sup>.

Después del implante en la circulación arterial el endotelio venoso es expuesto a importantes cambios hemodinámicos. Éstos incluyen alta presión pulsátil en el endotelio no adaptado<sup>20</sup> y de forma secundaria esto resulta en la secreción anormal de agentes vasoprotectores entre ellos prostaciclina y óxido nítrico. La exposición de la matriz subendotelial facilita la deposición de leucocitos, plaquetas y citocinas que inducen la diferenciación de células musculares lisas desde un fenotipo contráctil hacia un fenotipo proliferativo, invasivo y secretor<sup>21</sup>.

Es importante reconocer que las células musculares lisas de venas y arterias son estructuras derivadas de diferentes orígenes embriológicos y exhiben distintas características moleculares<sup>22</sup>. Las células del endotelio venoso tienen una tasa de crecimiento más alta comparadas con su contraparte tanto en estado basal en respuesta a estímulos mitogénicos<sup>23</sup>. La función del endotelio también es diferente en venas comparadas con arterias. El endotelio venoso produce menos prostaciclina<sup>24</sup> y óxido nítrico<sup>25</sup> que el endotelio arterial.

Otro de los eventos críticos que aumentan el riesgo de hiperplasia del endotelio venoso es la fase de procuración y preparación del injerto venoso. Esto incluye la exposición aguda a fuerzas tensionales mecánicas, la distensión del conducto inducida por el cirujano para identificar fugas de ramas adyacentes y la exposición a soluciones ácidas. En estos

escenarios los factores de crecimiento se producen de forma exponencial en el endotelio venoso.

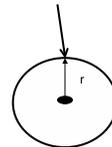
Con estas diferencias en la estructura y fisiología de las venas, teóricamente representan un endotelio con más predisposición a desarrollar hiperplasia intimal que las arterias. Así mismo las diferencias más importantes en expresión basal génica entre arterias y venas se refleja en moléculas de señalización: Eph-B4 en venas and Ephrin-B2 en arterias<sup>26</sup>.

### 1.3.2 PASOS PARA EL DESARROLLO DE HIPERPLASIA INTIMAL VENOSA

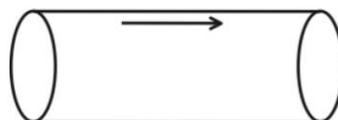
Los eventos más importantes para el inicio de la patogénesis de la hiperplasia intimal venosa son<sup>27</sup>:

A. Lesión quirúrgica en el momento de la creación de la anastomosis vascular debido a que la vena es frecuentemente elongada y manipulada

B. Fuerzas biomecánicas de estiramiento tangencial.



C. Fuerzas hemodinámicas en el sitio de la anastomosis arteriovenosa como resultado de la combinación de fuerzas de cizallamiento y turbulencia.



D. Durante la fase permeabilidad primaria asistida, en el tratamiento de una estenosis, la cual es habitualmente realizada con balón de angioplastia. Sin embargo este tratamiento puede volver a inducir una lesión del endotelio y de esta forma dando paso a la generación de más hiperplasia intimal y estenosis.

#### 1.4 FUERZAS HEMODINÁMICAS EN LA GENERACIÓN DE HIPERPLASIA INTIMAL

Los cambios hemodinámicos presentes en una anastomosis arteriovenosa son muy complejos y existen diferencias significativas dependiendo del momento y mecanismo de acción de estos eventos fisiológicos y fisiopatológicos.

El paso de sangre a través de un sistema vascular genera dos fuerzas hemodinámicas principalmente:

- El flujo sanguíneo produce fuerzas de fricción que actúan en dirección longitudinal sobre la superficie endotelial, expresada como fuerzas de cizallamiento (shear stress), que está directamente relacionada con la velocidad de flujo, la viscosidad de la sangre y el diámetro del vaso sanguíneo.
- Por otro lado, la presión sanguínea genera tensión sobre la pared del vaso, generando fuerzas radiales y tangenciales que dependen de la presión aplicada y de las dimensiones (diámetro y grosor) del vaso sanguíneo. De acuerdo a la Ley de LaPlace las fuerzas tensionales radiales son directamente proporcionales a la presión y al radio del vaso, e inversamente proporcionales a su espesor.

Las fuerzas hemodinámicas son determinantes importantes de la homeostasis vascular. Las fuerzas de cizallamiento inducen importantes efectos antiapoptóticos sobre las células endoteliales,

mientras que un nivel basal de tensión radial es necesario para mantener las CML en un estado diferenciado y fisiológico.

Cuando se producen variaciones significativas en las fuerzas hemodinámicas se inicia un proceso de remodelación estructural en la pared vascular cuya finalidad es restablecer condiciones mecánicas basales. Sin embargo al perderse el balance en este proceso de remodelación, la consecuencia final es la generación de hiperplasia intimal<sup>28</sup>.

*Para estudiar los cambios hemodinámicos en una anastomosis arteriovenosa es muy importante separar ambos mecanismos hemodinámicos debido a que son muy diferentes en cuanto a cronología, vías de señalización y fisiopatología. El presente trabajo evalúa las alteraciones más tempranas, enfocadas en el mecanismo fisiopatológico generado por fuerza tensional radial.*

#### 1.4.1 FUERZAS MECÁNICAS DE TENSIÓN RADIAL

En estudios experimentales se ha demostrado que las fuerzas tensionales sobre el endotelio venoso en una anastomosis arteriovenosa se elevan más de 10 veces, comparado con el nivel basal.

Posterior a la exposición del endotelio venoso a una presión más alta de su nivel basal, se modifican las propiedades estructurales y funcionales intentando restaurar la homeostasis, un proceso denominado remodelación vascular. La remodelación endotelial abarca la migración, proliferación y apoptosis de células endoteliales y células musculares lisas. En fases más avanzadas desencadena los procesos de degradación de la matriz extracelular<sup>29</sup>.

#### 1.4.1.1 Efectos morfológicos

Las fuerzas de estiramiento tangencial afectan la pared del vaso a nivel celular y molecular. Estudios experimentales han demostrado que la tensión generada por la presión intraluminal aumenta el espesor y la composición de la pared<sup>30</sup>. El estiramiento mecánico ejercido por el aumento de la presión intraluminal favorece la hipertrofia e hiperplasia de las CML.

#### 1.4.1.2 Efecto en el fenotipo de las CML

Como parte de la fisiología de la circulación, las fuerzas tensionales radiales (dentro del umbral fisiológico) son esenciales para mantener el fenotipo diferenciado de las células musculares lisas (contráctil). Sin embargo cuando la presión aumenta, el fenotipo cambia de contráctil a sintético.

El fenotipo de CML arterial permanece estable a una presión relativamente más alta en comparación con las venas, debido a que las arterias se exponen fisiológicamente a presiones más altas. Siguiendo este último concepto, las venas tienen más predisposición a generar hiperplasia intimal.

#### 1.4.2 Receptores y transducción de señales

Los receptores sensibles a presión presentes en la superficie de CML permiten a los vasos detectar cambios sutiles en su entorno físico e iniciar diferentes cascadas de mecanotransducción según la naturaleza del estímulo mecánico percibido. Los receptores y cascadas moleculares son diferentes para las fuerzas de cizallamiento y fuerzas de tensión radial.

Las fuerzas mecánicas pueden así iniciar cascadas de transducción de señales que conducen a cambios funcionales dentro de la célula, a menudo desencadenados por la activación de receptores acoplados a proteína G (cizallamiento), receptores de tirosina-quinasa (tensión radial) o canales iónicos.

Las fuerzas de tensión radial en las etapas más tempranas activan receptores de tirosina-quinasa, en donde el PDGF juega un papel fundamental. Estos cambios moleculares se pueden detectar de una forma tan temprana como 8 minutos posterior a la lesión vascular<sup>31,32</sup>.

#### 1.4.3. Expresión de PDGF<sup>31</sup>

Es importante reconocer la expresión de mediadores durante la patogénesis de la hiperplasia intimal los cuales incluso pueden ser potenciales blancos terapéuticos. En las fases iniciales del desarrollo de hiperplasia intimal se ha demostrado que los factores de crecimiento constituyen importantes reguladores de la migración y proliferación celular. Los factores de crecimiento más potentes en la promoción de proliferación y migración celular son péptidos que tienen la capacidad de unirse a receptores de tirosina-quinasa. Los dos factores de crecimiento más estudiados son el derivado de plaquetas y fibroblastos. Existe evidencia de liberación de PDGF durante los primeros minutos de la manipulación de células endoteliales. FGF tiene una liberación en etapas más tardías.

El factor de crecimiento derivado de plaquetas fue originalmente descrito en sangre, pero también es producido por células musculares lisas y endoteliales. Se trata de una glicoproteína compuesta por dos cadenas de polipéptidos con peso de 27 a 31 kd. El PDGF consiste en moléculas diméricas que pueden existir como homodímeros o heterodímeros de dos cadenas peptídicas diferentes pero relacionadas llamadas PDGF-A y PDGF-B (es decir,

PDGF-AA, PDGF-BB y PDGF-AB). Las células endoteliales secretan el homodímero PDGF-BB. PDGF es un importante mitógeno y desempeña un papel importante en la migración de CML desde la capa media a la capa íntima.

La producción de este factor de crecimiento ha sido evaluada experimentalmente. Los injertos venosos implantados en la circulación arterial promueven una producción exagerada de factores derivados de plaquetas. Cuando estos injertos son reimplantados en la circulación venosa, la producción disminuye. La administración de antagonistas contra el factor de crecimiento derivado de plaquetas en ratas sometidas a angioplastia arterial provocó una reducción del 40% de hiperplasia intimal.

Tras la liberación de PDGF, la migración de células musculares lisas se produce en su mayoría dentro de los primeros 7 días. A partir de entonces, el posterior engrosamiento neointimal depende casi exclusivamente de la deposición de matriz extracelular, sobre todo estimuladas por el factor de crecimiento derivado de fibroblastos.

## 1.5 ESTRATEGIAS PROPUESTAS PARA REDUCCIÓN DE HIPERPLASIA INTIMAL

De la mano de estos conceptos, es necesario proponer estrategias dirigidas a la prevención de hiperplasia intimal. Se han propuesto tratamientos farmacológicos así como innovaciones en cirugía abierta y endovascular, sin embargo hasta el momento sus resultados continúan siendo controversiales<sup>33</sup>.

Posterior a una lesión vascular que denuda el endotelio, la exposición del subendotelio y de la capa media genera contacto directo con la sangre, un proceso altamente trombogénico, en donde la fibrina y plaquetas son componentes clave. La adhesión plaquetaria está mediada por integrinas y glicoproteínas IIb / IIIa. La agregación plaquetaria provoca la liberación de numerosos factores

incluyendo el tromboxano A<sub>2</sub>, ADP, serotonina y metaloproteinasas 2 y 9. Además se liberan los factores de crecimiento y quimiotácticos previamente mencionados.

### 1.5.1 EFECTO DE FÁRMACOS ANTIAGREGANTES PLAQUETARIOS

La terapia antiplaquetaria tanto en animales como en seres humanos ha demostrado la importancia de las plaquetas en el proceso de estenosis vascular. Debido a que la agregación plaquetaria constituye uno de los principales factores en el inicio y mantenimiento de la respuesta hiperplásica de la capa íntima se ha propuesto utilizar fármacos que inhiban las funciones plaquetarias para reducir la respuesta endotelial.

En estudios experimentales previos sobre fármacos antiagregantes particularmente sobre ticlopidina y clopidogrel, se demostró la efectividad de la terapia antiagregante en la prevención de hiperplasia neointimal. Existen además fármacos aún no evaluados en el campo de hiperplasia neointimal, tal es el caso de Cilostazol<sup>33</sup>.

### 1.5.2 CILOSTAZOL

Cilostazol es un fármaco hito utilizado en pacientes con insuficiencia arterial y claudicación intermitente para mejorar el flujo sanguíneo y el dolor que impide caminar, con resultados favorables<sup>34</sup>.

Cilostazol es un derivado de 2-oxo-quinoline con actividad antitrombótica, vasodilatadora, antimitogénica y cardiotónica. Su compuesto es un potente inhibidor de Fosfodiesterasa III. Debido a su mecanismo de acción, inhibe la agregación plaquetaria y tiene importantes efectos antitrombóticos in vivo. Aunado a esto, relaja las células musculares lisas además de inhibir su mitogénesis y migración<sup>35</sup>.

Otros efectos farmacológicos en arterias observados con Cilostazol son la inhibición de la proliferación vascular inducida por factor de crecimiento derivado de plaquetas. Este efecto podría ser responsable del menor número de restenosis coronaria observado en pacientes tratados con cilostazol para insuficiencia arterial periférica<sup>35</sup>.

Cilostazol es administrado por vía oral y es absorbido rápidamente. Los niveles plasmáticos se alcanzan a las 3-4 horas tras su administración, fijándose en un 95-98% de proteínas plasmáticas sobre el albúmin.

En su metabolismo intervienen fundamentalmente los citocromos CYP450 y CYP3A4. Es eliminado predominantemente por el metabolismo y la subsecuente excreción urinaria de los metabolitos. Los niveles plasmáticos disminuyen a los 10,5 horas. Durante los estudios preclínicos, cilostazol mostró niveles séricos adecuados en ratones, rata, cuyo y conejo<sup>36</sup>.

*De la mano de estos conceptos, es necesario proponer estrategias para la prevención de estenosis secundaria a hiperplasia intimal, tanto de injertos de derivación arterial como de fístulas arteriovenosas para hemodiálisis. Es importante reconocer las diferencias tanto en el tipo de endotelio involucrado (arterial y venoso), así como en la cronología y mecanismo de las fases de generación de hiperplasia intimal.*

## **2. HIPÓTESIS**

El uso de cilostazol reduce la formación de hiperplasia intimal del endotelio venoso en un modelo experimental de fuerza tensional radial.

#### HIPÓTESIS NULA

El uso de cilostazol no genera cambios en la formación de hiperplasia intimal en la porción venosa de una fístula arteriovenosa femoral realizada en un modelo experimental.

#### HIPÓTESIS ALTERNA

El uso de cilostazol reduce la formación de hiperplasia intimal en la porción venosa de una fístula arteriovenosa femoral realizada en un modelo experimental.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Las fístulas arteriovenosas autólogas y derivaciones arteriales tienen un índice de permeabilidad primaria al año variable, oscilando entre el 40 y el 80%. La principal causa de trombosis de la fístula es secundario a estenosis de la porción venosa secundaria a formación de hiperplasia intimal.

### **4. JUSTIFICACIÓN**

A pesar de la magnitud del problema clínico ha habido escasez de intervenciones terapéuticas en este campo, especialmente en cuanto a investigación celular y molecular enfocada a hiperplasia intimal en el endotelio venoso.

## 5. METODOLOGÍA

Se trata de un diseño experimental, prospectivo, aleatorizado y controlado.

### 5.1 MODELO EXPERIMENTAL DE FUERZA TENSIONAL RADIAL

La realización de este proyecto se llevó a cabo con el apoyo del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina UNAM.

Se trata de conejos de raza Nueva Zelanda

Clasificación taxonómica

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

Criterios de inclusión

- a) Edad: 1 año – 2 años
- b) Sexo: Macho
- c) Peso: 2 a 3 kg

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.

## Alimentación (alimento y agua)

El alimento para conejo está constituido por nutrientes balanceados para los requerimientos o necesidades esenciales de mantenimiento. El alimento comercial se presenta extrudizado. La composición nutricional de la dieta recomendada es:

- 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 debe ser potable y administrarse a libre demanda

## FASE PREOPERATORIA

- Antropometría
- Medición de signos vitales
- Ayuno de 12 hrs
- Tricotomía de la región quirúrgica (femoral derecha e izquierda)

## INDUCCIÓN ANESTÉSICA

Fármaco	Mecanismo de acción	Dosis	Vía de administración	Duración	Observaciones
Xilacina	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 TRANSOPERATORIO

Fármaco	Mecanismo de acción	Dosis	Vía de administración	Duración	Observaciones
Pentobarbital	Barbitúrico	40 mg/kg	IV	40 – 50 min	Anestesia general

### 5.1.2 CÁLCULO DEL TAMAÑO DE MUESTRA

Se realizó el cálculo de tamaño de muestra para comparar medias en dos grupos independientes utilizando la siguiente fórmula:

$$n_c = n_e = \frac{2 * S^2}{D^2} * (Z_{\alpha/2} * Z_{\beta})^2$$

Donde  $n_c$  es el tamaño muestral por el grupo control y  $n_e$  es del grupo con un intervención intervencional,  $D=(M_c-M_e)$ ,  $M_c$  es la media del primer grupo y  $M_e$  es la media del segundo,  $S^2$  es la varianza de ambas distribuciones,  $Z_{\beta}$  es el valor crítico de la función normal estándar en el nivel de probabilidad  $(1-\beta)$ .

Aunque la literatura en cuanto a hiperplasia intimal venosa en modelos experimentales animales, se utilizaron datos de estudios piloto realizados en el sistema arterial de la misma especie y la misma localización anatómica.

### GRUPOS

Se incluyeron en el presente estudio un total de 12 conejos de la especie *Oryctolagus cuniculus*, raza Nueva Zelanda, de sexo masculino, cuyos pesos variaban de 2000 grs a 3000 grs y que fueron obtenidos del bioterio del Departamento de Cirugía de la UNAM.

- Dos subgrupos (6 conejos cada uno)
- Un grupo recibió **CILOSTAZOL** y el otro fue control
- El grupo experimental recibió el fármaco en dosis de **20 mg / kg, c/ 12 hrs.** La administración se realizó por vía oral y este proceso fue supervisado por el médico veterinario responsable del proyecto.

### 5.1.3 DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA QUIRÚRGICA

Todos los conejos fueron debidamente preparados para los procedimientos quirúrgicos por el personal del Departamento de Cirugía (UNAM). Así mismo la vigilancia y cuidados postoperatorios también fueron supervisados por el médico veterinario responsable del proyecto.

Descripción de la técnica quirúrgica:

#### FASE I

Con el modelo experimental colocado en decúbito supino. Colocación de campos estériles, bajo anestesia general. La anestesia fue inducida con la combinación de Ketamina intramuscular (50 mg/kg de peso) y xilacina intramuscular (6 mg/kg de peso). La conducción anestésica se realizó con Pentobarbital (40 mg/kg).

Esta modalidad de anestesia se realizó apegándonos al *“The institution I nim I r n us ommitt H rv r m i l shool”<sup>37</sup>*.

El primer paso consiste en realizar la primer toma de muestra sanguínea periférica (oreja - tiempo 0). Posteriormente se realiza incisión inguinal izquierda (por debajo del ligamento inguinal) hasta localizar paquete neurovascular femoral. Se realiza punción directa de vena femoral utilizando catéter #24. Se *v nz guí hi rofilí 0.14” h st v n v inf rior y aurícula derecha* bajo

control fluoroscópico. Utilizando sistema de rápido intercambio se avanza balón de angioplastia de 20 x 4 mm. Bajo control fluoroscópico se posiciona balón en vena femoral ipsilateral.

Se realiza insuflación controlada a 14 atm de presión (presión de ruptura), para realizar una lesión en vena femoral secundaria a sobre distensión vascular durante 3 minutos. *Utilizando este método se logra realizar una lesión aguda en el endotelio venoso por sobredistensión del 300% de su diámetro normal.*

Se retira balón de angioplastia y posteriormente guía, bajo visión directa se realiza control angiográfico para verificar permeabilidad de sistema venoso profundo y arterias pulmonares. Se realiza reparación de sitio de punción venosa utilizando prolene vascular 8-0. Finalmente se cierra herida por planos (tejido celular subcutáneo con Vycril 4-0, piel con prolene cuticular 4-0).



## MANEJO POSTOPERATORIO

En este protocolo la vigilancia del modelo durante el periodo de recuperación fue fundamental. Se vigiló al modelo experimental hasta que fue capaz de incorporarse y permanecer en postura habitual, monitorizando continuamente los signos vitales. Durante las primeras horas de recuperación se procuró su comodidad general cuidando la temperatura ambiental, alimento, agua y limpieza del lecho. Evitar hipotermia utilizando mantas térmicas también fue prioridad.

## CONTROL DEL DOLOR

El alivio del dolor y evitar el sufrimiento del modelo experimental también fueron son condiciones éticas y legales imperantes en la realización de este protocolo. Estrategia para analgesia:

Fármaco	Mecanismo de acción	Dosis	Vía de administración	Duración
Paracetamol	Inh. PGLD	100 mg/kg	VO	12-24 h

## FASE II

A las 12 horas posterior a la angioplastia venosa (tiempo teórico de la liberación máxima de factor de crecimiento derivado de plaquetas) se realizó la segunda toma de muestra de sangre periférica (oreja).

## FASE III

Al 7mo día del procedimiento (término de la fase inicial detonante del hiperplasia intimal), se realiza eutanasia del modelo y procuración de muestras.



Con el modelo experimental colocado en decúbito supino. Colocación de campos estériles, bajo anestesia general. Se realiza en un primer tiempo quirúrgico reexploración de herida femoral izquierda. Se localiza paquete neurovascular femoral y se realiza procuración del segmento venoso femoral (con angioplastia) por encima del sitio de punción. Se realiza procuración del segmento venoso. En un segundo tiempo quirúrgico se realiza exploración de herida femoral derecha. Se localiza paquete neurovascular femoral y se realiza procuración del segmento venoso femoral (control). Durante la realización del procedimiento se realiza toma de muestra sanguínea (día 7).

**Tabla 1. Organización de procuración por cada modelo experimental**

Sangre periférica (ELISA)	Vena plastía Histopatología	Vena control Histopatología
PDGF (Tiempo 0)		
PDGF (12 Horas)		
PDGF (7 Días)	★	★

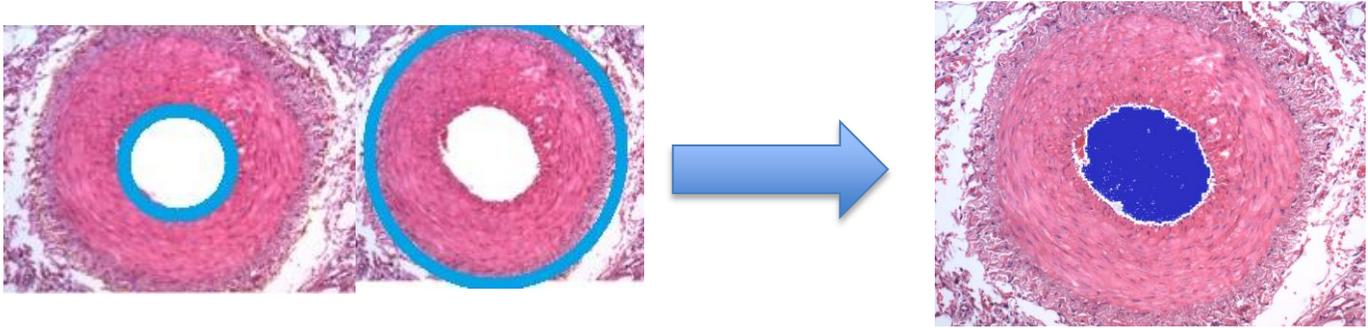
## 6. ANÁLISIS

### 6.1 ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO

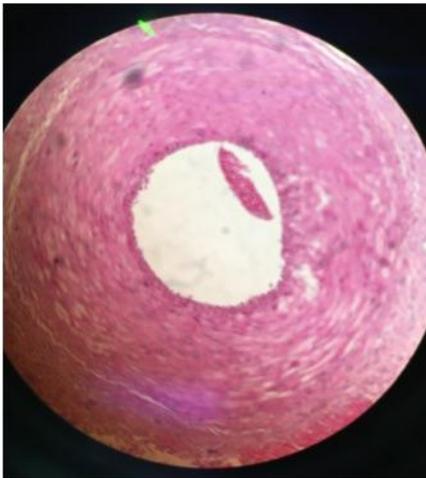
Se incluyeron las muestras en formol al 10% para su análisis histológico.

Cabe mencionar que en todos los modelos experimentales se realizó la procuración de la vena con plastía y además se procuró la vena femoral contralateral la cual sirvió como control histológico.

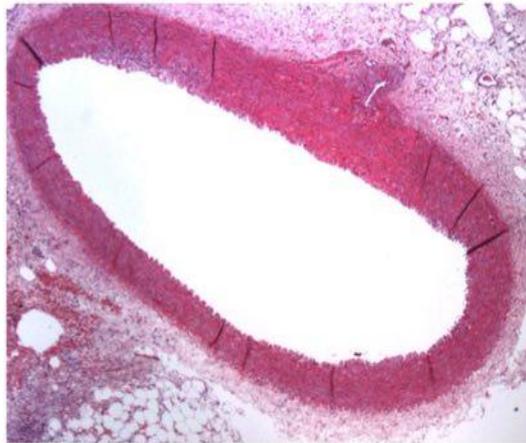
Se utilizó el Software Image J, para realizar la medición del diámetro de la circunferencia interna y externa. De esta forma se puede realizar una medición objetiva de la hiperplasia intimal y del porcentaje de estenosis endoluminal generado. La realización de estos procedimientos fue supervisado por un patólogo experto en el área.



Mediante esta técnica experimental se logró producir en promedio 60% de estenosis secundaria a hiperplasia intimal durante los en los primeros 7 días comparando la vena con angioplastía con la vena control.



Vaso con Angioplastía (día 7)



Control (día 7)

## 6.2 INMUNOHISTOQUÍMICA

Las muestras de sangre periférica se utilizaron para medir las concentraciones séricas de PDGF-BB, utilizando ELISA para la detección de anticuerpos específicos para PDGF-BB en conejo. Se utilizó el Kit RayBio® Rabbit PDGF-BB ELISA.

## 6.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se expresaron como la media +/- error estándar (ES) de 3-5 experimentos. Se utilizó una ANOVA de una vía seguido de una prueba post-hoc de Tukey para comparación de las medias ( $P < 0.05$ ), utilizando el Software Prism Graph Pad versión 5.0.

## 7. RESULTADOS

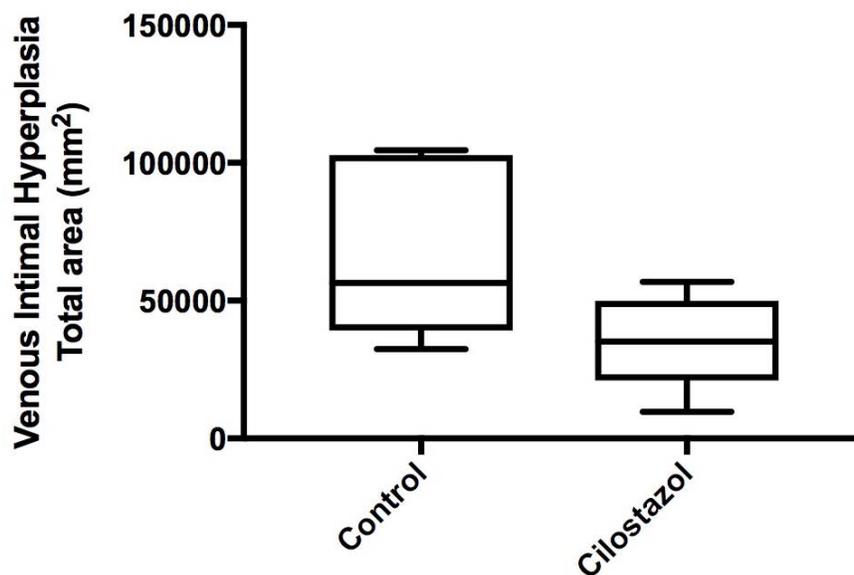
### 7.1 EL MODELO EXPERIMENTAL

Mediante un modelo de angioplastía venosa se logró reproducir los eventos detonantes de las primeras fases en el desarrollo de hiperplasia intimal. Estos cambios se reflejaron a nivel sistémico e histopatológico. La experiencia del manejo del conejo como modelo experimental cumplió las expectativas técnicas y esto aunado a la ausencia prácticamente total de complicaciones (0% de mortalidad, 0% de morbilidad)

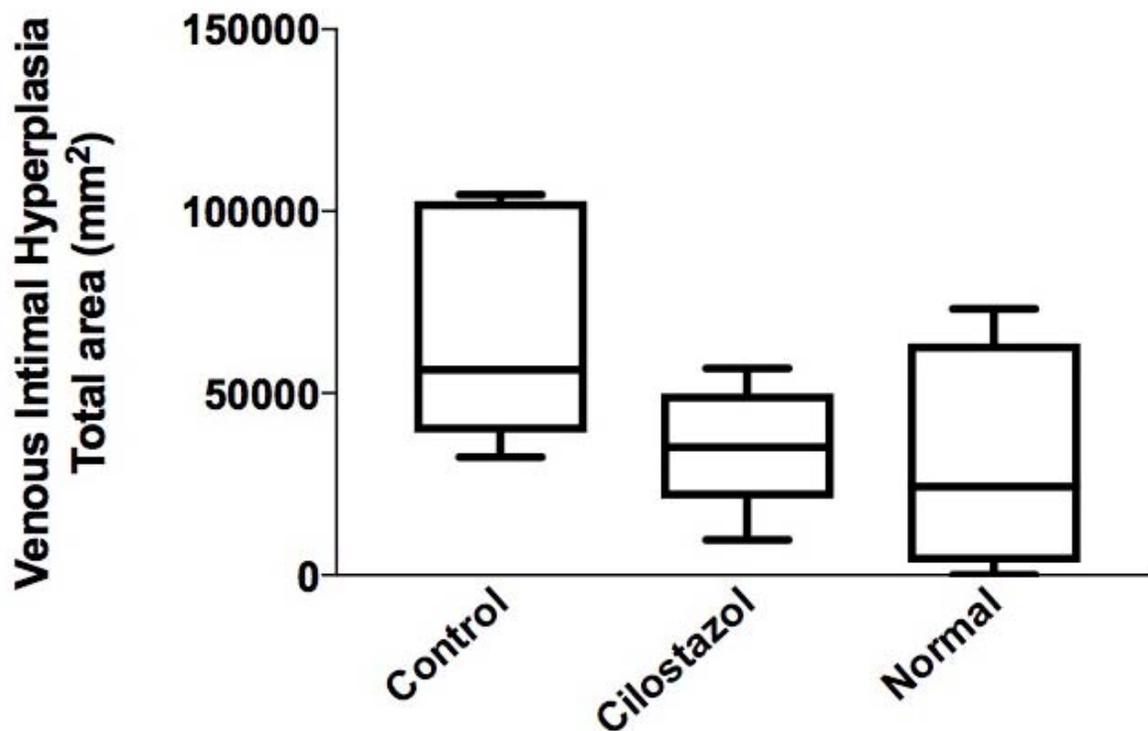
## 7.2 CAMBIOS HISTOPATOLÓGICOS SECUNDARIOS A UNA LESIÓN VASCULAR POR SOBREDISTENSIÓN DEL ENDOTELIO VENOSO

Con el modelo experimental propuesto se logró reproducir a nivel histopatológico los cambios relacionados a hiperplasia intimal durante los primeros 7 días. El promedio de estenosis generada con la angioplastia venosa fue de 60 % comparando con el modelo control con el experimental.

Al comparar el grupo experimental y el grupo control se observó una diferencia estadísticamente significativa observándose menor porcentaje de estenosis luminal en el grupo experimental de conejos tratados con cilostazol.



*Valores crudos expresados en mm<sup>2</sup> comparando el grupo control (sin fármaco) y el grupo experimental*



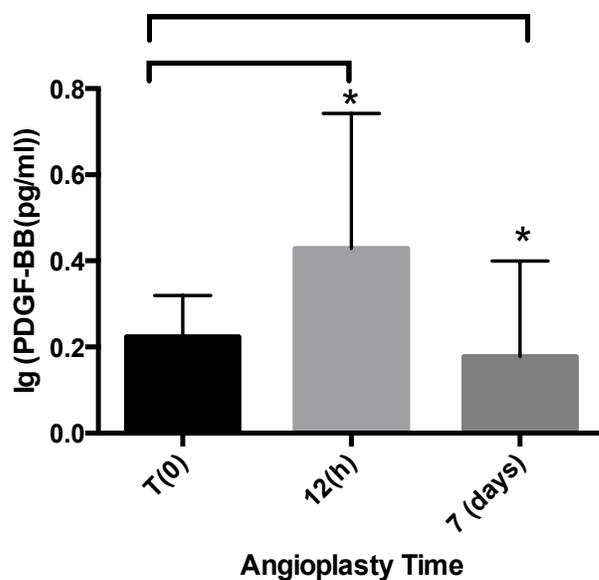
*Valores crudos expresados en mm<sup>2</sup> comparando el grupo control (sin fármaco), el grupo experimental y el grupo con endotelio venoso NORMAL*

### 7.3 EVALUACIÓN DE LOS NIVELES SÉRICOS DE PDGF CON TÉCNICA DE ELISA

En ambos grupos se evaluaron los niveles séricos de PDGF-BB en tres periodos cronológicos diferentes (Basal, 12 horas y 7 días).

### 7.3.1 GRUPO CONTROL

A las 12 hrs después de la lesión vascular se observó aumento significativo en los niveles séricos de PDGF-BB. Éstos niveles volvieron a las cifras basales hacia el séptimo día. Estos hallazgos coinciden con la información reportada en la literatura.



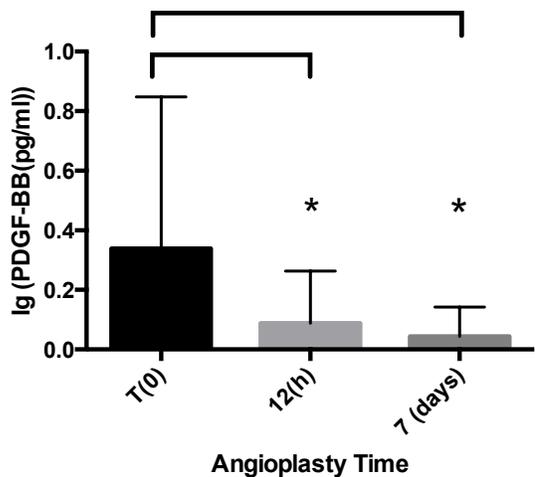
#### GRUPO CONTROL de

Niveles de Ig para factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB (pg / ml) en 3 periodos diferentes (0h, 12h y 7 días).

Los experimentos por grupo \* p <0,05 indican diferencias con respecto al control. Se utilizó ANOVA de una vía y posteriormente una prueba post-hoc de Tukey para comparación de medias.

### 7.3.2 GRUPO EXPERIMENTAL

En el grupo de conejos tratados con cilostazol hubo una reducción significativa en los niveles séricos de PDGF-BB a las 12 horas de la lesión vascular y estos cambios persistieron hasta el séptimo día.

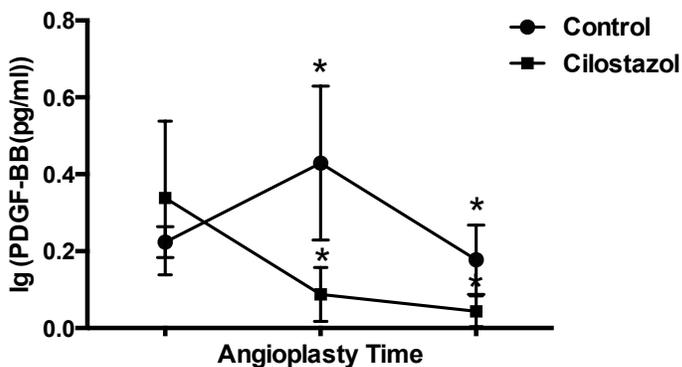


### GRUPO EXPERIMENTAL de

Niveles de Ig para factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB (pg / ml) en 3 periodos diferentes (0h, 12h y 7 días).

Los experimentos por grupo \* p <0,05 indican diferencias con respecto al control. Se utilizó ANOVA de una vía y posteriormente una prueba post-hoc de Tukey para comparación de medias.

Se compararon los hallazgos del grupo control (sin fármaco) y experimental (cilostazol). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, los cuales fueron más evidentes a las 12 horas de la lesión vascular, aunque también se encontró diferencia estadísticamente significativa en el séptimo día.



### GRÁFICA COMPARATIVA ENTRE GRUPO CONTROL Y EXPERIMENTAL de

Niveles de Ig para factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB (pg / ml) en 3 periodos diferentes (0h, 12h y 7 días).

Los experimentos por grupo \* p <0,05 indican diferencias con respecto al control. Se utilizó ANOVA de una vía y posteriormente una prueba post-hoc de Tukey para comparación de medias.

## 8. DISCUSIÓN

Posterior a una angioplastia con balón en el endotelio venoso se crea una obvia lesión vascular. Esta lesión genera denudación de las células endoteliales. Inmediatamente después de la lesión se adhieren y de granulan plaquetas dentro del vaso afectado. Las células musculares lisas inician su proliferación en la capa media aproximadamente en las primeras 12 horas después de la lesión. Durante los cuatro días siguientes las células musculares lisas migran hacia la capa íntima donde algunas de ellas continúan proliferando generando estenosis del lumen del vaso.

Posteriormente existe deposición de matriz extracelular alrededor de la capa íntima, lo cual agrava la estenosis. Se ha demostrado que uno de los eventos que regula las fases iniciales de proliferación de células musculares lisas en la capa media y su migración a la capa íntima es detonado por el factor de crecimiento derivado de plaquetas el cual es liberado de plaquetas y células endoteliales.

Después de una lesión vascular secundaria a fuerzas de tensión radial, la matriz extracelular se encuentra desorganizada, las células pierden contacto entre ellas y entran en apoptosis. Para compensar aquellas células que sobreviven a la lesión inicial, los factores de crecimiento facilitan el engrosamiento de la capa íntima.

Una pregunta que surge a raíz de estas observaciones es si alguno de estos mediadores tiene un papel más importante en la formación de hiperplasia intimal, siendo esto fundamental debido al interés en desarrollar blancos terapéuticos para mejorar la permeabilidad de injertos venosos y fístulas para hemodiálisis. Existe numerosa información experimental la cual sugiere que el factor de crecimiento derivado de plaquetas es especialmente importante. Esto fue comprobado en nuestro trabajo en donde se observó mayor concentración sérica y de igual importancia, se observó una correlación con los hallazgos histopatológicos.

Con base en estos hallazgos el bloqueo teórico del factor de crecimiento derivado de plaquetas puede generar prevención y disminución efectiva de la hiperplasia intimal debido que afecta tanto la proliferación como la migración de células musculares lisas. Este concepto se reflejó en los cambios sérico e histológicos en el grupo experimental, y cuya causa se atribuye al bloqueo de la agregación plaquetaria secundario a los efectos farmacológicos de Cilostazol.

Por otro lado estudiar la cronología de la generación de hiperplasia intimal fue un punto fundamental en la realización de este trabajo. Se ha demostrado pérdida aguda de células endoteliales en la capa media como de forma tan temprana como 20 minutos posterior a una lesión del endotelio inducida por distensión con balón. Así mismo, se han observado numerosas células apoptóticas en la capa media tan temprano como 30 minutos después de la insuflación y un 70% de pérdida en la celularidad evidente después de 90 minutos de la lesión.

De hecho se ha demostrado la actividad de señales mediadoras apoptóticas las cuales se encuentran significativamente elevadas después de 10 minutos de una lesión vascular por elongación del endotelio.

*De la mano de estos conceptos la intención de este trabajo fue precisamente estudiar los efectos de la agregación plaquetaria usando cilostazol durante las fases más tempranas de la formación de hiperplasia intimal venosa. Como pudimos observar cilostazol bloqueó de forma significativa PDGF en las primeras 12 horas (pico teórico de liberación) y esto asociado a también a la reducción en el porcentaje de hiperplasia intimal a nivel histopatológico.*

## **9. CONCLUSIÓN**

A pesar de los innumerables ensayos clínicos basados en el sistema arterial sorprendentemente pocos estudios han evaluado profundamente los mecanismos de reparación de una lesión vascular

en el endotelio venoso. En particular existe poca formación en cuanto al patrón, tiempo, curso y mecanismos moleculares fisiológicos y patológicos que son la base de este proceso.

Los mecanismos de generación de hiperplasia intimal en una fístula arteriovenosa o derivación arterial son diferentes tanto en mecanismo de acción y cronología, por lo que la mejor estrategia es estudiar estas fases por separado y en forma específica. La generación de hiperplasia intimal tiene vías de señalización molecular diferentes dependiendo su mecanismo fisiopatológico (Stretch / Shear stress). En este trabajo nos enfocamos en estudiar los mecanismos durante las primeras etapas de generación de hiperplasia intimal enfocados en el PDGF como principal mediador.

El uso de Cilostazol demostró una reducción significativa de hiperplasia intimal posterior a una lesión vascular de un endotelio venoso durante su fase más temprana. Esto fue asociado a una disminución significativa en los niveles séricos de PDGF, así como en el porcentaje de estenosis intraluminal reflejados en los hallazgos histopatológicos. La principal importancia es que a raíz de estos resultados se pudiera considerar al uso de cilostazol como una estrategia terapéutica lo que podría justificar la realización de un ensayo clínico controlado.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Roy-Chaudhury P, Sukhatme VP, Cheung AK. Hemodialysis vascular access dysfunction: a cellular and molecular viewpoint. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:1112–27.
2. Weiss MF, Scivittaro V, Anderson JM. Oxidative stress and increased expression of growth factors in lesions of failed hemodialysis access. *Am J Kidney Dis* 2001; 37: 970–980
3. Lee T, Roy-Chaudhury P. Advances and new frontiers in the pathophysiology of venous neointimal hyperplasia and dialysis access stenosis. *Adv Chronic Kidney Dis* 2009; 16: 329–338
4. Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury part 1: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 2003;108:1912–6. <http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.0000093660.86242.BB>.
5. Hawa N. Siti a,b, Y. Kamisah a, J. Kamsiah a. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascular Pharmacology* 71 (2015) 40–56.

6. US Renal Data System (online 2007) USRDS annual data report: atlas of chronic kidney disease and end-stage renal disease in the United States.
7. Ethier J, Mendelssohn DC, Elder SJ, Ha-segawa T, Akizawa T, Akiba T, Canaud BJ, Pisoni RL: Vascular access use and outcomes: an international perspective from the dialysis outcomes and practice patterns study. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23: 3219–3226.
8. Tordoir J, Canaud B, Haage P, Konner K, Basci A, Fouque D, Kooman J, Martin-Malo A, Pedrini L, Pizzarelli F, et al: EBPg on vascular access. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22(suppl 2):ii88–ii117.
9. Van Tricht I, De Wachter D, Tordoir J, Verdonck P: Hemodynamics and complications encountered with arteriovenous fistulas and grafts as vascular access for hemodialysis: a review. *Ann Biomed Eng* 2005;9:1142–1157.
10. Schild AF, Perez E, Gillaspie E, Seaver C, Livingstone J, Thibonnier A: Arteriovenous fistulae vs arteriovenous grafts: a retrospective review of 1 700 consecutive vascular access cases. *J Vasc Access* 2008;9:231–235.
11. Allon M, Ornt DB, Schwab SJ et al. Factors associated with the prevalence of arteriovenous fistulas in hemodialysis patients in the HEMO study. Hemodialysis (HEMO) Study Group. *Kidney Int* 2000;58:2178–85.
12. Roy-Chaudhury P, Sukhatme VP, Cheung AK. Hemodialysis vascular access dysfunction: a cellular and molecular viewpoint. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:1112–27.
13. Owens CD. Adaptive changes in autogenous vein grafts for arterial reconstruction: clinical implications. *J Vasc Surg* 2010; 51: 736–746
14. Gibson KD, Gillen DL, Caps MT et al. Vascular access survival and incidence of revisions: a comparison of prosthetic grafts, simple autogenous fistulas, and venous transposition fistulas from the United States Renal Data System Dialysis Morbidity and Mortality Study. *J Vasc Surg* 2001; 34: 694–700
15. Theodora Szasz, Keshari Thakali, Gregory D. Fink, and Stephanie W. Watts. A Comparison of Arteries and Veins in Oxidative Stress: Producers, Destroyers, Function, and Disease. Department of Pharmacology and Toxicology, Michigan State University.
16. Nil A. Turner, PhD, S lin Ho, BS, Philip W rburton, D vi J. O'R g n, MD, FRCS,b and Karen E. Porter, PhDa. Smooth muscle cells cultured from human saphenous vein exhibit increased proliferation, invasion, and mitogen-activated protein kinase activation in vitro compared with paired internal mammary artery cells. *JOURNAL OF VASCULAR SURGERY* Volume 45, Number 5.
17. Suma H. Arterial grafts in coronary bypass surgery. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 1999;5:141-5.
18. Motwani JG, Topol EJ. Aortocoronary saphenous vein graft disease: pathogenesis, predisposition, and prevention. *Circulation* 1998;97: 916-31.
19. Nwasokwa ON. Coronary artery bypass graft disease. *Ann Intern Med*

1995;123:528-45.

20. Lemson MS, Tordoir JH, Daemen MJ, Kitslaar PJ. Intimal hyperplasia in vascular grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000;19:336-50.

21. Sterpetti AV, Cucina A, Lepidi S, Randone B, Stipa F, Aromatario C, et al. Progression and regression of myointimal hyperplasia in experimental vein grafts depends on platelet-derived growth factor and basic fibroblastic growth factor production. *J Vasc Surg* 1996;23:568-75.

22. 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. *Arterio- scler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1058-65.

23. Yang Z, Oemar BS, Carrel T, Kipfer B, Julmy F, Luscher TF. Different proliferative properties of smooth muscle cells of human arterial and venous bypass vessels: role of PDGF receptors, mitogen- activated protein kinase, and cyclin-dependent kinase inhibitors. *Circulation* 97(2):181-187, 1998.

24. Motwani JG, Topol EJ. Aortocoronary saphenous vein graft disease: pathogenesis, predisposition, and prevention. *Circulation* 97(9): 916-931, 1998.

25. Shapira OM, Xu A, Aldea GS, Vita JA, Shemin RJ, Keaney JF Jr. Enhanced nitric oxide-mediated vascular relaxation in radial artery compared with internal mammary artery or saphenous vein. *Circulation* 100(Suppl 19):II322-II327, 1999.

26. Porter KE, Naik J, Turner NA, Dickinson T, Thompson MM, London NJ. Simvastatin inhibits human saphenous vein neointima formation via inhibition of smooth muscle cell proliferation and migration. *J Vasc Surg* 2002;36:150-7.

27. Tomasz Zubilawicz J, Wronski A, Bourriand P, Piotrowski A, Annunziati M, Guinault B, Brigitt Muscatelli-Groux J, Jazy Michalik D, Dirlikov B, Jéan Pierre Becquemin E, Allaire E. Injury in vascular surgery – the intimal hyperplastic response. *Med Sci Monit*, 2001; 7(2): 316-324

28. Stephanie Lehoux. Redox signalling in vascular responses to shear and stretch. *Cardiovascular Research* 71 (2006) 269 – 279.

29. M.A. Anwar J. Shalhoub C.S. Lim M.S. Gohel A.H. Davies. The Effect of Pressure-Induced Mechanical Stretch on Vascular Wall Differential Gene Expression. *J Vasc Res* 2012;49:463–478 DOI: 10.1159/000339151.

30. Kyo Won Seo, Seung Jin Lee, Yun Hak Kim, Jin Ung Bae, So Youn Park, Sun Sik Bae, Chi Dae Kim\*  
Mechanical Stretch Increases MMP-2 Production in Vascular Smooth Muscle Cells via Activation of PDGFR- $\beta$ / Akt Signaling Pathway. doi:10.1371/journal.pone.0070437.

31. Lehoux S, Castier A, Tedgui A. Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. *Journal of Internal Medicine* 2006; 259: 381–392.

32. Yanhua Hu, Günther Böck, Georg Wick, and Qingbo Xu. Activation of PDGF

receptor  $\alpha$  in vascular smooth muscle cells by mechanical stress. *The FASEB Journal*. Vol. 12 September 1998.

33. Paszkowiak J, Dardik A: Arterial wall shear stress: Observations from the bench to the bedside. *Vasc Endovascular Surg* 2003, 37:47-57.

34. Fabio A. Kudo, Yuka Kondo, Akihito Muto, Keiko Miyazaki, Alan Dardik, Masayasu Nishibe, and Toshiya Nishibe. Cilostazol Suppresses Neointimal Hyperplasia in Canine Vein Grafts. *Surg Today* (2009) 39:128–132.

35. William S Weintraub MD. The vascular effects of cilostazol. The vascular effects of cilostazol. *Can J Cardiol* 2006;22(Suppl B):56B-60B.

36. John Robert Crouse III, MD, Michael C. Allan, MD, and Marshall B. Elam, MD, PhD. Clinical Manifestation of Atherosclerotic Peripheral Arterial Disease and the Role of Cilostazol in Treatment of Intermittent Claudication. *Journal of Clinical Pharmacology*, 2002;42:1291-1298.

37. The institution I hereby inform you omitt Harvard Medical School”  
<https://hms.harvard.edu/departments/hma-standing-committee-animals/assurances>

35. Matthew J. Pollman, Jennifer L. Hall, Gary H. Gibbons. Determinants of Vascular Smooth Muscle Cell Apoptosis After Balloon Angioplasty Injury Influence of Redox State and Cell Phenotype. *Circulation Research*.

36. Tomasz Zubilewicz<sup>1,2</sup>, Jacek Wronski<sup>1</sup>, Armand Bourriez<sup>2</sup>, Piotr Terlecki<sup>1</sup>, Anne-Marie Guinault<sup>2</sup>, Brigitte Muscatelli-Groux<sup>2</sup>, Jerzy Michalak<sup>1</sup>, Didier Mélière<sup>2</sup>, Jean Pierre Becquemin<sup>2</sup>, Eric Allaire<sup>2</sup> Injury in vascular surgery – the intimal hyperplastic response. *Med Sci Monit*, 2001; 7(2): 316-324.

37. Prescott M, Webb R, Reidy MA: Angiotensin-converting enzyme inhibitor versus angiotensin II, AT receptor antagonist: effects on smooth muscle cell migration and proliferation after balloon catheter injury. *Am J Pathol*, 1991; 139: 1291-302

38. Cox JL, Chiasson DA, Gottlieb AI: Stranger in a strange land: the pathogenesis of saphenous vein graft stenosis with emphasis on structural and functional differences between veins and arteries. *Prog Cardiovasc Dis*, 1991; 34: 45-68

39. Nikkari ST, Jarvelainen HT, Wight TN et al: Smooth muscle cell expression of extracellular matrix genes after arterial injury. *Am J Pathol*, 1994; 144: 1348-56

40. Michael J. Osgood, MDa, Kyle M. Hocking, BEa, Igor V. Voskresensky, MDa, Fan Dong Li, PhDb, Padmini Komalavilas, PhDa,c, Joyce Cheung-Flynn, PhDa, and Colleen M. Brophy, MD a,c. Surgical vein graft preparation promotes cellular dysfunction, oxidative stress, and intimal hyperplasia in human saphenous vein. *J Vasc Surg*. 2014 July ; 60(1): 202–211.