



universidad  
de león

**UNIVERSIDAD DE LEÓN**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA, CIRUGÍA Y ANATOMÍA VETERINARIA**

**TESIS DOCTORAL**

**RESPUESTA VASCULAR AL USO DE DISTINTOS DISPOSITIVOS DE  
TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD CORONARIA EN EL MODELO  
ANIMAL PORCINO**

***VASCULAR RESPONSE TO DIFFERENT DEVICES FOR THE TREATMENT  
OF CORONARY ARTERY DISEASE IN A PORCINE MODEL***

Memoria presentada por el Licenciado en Medicina y Cirugía

**D. Armando Pérez de Prado,**

para optar al grado de Doctor por la Universidad de León.

León, 30 de septiembre de 2013



**Procura vivir en tiempos interesantes**

Proverbio chino

**Experiencia es el nombre que todos damos a nuestros errores**

Oscar Wilde

**A mis pilares de apoyo y motores de empuje,**

Empezaron mis padres,

Siguieron Montse, Roberto y Ana



## AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis, a la par que compañeros de fatigas:

- José Manuel Gonzalo Orden, un hombre del renacimiento que siempre está dispuesto a ayudar. Manolo, sólo nos queda aprender a decir que no (tal vez no seamos capaces).
- Claudia Pérez Martínez, infatigable y brillante trabajadora en la sala de máquinas de la patología. Gracias a ti comprendí finalmente la anatomía patológica.
- Felipe Fernández Vázquez, maestro y socio, en toda la extensión de las palabras. De cara desde el principio, esta tesis es otro fruto del equipo que tu has ido construyendo.

A mis colegas en las labores asistenciales, en el Hospital de León y en el grupo HemoLeon de la Fundación Investigación Sanitaria en León:

- Carlos Cuellas, el hombre tranquilo. Siempre dispuesto, siempre ayudando. Sin ruidos, con eficacia.
- Alejandro Diego, oscuro felino, novelista, músico, ... otro todoterreno. Nunca falló, estuvo en todas.
- Antonio de Miguel, que es la demostración de que se puede ser metódico y deslumbrante a la vez. No vuelves porque no quieres, que ésta es tu casa.
- Roi Estevez y María López Benito, continuadores de la tradición de trabajo en equipo. Lo debemos hacer bien, porque no faltan buenos compañeros.
- A Blanca, Tere, Elena, Mónica, Paula, José, Tina, Seve, Alex, Rosana (siempre ahí), José Luis, Julio, Olga, Marta y a otros muchos que estuvieron para ayudar y seguirán en nuestro equipo.

A todos los compañeros que he encontrado en nuestra *"aventura animal"*, colaboradores indispensables para llevar a cabo este trabajo:

- Marta Regueiro, *"no se empieza un caso si no está Marta"*, ejemplo de trabajadora infatigable. La verdadera responsable del buen cuidado de los animales.

- José Ajenjo, el penúltimo de la saga de los individuos multitarea, una verdadera navaja suiza. Aprende tanto como enseña.
- Manolo Gonzalo, José Altónaga, Manu García, Anabel Cortina (contamos contigo) y los muchos becarios y estudiantes que ayudaron.
- Claudia Pérez y Beatriz Martínez, la visión en profundidad ... y en superficie.

A los amigos que hemos ido haciendo en este camino, que confiaron en el grupo desde la industria y nos apoyaron para arrancar y seguir adelante:

- Alejandro Tomé, Guillermo del Riego, Tomás Berrazueta y Manuel Parente, que desde Izasa destaparon la caja de Pandora.
- Francois Vorms, Enrico Roveda, Samuel Vidal y Manuel Carballal, que nos dieron la primera oportunidad desde Sorin.
- Luis Duocastella, María Molina, Isabel Pérez y otros muchos que, primero desde Iberhopitex, y después desde iVascular, creyeron ciegamente en nosotros y en que se puede innovar en este país. ¡Y mira dónde hemos llegado!

A mis maestros, desde los que me llevaron de la mano de niño, pasando por el Instituto Padre Isla (a mucha honra), los que me alumbraron en la Universidad de Salamanca, los que me enseñaron la profesión y a **INVESTIGAR** (con mayúsculas) en el Hospital Gregorio Marañón de Madrid, los que me encontré más crecido (gracias otra vez, Felipe), las ayudas internacionales (Renu Virmani –una auténtica señora–, Heleen van Beusekom, Michael Joner, Rob Byrne, Kristin Steigerwald) y a todos los que están referidos arriba. Tantos años aprendiendo y aún voy descubriendo nuevos maestros.

**RESPUESTA VASCULAR AL USO DE DISTINTOS DISPOSITIVOS DE  
TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD CORONARIA EN EL MODELO  
ANIMAL PORCINO**

***VASCULAR RESPONSE TO DIFFERENT DEVICES FOR THE TREATMENT  
OF CORONARY ARTERY DISEASE IN A PORCINE MODEL***

**Doctorando: ARMANDO PÉREZ DE PRADO**





# ***ÍNDICE***



# ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS .....	xv
LISTA DE FIGURAS .....	xvii
LISTA DE TABLAS.....	xxiii
<b>1. INTRODUCCION Y JUSTIFICACIÓN DEL TEMA .....</b>	<b>3</b>
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1. Fisiopatología de la reparación vascular tras el implante de stents coronarios: estudio comparativo de las características y cronología humanas y animales.....</b>	<b>11</b>
2.1.1. Modelos animales para el análisis de la reparación vascular tras el implante de stent ...	11
2.1.2. Cronología de la reparación vascular tras la implantación del stent en humanos y animales.....	14
2.1.3. Profilaxis y tratamiento de la reestenosis: resultados del uso de la radiación y fármacos antiproliferativos.....	19
<b>2.2. Re–endotelización: la relevancia de recuperar un endotelio normal .....</b>	<b>22</b>
2.2.1. Reparación vascular retrasada: hallazgos en modelos animales y observaciones humanas .....	22
2.2.2. Re–endotelización morfológica y recuperación funcional: respuesta vasomotora .....	25
2.2.3. Recuperación endotelial y reestenosis: ¿existe una conexión?.....	28
<b>2.3. Las 3 variables en la ecuación de los SFA = Armazón metálico + Polímero (si lo hay) + Fármaco.....</b>	<b>30</b>
2.3.1. Armazón o estructura metálica .....	30
2.3.2. Polímeros y otros vehículos para la administración de fármacos antiproliferativos .....	32
2.3.3. Fármacos: derivados –limus vs paclitaxel. Otros fármacos.....	35
<b>2.4. Evaluación de la respuesta vascular a los dispositivos coronarios .....</b>	<b>37</b>
2.4.1. Características histopatológicas propias del análisis de los SFA en los protocolos preclínicos .....	37
2.4.2. Técnicas de imagen en la valoración de la reparación vascular .....	43
<b>2.5. Hacia el modelo preclínico perfecto: modelos de animal enfermo.....</b>	<b>47</b>
<b>2.6. Nuevos dispositivos para el tratamiento de la enfermedad coronaria.....</b>	<b>50</b>
<b>3. HIPÓTESIS .....</b>	<b>55</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>55</b>
<b>4.1. Objetivo general .....</b>	<b>55</b>

4.2. Objetivos específicos .....	55
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>59</b>
5.1. Modelo experimental de coronarias sanas porcinas .....	59
5.1.1. Selección y preparación del animal .....	59
5.1.2. Protocolo anestésico y medicación .....	59
5.1.3. Preparación quirúrgica y procedimiento endovascular.....	60
5.1.4. Seguimiento, eutanasia y necropsia.....	61
5.2. Análisis cuantitativo de la angiografía (QCA) .....	62
5.2.1. Análisis de la respuesta vasomotora tras el implante de stents.....	63
5.3. Análisis histológico.....	63
5.3.1. Procesado histológico.....	63
5.3.2. Histomorfometría y valoración histopatológica.....	65
5.4. Preparación del tejido y análisis SEM .....	66
5.4.1. Medición global del área endotelizada .....	67
5.4.2. Respuesta inflamatoria en el vaso y sobre el entramado del stent (struts).....	68
5.5. Estudio farmacocinético (estudio nº7).....	69
5.6. Metodología estadística .....	69
5.6.1. Cálculos de los tamaños muestrales.....	70
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>73</b>
6.1. Artículo nº 1.....	73
6.2. Artículo nº 2.....	75
6.2.1. Procedimientos.....	75
6.2.2. Resultados.....	75
6.3. Artículo nº 3.....	79
6.4. Artículo nº 4.....	81
6.4.1. Procedimientos.....	81
6.4.2. Resultados: histomorfometría.....	81
6.4.3. Análisis multivariado.....	83
6.5. Artículo nº 5.....	85
6.5.1. Procedimientos.....	85
6.5.2. Resultados globales.....	85
6.5.3. Resultados a 1 día .....	86

6.5.4. Resultados a 3 días.....	86
6.5.5. Resultados a 7 días.....	86
<b>6.6. Artículo nº 6.....</b>	<b>91</b>
6.6.1. Procedimientos.....	91
6.6.2. Resultados.....	91
<b>6.7. Artículo nº 7.....</b>	<b>95</b>
6.7.1. Procedimientos.....	95
6.7.2. Análisis de eficacia anti-proliferativa .....	96
6.7.3. Análisis de la seguridad.....	98
6.7.4. Protocolo farmacocinético .....	99
<b>7. DISCUSIÓN .....</b>	<b>103</b>
<b>7.1. Aspectos generales .....</b>	<b>103</b>
<b>7.2. Respuesta vasomotora a distintos vasodilatadores endotelio-dependientes .....</b>	<b>105</b>
7.2.1. Disfunción vasomotora y SFA.....	105
7.2.2. Vasodilatadores endotelio-dependientes.....	105
7.2.3. Limitaciones del estudio .....	107
<b>7.3. Análisis cuantitativo de la inflamación luminal inducida por distintos stents .....</b>	<b>107</b>
<b>7.4. Validez de los modelos experimentales de reestenosis: los resultados de eficacia dependen del daño vascular .....</b>	<b>108</b>
7.4.1. Modelo experimental .....	108
7.4.2. Daño vascular.....	108
7.4.3. Eficacia de los stents farmacoactivos .....	109
<b>7.5. Cronología y caracterización celular de la re-endotelización de distintos stents ...</b>	<b>110</b>
7.5.1. Cronología de la endotelización en SMC y SFA .....	111
7.5.2. Caracterización de la respuesta celular.....	112
7.5.3. Limitaciones del estudio .....	113
<b>7.6. Endotelización de los struts no apuestos, sobre el origen de ramas laterales .....</b>	<b>113</b>
7.6.1. Problemas relacionados con la cobertura del origen de ramas laterales por struts del stent .....	113
7.6.2. Malaposición y endotelización .....	114
7.6.3. Limitaciones del estudio .....	115
<b>7.7. Eficacia antiproliferativa y seguridad de los balones liberadores de paclitaxel .....</b>	<b>115</b>
7.7.1. Eficacia antiproliferativa .....	115
7.7.2. Reparación vascular .....	116

7.7.3. Estudio farmacocinético .....	117
7.7.4. Limitaciones del estudio .....	117
<b>8. CONCLUSIONES .....</b>	<b>121</b>
<b>9. CONCLUSIONS .....</b>	<b>123</b>
<b>10. RESUMEN .....</b>	<b>127</b>
10.1. Introducción .....	127
10.2. Respuesta vasomotora a distintos vasodilatadores endotelio-dependientes .....	128
10.3. Análisis cuantitativo de la inflamación luminal inducida por distintos stents .....	129
10.4. La reestenosis en el stent depende del daño vascular inducido .....	129
10.5. Cronología y caracterización celular de la re-endotelización de distintos stents .....	130
10.6. Endotelización de los struts no apuestos, colocados sobre el origen de ramas .....	131
10.7. Eficacia antiproliferativa y seguridad de los balones liberadores de paclitaxel .....	132
<b>11. SUMMARY .....</b>	<b>133</b>
11.1. Background .....	133
11.2. Vasomotor Response to Different Endothelium-Dependent Vasodilators .....	134
11.3. Analysis of Luminal Inflammation Induced by Different Stents .....	134
11.4. Instant Restenosis Related to Vessel Injury Score Degree .....	135
11.5. Time Course of Reendothelialization of Stents in a Normal Coronary Swine Model: Characterization and Quantification .....	135
11.6. Endothelialization of Nonapposed Stent Struts at the Origin of a Side Branch .....	136
11.7. Safety and efficacy of different paclitaxel-eluting balloons .....	137
<b>12. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>141</b>
<b>ANEXO 1: Publicaciones en formato original .....</b>	<b>169</b>
<b>ANEXO 2: Otras publicaciones de la línea de investigación .....</b>	<b>241</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

- **ACh** Acetilcolina
- **BLP** Balones liberadores de paclitaxel
- **CML** Células musculares lisas
- **EMA** Agencia europea del medicamento –*European Medicines Agency*–
- **eNOS** Sintetasa endotelial de óxido nítrico
- **EPC** Células progenitoras del endotelio
- **FDA** Agencia americana de fármacos –*Food and Drug Administration*–
- **HE** Hematoxilina–Eosina
- **ICP** Intervencionismo coronario percutáneo
- **IVUS** Ecografía intravascular –*Intravascular ultrasound*–
- **LDL** Lipoproteínas de baja densidad
- **LEE** Lámina elástica externa
- **LEI** Lámina elástica interna
- **NO** Óxido nítrico
- **OCT** Tomografía de coherencia óptica
- **OFDI** Análisis de la señal óptica en el dominio de la frecuencia
- **PBS** Suero salino tamponado –*phosphate buffered saline*–
- **PECAM–1** Molécula 1 de adhesión celular plaqueta–endotelio
- **PLA** Ácido poli–L–láctico
- **PLGA** Ácido poli–DL–láctico–co–glicólico
- **QCA** Angiografía coronaria cuantitativa
- **RUTSS** Número total de *struts* por sección estudiada
- **SEM** Microscopía electrónica de barrido –*scanning electron microscopy*–
- **SFA** Stents farmacoactivos

- **SLE** Stent liberador de everolimus
- **SLP** Stent liberador de paclitaxel
- **SLS** Stent liberador de sirolimus
- **SLT** Stent liberador de tacrolimus
- **SLZ** Stent liberador de zotarolimus
- **SMC** Stents metálicos convencionales
- **VEGF** Factores de crecimiento vascular endotelial



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1– Mecanismo de acción del *stent*. Prevención del retroceso elástico de la arteria y sellado de las disecciones arteriales. Panel A:** Estenosis severa en el tercio proximal de la coronaria derecha. **Panel B:** Dilataciones repetidas con balón hasta vencer la resistencia de la placa. **Panel C:** Aunque con el hinchado del balón parece alcanzarse dilatación efectiva, la estenosis vuelve a aparecer por retroceso elástico de la arteria; además se aprecia disección intimal (flecha). **Panel D:** Tras implante de *stent* se consigue el resultado deseado. ....4
- Figura 1.2– Número de SFA frente a SMC implantados en España.** Desde 2002 a 2006 se aprecia un crecimiento exponencial en el empleo de SFA, que se frena y estabiliza en 2006, apreciándose incluso un ligero repunte en el uso de SMC. Fuente: Registro nacional de actividad de la Sección de Hemodinámica y Cardiología Intervencionista de la Sociedad Española de Cardiología 2012.....5
- Figura 2.1– Fases de la reparación vascular tras el implante de *stent*.** Cronología en animales (arriba) y en humanos (abajo). Adaptado de Virmani *et al.*<sup>44</sup>. ....15
- Figura 2.2– Imagen de microscopía electrónica de barrido (SEM) de arteria coronaria porcina, 1 día tras el implante de *stent* farmacoactivo (SFA).** La superficie no endotelizada del *strut* aparece recubierta de fibrina, plaquetas y células inflamatorias. 17
- Figura 2.3– Imagen SEM de arteria coronaria porcina, 1 día tras el implante de SFA.** A mayor magnificación se aprecian los detalles de la fibrina, plaquetas y células inflamatorias. .17
- Figura 2.4– Imagen SEM de arteria coronaria porcina, 7 días tras el implante de SFA.** Presencia de células gigantes luminales sobre las superficie no endotelizada de los *struts*. **Esquina superior izquierda:** detalle de las células gigantes. ....18
- Figura 2.5– Corte histológico con tinción de Verhoeff–Van Gieson de arteria coronaria porcina, 28 días tras el implante de SFA.** Presencia de célula gigante luminal (flecha) con endotelización parcial del *stent*. Material amorfo (fibrina y restos celulares) y reacción inflamatoria alrededor de los *struts*. ....18

- Figura 2.6– Corte histológico con tinción de Verhoeff–Van Gieson de arteria coronaria porcina, 28 días tras el implante de SFA.** Presencia de material amorfo alrededor del *strut*. Malaposición del *strut*, sin apoyo sobre la lámina elástica interna (LEI). Necrosis de la capa media bajo el *stent* y reacción inflamatoria adventicial. ....23
- Figura 2.7– Corte histológico con tinción de Verhoeff–Van Gieson de arteria coronaria porcina, 28 días tras el implante de SFA.** Trombo luminal (flecha) y depósito de material amorfo y células inflamatorias alrededor del *strut*. Malaposición del *strut*, sin apoyo sobre la LEI. Necrosis de la capa media bajo el *stent*. **Esquina superior derecha:** Detalle del trombo. Presencia de células espumosas y polimorfonucleares. ....23
- Figura 2.8– Corte histológico con tinción de Verhoeff–Van Gieson de arteria coronaria porcina, 28 días tras el implante de SFA.** Reacción inflamatoria granulomatosa con polimorfonucleares alrededor del *stent*. ....24
- Figura 2.9– Tinción con inmunoperoxidasa (ABC–peroxidasa) que muestra una expresión elevada de anticuerpo anti–eNOS (sintetasa de óxido nítrico endotelial, color marrón) en la monocapa endotelial. Esquina inferior izquierda:** Imagen confocal *en face* de hemisección arterial completa, inmunofluorescencia que demuestra expresión (color rojo) de PECAM–1 / CD31 en los bordes celulares endoteliales.....27
- Figura 2.10– Distintos grados de daño vascular (*injury score*). Corte histológico con tinción de Verhoeff–Van Gieson de arteria coronaria porcina, 28 días tras el implante de SFA. Panel A:** *Injury score* grado 1 (escalas de Schwartz<sup>29</sup> y Gunn<sup>285</sup>). **Panel B:** *Injury score* grado 1 de Schwartz, 2 de Gunn; nótese el marcado ángulo de deformación de la LEI. **Panel C:** *Injury score* grado 2 de Schwartz, 3 de Gunn; se aprecia neovascularización en el interior de la neoíntima (flechas). **Panel D:** *Injury score* grado 3 de Schwartz, 4 de Gunn; penetración del *strut* en profundidad con rotura de la LEE y reacción adventicial. ....39
- Figura 2.11– Corte histológico con tinción de Verhoeff–Van Gieson de arteria coronaria porcina, 28 días tras el implante de SFA.** Hemorragia intramural y re–endotelización incompleta. ....40

- Figura 2.12– Imagen SEM de arteria coronaria porcina, 3 días tras el implante de SFA.** El *stent* aparece recubierto. **Esquina superior izquierda:** El detalle de alta magnificación demuestra que sobre el *strut* son pocas las células endoteliales visibles. ....41
- Figura 2.13– Imagen SEM de arteria coronaria porcina, 7 días tras el implante de SFA.** Tanto los espacios entre los *struts* como éstos mismos aparecen completamente recubiertos. **Esquina superior izquierda:** Se aprecia el patrón de empedrado característico de las células endoteliales, de forma poligonal, con núcleo prominente; sin embargo, las uniones intercelulares son laxas. ....42
- Figura 2.14– Imagen SEM de arteria coronaria porcina, inmediatamente tras el implante de *stent*.** Se aprecian áreas de denudación endotelial significativa (zonas claras), pero con abundantes áreas de endotelio preservado (zonas más oscuras). ....48
- Figura 2.15– Imagen SEM de arteria coronaria porcina, inmediatamente tras el implante de *stent*.** Detalle de endotelio denudado (áreas claras) entre los *struts* del *stent*, con zonas de endotelio preservado mostrando el característico patrón en empedrado.....49
- Figura 5.1– Histomorfometría:** Determinación de las áreas arteriales de la luz, Lámina elástica interna (LEI) y Lámina elástica externa (LEE). ....66
- Figura 5.2– Valoración de la superficie del *stent* endotelizada.** .....68
- Figura 5.3– Análisis de la respuesta inflamatoria luminal mediante SEM. Panel A:** Muestra de la respuesta inflamatoria al *stent* en zona adyacente de la pared. **Panel B:** Procesado del umbral de grises y selección de área representativa de 100 x 100  $\mu\text{m}$  (ROJA). **Panel C:** Detalle del tamaño y morfología de leucocitos (esféricos,  $\approx 10 \mu\text{m}$ ; flecha ROJA), hematíes (bicóncavos,  $\approx 5 \mu\text{m}$ ; flecha AZUL) y plaquetas (pequeños puntos  $<1 \mu\text{m}$ ; flecha VERDE). ....68
- Figura 6.1– Cambios hemodinámicos tras la administración de fármacos, en frecuencia cardíaca y presión arterial media.** B = basal; A2 = ACh, 20  $\mu\text{g}$ ; A4 = ACh, 40  $\mu\text{g}$ ; S = serotonina, 100  $\mu\text{g}$ ; I = isoproterenol, dosis máxima; N = nitroglicerina, 200  $\mu\text{g}$ . ....76
- Figura 6.2– Respuesta vasomotora a los distintos fármacos.** B = basal; A2 = ACh, 20  $\mu\text{g}$ ; A4 = ACh, 40  $\mu\text{g}$ ; S = serotonina, 100  $\mu\text{g}$ ; I = isoproterenol, dosis máxima; N = nitroglicerina, 200  $\mu\text{g}$ . \*(Asterisco) indica  $p < 0.01$  en comparación con los valores basales.....77

**Figura 6.3– Endotelización de SMC: 3 días, Panel A:** Endotelización parcial del *stent*; áreas desnudas (flechas). **7 días, Panel B:** Endotelización completa del *stent*. **Endotelización de SFA: 3 días, Panel C:** Áreas desnudas (flechas) y el resto, cubierto de fibrina. **7 días, Panel D:** Endotelización irregular; presencia de células gigantes (flechas). .....79

**Figura 6.4– Grados de inflamación: Panel A, SMC, 3 días:** Escasa presencia de células inflamatorias (pared y *stent*). Endotelización parcial del *stent*; áreas con fibrina. **Panel B, SFA, 7 días:** Intensa reacción inflamatoria alrededor del *stent*. Cobertura de fibrina y plaquetas sobre el *stent*.....80

**Figura 6.5– Correlación entre el grado de endotelización y de inflamación:** Resultados a los 3 días (panel A) y a los 7 días (panel B).....80

**Figura 6.6– Grados de daño vascular.** A la izquierda, *injury score* 1 (integridad de la LEI). A la derecha, *injury score* 2 (rotura de LEI).....82

**Figura 6.7– Gráfico de contorno de las variables *injury Score* y paclitaxel frente a la variable reestenosis.** Relación proporcional del daño vascular y la presencia o ausencia de fármaco en el *stent* sobre el grado de reestenosis. Se observa que los valores más altos de reestenosis pertenecen a los SMC y con *injury score*  $\geq 2$ . Nótese que si bien en los SMC el valor de la reestenosis puede tener cualquier valor dentro del rango, los SFA sólo presentan los valores más bajos de reestenosis. IS: *Injury Score*. .....84

**Figura 6.8– Resultados a 1 día.** En el panel de la izquierda se observan escasas células endoteliales que comienzan a cubrir los *struts* desde los bordes (flecha negra); barra = 100  $\mu\text{m}$ . En el panel central se aprecia la superficie metálica del *stent* prácticamente desnuda, con áreas cubiertas de fibrina (flecha blanca); barra = 100  $\mu\text{m}$ . En el panel derecho se observa un abundante componente de células inflamatorias; barra = 20  $\mu\text{m}$ . .....87

**Figura 6.9– Resultados a 1 día.** Endotelización de SA (panel superior), SCC (panel central) y SLT (panel inferior). Las áreas blancas marcan *struts* descubiertos, las áreas negras representan *struts* recubiertos por fibrina o células gigantes. Barras = 1mm. ....87

**Figura 6.10– Resultados a 3 días.** En la imagen izquierda, la capa endotelial cubre un área mayor con menor grado de inflamación; barra = 100  $\mu\text{m}$ . En la imagen central se

observan células gigantes de diferentes formas y tamaños sobre zonas desnudas de células endoteliales (flechas blanca y negra); barra = 100  $\mu\text{m}$ . En la imagen derecha se puede apreciar como no se han establecido uniones intercelulares maduras; barra = 20  $\mu\text{m}$ .....88

**Figura 6.11– Resultados a 3 días.** Endotelización de SA (panel superior), SCC (panel central) y SLT (panel inferior). Las áreas blancas marcan *struts* descubiertos, las áreas negras representan *struts* recubiertos por fibrina o células gigantes. Barras = 1mm. ....88

**Figura 6.12– Resultados a 7 días.** En la imagen izquierda se aprecia capa endotelial prácticamente completa; barra = 100  $\mu\text{m}$ . En la imagen central las células endoteliales están presentes incluso cuando los *struts* no están apuestos a la pared vascular, flotando sobre el origen de una pequeña rama lateral; barra = 100  $\mu\text{m}$ . En la imagen derecha aparecen células gigantes y restos de fibrina en los escasos espacios no recubiertos por células endoteliales; barra = 20  $\mu\text{m}$ . ....89

**Figura 6.13– Resultados a 7 días.** Endotelización de SA (panel superior), SCC (panel central) y SLT (panel inferior). Las áreas blancas marcan *struts* descubiertos, las áreas negras representan *struts* recubiertos por fibrina o células gigantes. Barras = 1mm. ....89

**Figura 6.14– Comparativa de las tasas de endotelización de los distintos *stents*.** .....90

**Figura 6.15– Ejemplos de endotelización parcial a los 3 días del implante.** **Panel A**, SCC: alto grado de endotelización, presencia de células gigantes (Flecha). **Panel B**, SLT: la cobertura endotelial comienza en los bordes de los *struts* (Flecha). **Panel C**, SA: endotelización parcial de los *struts* localizados sobre el ostium de rama lateral. ....92

**Figura 6.16– Ejemplos de endotelización a los 7 días del implante.** **Panel A**, SCC: ausencia de endotelización. **Panel B**, SLT: endotelización parcial. **Panel C**, SA: endotelización completa de los *struts* localizados sobre el ostium de rama lateral. ....93

**Figura 6.17– Secciones centrales de distintos *stents* sobredilatados con distintos balones, tinción elastina de Verhoeff–Van Gieson: Balón control (panel A):** Crecimiento neointimal significativo, sin datos de inflamación en profundidad, cobertura endotelial uniforme. **Balones liberadores de paclitaxel, BLP1 – panel B –, BLP2 – panel C – y BLP3**

– **panel D** –: Escaso crecimiento neointimal, sin datos de inflamación en profundidad, endotelización aceptable.....98

**Figura 6.18– Detalle de la respuesta arterial, tinción elastina de Verhoeff–Van Gieson: balón control (panel A),** muestra un crecimiento neointimal significativo, con endotelización completa de la superficie luminal, sin datos de inflamación y sin restos de fibrina. **Balón liberador de paclitaxel, BLP1 (panel B),** menor crecimiento neointimal, con aceptable endotelización luminal pero no completa (flechas) y acumulación importante de fibrina alrededor del *stent* en profundidad (color parduzco). .....99

**Figura 6.19– Concentración de paclitaxel en la pared arterial en distintos puntos temporales.** Cromatografía líquida (HPLC). .....100

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 2.1</b> – Fases de la reparación vascular (y de la reestenosis) tras el implante de <i>stent</i> .....	15
<b>Tabla 2.2</b> – Escalas de valoración del daño vascular ( <i>injury score</i> ), según afectación de láminas elásticas interna (LEI) y externa (LEE) .....	38
<b>Tabla 2.3</b> – Escalas de valoración de la inflamación .....	38
<b>Tabla 2.4</b> – Escala de valoración del depósito de fibrina .....	40
<b>Tabla 5.1</b> – Protocolo farmacológico de respuesta vasomotora .....	63
<b>Tabla 6.1</b> – Características histomorfométricas de los segmentos tratados en función del daño vascular. ....	83
<b>Tabla 6.2</b> – Características histomorfométricas de los segmentos tratados en función del daño vascular y el tipo de <i>stent</i> implantado. ....	83
<b>Tabla 6.3</b> – Tasa de endotelización de la superficie de los <i>struts</i> colocados sobre el origen de ramas laterales y de la superficie total del <i>stent</i> . * $p < 0.05$ , <i>SLT</i> vs. <i>SA/SCC</i> . ....	92
<b>Tabla 6.4</b> – Variables asociadas con la tasa de endotelización de los <i>struts</i> localizados sobre el origen de ramas. ....	93
<b>Tabla 6.5</b> – Resultados angiográficos iniciales y a los 28 días .....	96
<b>Tabla 6.6</b> – Resultados histológicos a los 28 días .....	97





***INTRODUCCIÓN Y  
JUSTIFICACIÓN DEL TEMA***



## 1. INTRODUCCION Y JUSTIFICACIÓN DEL TEMA

La enfermedad cardiovascular es la principal causa de mortalidad en Europa, considerándose responsable del 48% de todas las muertes, y constituye la carga de enfermedad más importante (23% de todas las enfermedades y muertes)<sup>1,2</sup>. Se estima que supone un coste para la economía de la Unión Europea cercano a los 200.000 millones de euros al año<sup>1</sup>.

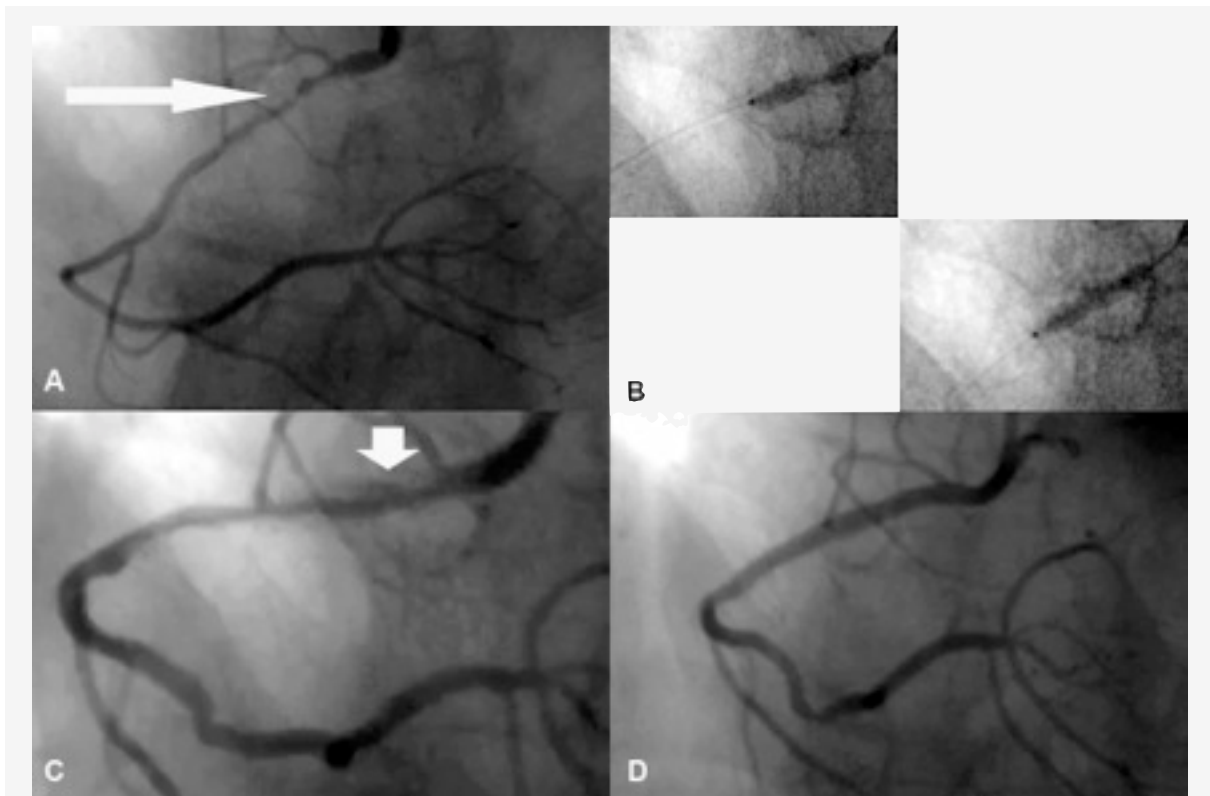
Las principales formas de presentación clínica de la enfermedad cardiovascular son el accidente cerebrovascular y la enfermedad coronaria, representando ésta la primera causa individual de mortalidad en Europa<sup>1</sup>. Estos datos explican que la revascularización coronaria, incluyendo la cirugía de derivación coronaria y el intervencionismo coronario percutáneo (ICP), constituyan los procedimientos médicos más frecuentemente realizados en los países desarrollados<sup>1,3,4</sup>. El ICP se ha convertido en la técnica de revascularización más empleada en nuestro país desde 1992<sup>5</sup>, a medida que los avances técnicos han permitido ampliar el espectro de casos candidatos a tratamiento endovascular, no quirúrgico<sup>4</sup>.

El intervencionismo endovascular ha evolucionado enormemente desde que fuera descrito por primera vez en 1964: Dotter y Judkins describieron la técnica para tratar las obstrucciones arterioscleróticas arteriales mediante un abordaje transluminal<sup>6</sup>. Estos autores empleaban tubos (catéteres) de tamaños progresivamente crecientes para aumentar el diámetro de la luz vascular.

En los años 70, Gruntzig describió la técnica de la angioplastia mediante hinchado de globo (incorrectamente traducido del inglés *balloon* como “balón” pero con uso perpetuado por la costumbre), tal y como la conocemos actualmente<sup>7</sup>. De forma resumida, esta técnica consiste en avanzar un fino catéter, que lleva un globo distensible en su porción final, por la arteria coronaria hasta alcanzar la lesión que se quiere tratar e inflar el globo con líquido, transmitiendo una presión homogénea contra la pared arterial que comprime y fractura la placa aterosclerótica aumentando así el área interior del vaso.

En los 80, Sigwart *et al.*<sup>8</sup> presentaron los primeros resultados a corto plazo tras la implantación de endoprótesis coronarias, los *stents*. Estas endoprótesis metálicas de forma tubular son estructuras de malla de acero inoxidable o distintas aleaciones, diseñadas para permitir un calibre inicial muy reducido y expandirse finalmente en la zona deseada. Los *stents* coronarios se crearon para solucionar las mayores limitaciones de la angioplastia con

balón: el retroceso elástico de la arteria tras la dilatación que conducía a la pérdida inmediata de la ganancia obtenida y el elevado riesgo de oclusión aguda del vaso por disecciones complejas. El éxito de los *stents* en su función motivó que rápidamente sustituyeran a la dilatación con balón como técnica de elección en el ICP (Figura 1.1).



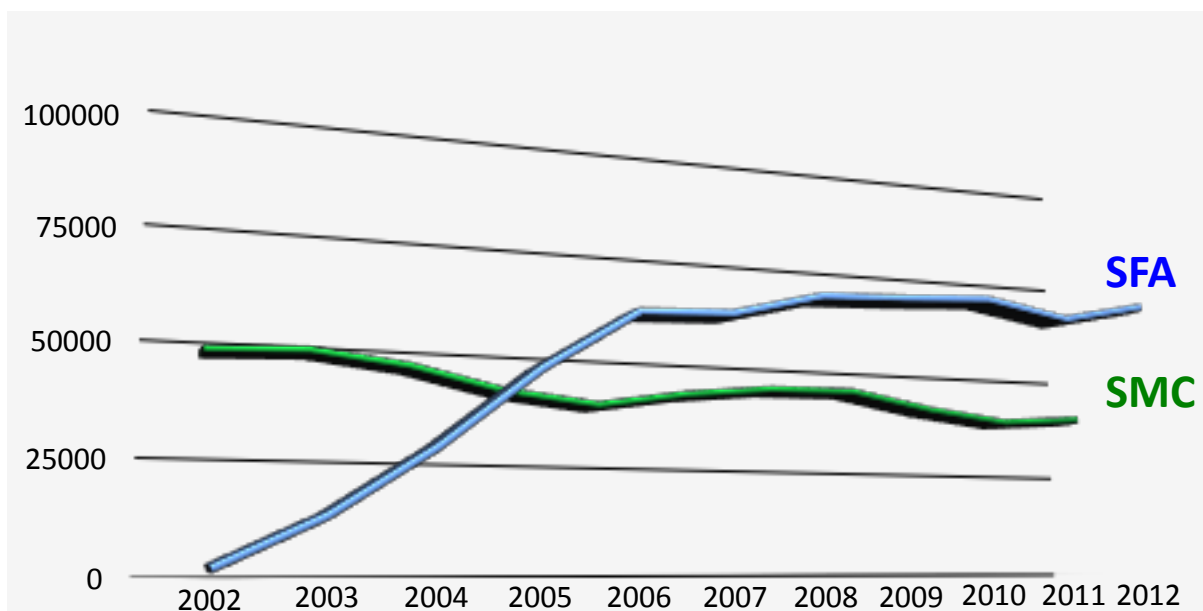
**Figura 1.1– Mecanismo de acción del *stent*. Prevención del retroceso elástico de la arteria y sellado de las disecciones arteriales. Panel A:** Estenosis severa en el tercio proximal de la coronaria derecha. **Panel B:** Dilataciones repetidas con balón hasta vencer la resistencia de la placa. **Panel C:** Aunque con el hinchado del balón parece alcanzarse dilatación efectiva, la estenosis vuelve a aparecer por retroceso elástico de la arteria; además se aprecia disección intimal (flecha). **Panel D:** Tras implante de *stent* se consigue el resultado deseado.

En los años 90, dos grandes estudios aleatorizados confirmaron la superioridad clínica de los *stents* coronarios sobre la angioplastia con balón<sup>9,10</sup>. Sin embargo, las tasas de reestenosis, provocadas fundamentalmente por proliferación neointimal excesiva en el interior de los *stents*, eran aún relativamente altas: entre el 22%<sup>9</sup> y el 31%<sup>10</sup> de los segmentos arteriales tratados con *stent* mostraban en el seguimiento estenosis angiográficas superiores al 50%, lo que se define como presencia de reestenosis binaria (SI / NO).

Con el nuevo siglo, la profilaxis definitiva de la reestenosis intra-*stent* parece emerger con los *stents* farmacoactivos (SFA). En comparación con sus predecesores, los *stents* metálicos

convencionales (SMC), los SFA demostraron abolir virtualmente la aparición de reestenosis. El estudio RAVEL, pionero en el campo, halló una reestenosis binaria del 0% en los SFA en un seguimiento de 6 meses<sup>11</sup>.

El número de ICP con SFA experimentó una explosión en los años siguientes a la publicación de estos resultados, hasta septiembre de 2006. En el Congreso Mundial de Cardiología celebrado en esa fecha en Barcelona, varios grupos de investigación presentaron datos preocupantes que asociaban el empleo de SFA con un riesgo aumentado de mortalidad. Las publicaciones de estos datos<sup>12-15</sup> señalaron como probable causa de ese peor pronóstico una mayor incidencia de trombosis tardía del *stent*. La Figura 1.2 ilustra la repercusión que estos hallazgos tuvieron en el empleo de SFA.



**Figura 1.2– Número de SFA frente a SMC implantados en España.** Desde 2002 a 2006 se aprecia un crecimiento exponencial en el empleo de SFA, que se frena y estabiliza en 2006, apreciándose incluso un ligero repunte en el uso de SMC. Fuente: Registro nacional de actividad de la Sección de Hemodinámica y Cardiología Intervencionista de la Sociedad Española de Cardiología 2012.

En los primeros años del desarrollo de los *stents* coronarios, la trombosis subaguda (entre 1 día y 1 mes) era una complicación común con tasas de hasta el 20% en el caso de los *stents* autoexpandibles<sup>16</sup>. El cambio de regímenes de intensa anticoagulación a la pauta de doble terapia antiplaquetaria, empleando aspirina y una tienopiridina, hizo descender la incidencia de esta complicación a cifras inferiores al 5%<sup>17,18</sup>. De cualquier modo, la aparición de trombosis del *stent* más allá del primer mes era muy infrecuente con los SMC. Tanto los estudios de un solo centro<sup>13</sup>, como los multicéntricos<sup>15</sup> y metaanálisis<sup>12,14</sup> que relacionaron el

empleo de SFA con peor pronóstico subrayaron lo tardío de la presentación de estos episodios de trombosis del *stent*. En un documento de consenso<sup>19</sup> elaborado por investigadores de distintos grupos se delimitaron los conceptos de trombosis tardía del *stent* (aquella que se presenta más allá del primer mes) y muy tardía (la que aparece más allá del primer año). La aparición de datos en conflicto con los descritos previamente, motivó la publicación de un número prácticamente monográfico de *The New England Journal of Medicine*, el cual recogía 4 metaanálisis que no apoyaban la hipótesis de un peor pronóstico de los pacientes tratados con SFA<sup>20-23</sup>. La controversia provocó un movimiento de vuelta al “banco de pruebas” experimental, ilustrando así la bidireccionalidad de la investigación traslacional: se requerían más datos acerca de la biología y patología de los SFA en los modelos preclínicos.

La investigación preclínica en modelos animales constituye una etapa obligatoria en la valoración de la eficacia de los nuevos dispositivos de tratamiento coronario, como exigen las agencias reguladoras americana (FDA)<sup>24</sup> y europea (EMA)<sup>25</sup>. El modelo más empleado es el de arterias coronarias normales porcinas<sup>26,27</sup>, tras la descripción de los resultados observados después de la dilatación con balón sobredimensionado de arterias coronarias por Schwartz *et al.*<sup>28</sup>. Posteriores modificaciones del modelo mediante la implantación de filamentos de tantalio<sup>29</sup> o de *stents* coronarios, que inducen mayor daño vascular, provocan mayor respuesta vascular en relación directa con el daño vascular inducido. La implantación de *stents* en arterias ilíacas de conejos es otro de los modelos frecuentemente utilizados y aceptados<sup>30,31</sup>.

Los principios que rigen este tipo de investigación se han recogido en 2 documentos de consenso<sup>32,33</sup>. La última versión de este documento añade un importante aviso: estos modelos, previamente empleados como bancos de prueba para analizar la eficacia de los nuevos dispositivos, deben enfocarse específicamente en aspectos de seguridad para evitar fenómenos como el de las trombosis tardías de los SFA tras su empleo clínico. Muchas de las características de la respuesta vascular a estos nuevos tratamientos aún están sin esclarecer totalmente: ésta es la principal motivación y justificación de la línea de investigación experimental que se recoge en esta tesis doctoral.

El compendio de publicaciones (Anexo 1), que compone esta tesis no se organiza de forma cronológica en función de la fecha de la publicación de los resultados, sino que adopta una estructura científica inherente a la línea de investigación:

- La publicación nº 1 es un artículo de revisión que recoge y analiza la evidencia publicada sobre el tema hasta el año 2013. Constituye, así, la revisión crítica de la evidencia que debe dar pie a cualquier trabajo de investigación.
- Los artículos nº 2, 3 y 4 son originales que versan sobre distintos aspectos metodológicos relacionados con el objetivo fundamental de la línea de investigación. Analizan, respectivamente, la respuesta a distintos agentes vasodilatadores empleados en el análisis de la madurez endotelial, la posibilidad de cuantificar la respuesta inflamatoria luminal a los *stents* coronarios y el grado de daño vascular que es necesario inducir para que el modelo experimental sea capaz de demostrar diferencias entre dispositivos.
- Los artículos nº 5, 6 y 7 exponen los resultados de distintos dispositivos en términos de seguridad en la reparación vascular como la re-endotelización y su cronología o el recubrimiento de estructuras del *stent* que se consideraban no susceptibles de presentar endotelización. En el último original de la serie, aceptado para su publicación, se muestran datos de la eficacia antiproliferativa de nuevos dispositivos, como son los balones liberadores de fármaco.

Además de las publicaciones descritas, la línea de investigación ha generado otros resultados, algunos de los cuales se han comunicado en distintos congresos internacionales previa selección en proceso *peer review*, como se recoge en el Anexo 2.





# ***REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA***



## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Fisiopatología de la reparación vascular tras el implante de *stents* coronarios: estudio comparativo de las características y cronología humanas y animales

#### 2.1.1. Modelos animales para el análisis de la reparación vascular tras el implante de *stent*

Para analizar los efectos que distintos dispositivos de tratamiento endovascular causan sobre la pared arterial, tanto en la aparición de reestenosis como en la reparación vascular, se han empleado distintos modelos animales. Entre otros, se han utilizado modelos de roedores, conejos, perros, ovejas, cerdos y primates no humanos.

Los **modelos murinos**, ratas y ratones, son los preferidos en investigación básica por sus múltiples ventajas: bajo coste, manejo simple, reproducibilidad elevada y disponibilidad de múltiples marcadores para la caracterización de respuestas moleculares y celulares. Distintos grupos<sup>34,35</sup> han utilizado el modelo de arteria carótida en rata para la implantación de *stents* empleando dispositivos especialmente diseñados (pequeños *stents* de 1.5 mm. de calibre); otros grupos han implantado *stents* de medidas más habituales en la aorta abdominal de ratas<sup>36,37</sup>. En todos los casos, los *stents* estaban premontados en balones de ICP, se introducían por vía local y se colocaban en arterias sanas, sin tratamiento previo. Ambos modelos han demostrado una cronología de la reparación vascular equivalente a la observada en modelos de animales de mayor tamaño.

Sin embargo, estos modelos adolecen de dos limitaciones fundamentales:

- Las características patológicas de la respuesta vascular en ratas son notablemente diferentes a las humanas, con menor cantidad de trombo y componentes de fibrina, una distribución diferente de la relación celular / matriz intercelular en la neoíntima y una menor respuesta inflamatoria que la observada en humanos<sup>27</sup>.
- Distintos resultados positivos en términos de eficacia antiproliferativa en el modelo de rata han fracasado en su aplicación a la aplicación clínica humana<sup>38,39</sup>. Algunos autores<sup>40,41</sup> explican estas diferencias por los desiguales mecanismos involucrados en la

respuesta vascular al daño arterial en estos pequeños mamíferos en comparación con animales más grandes.

Por otra parte, la elección obligatoria de lechos vasculares fuera del corazón en estos animales pequeños implica dos problemas potenciales: las arterias elásticas son menos propensas a sufrir daño vascular con una menor respuesta proliferativa neointimal que arterias musculares, como las coronarias<sup>39,42</sup>, y la dinámica de fluidos es notablemente distinta en las arterias coronarias que en otros territorios<sup>27,40,41</sup>. La potencial influencia de estos dos fenómenos en los resultados obtenidos aún es motivo de controversia y por ello el modelo murino no se recomienda para la evaluación preclínica de nuevos dispositivos intracoronarios en los documentos de consenso<sup>32,33</sup>.

Los **modelos experimentales de conejo** comparten algunas de las ventajas de los modelos de roedores, como el coste relativamente bajo y su manejo y estabulación simples. Los lechos vasculares escogidos para implantar los *stents* son las arterias carótidas y el territorio iliofemoral, en las que se pueden emplear los dispositivos disponibles comercialmente, puesto que son comparables en tamaño con las arterias coronarias humanas. Distintos grupos han descrito características y cronología de la reparación vascular en el modelo de arteria iliaca de conejo comparables a las observadas en el modelo de coronarias porcinas<sup>30,43,44</sup>. Además, la dinámica de fluidos de estas arterias en este modelo parece similar a la de las arterias coronarias porcinas<sup>45</sup>. El modelo de arteria iliaca de conejo es uno de los recomendados por consenso para el análisis de los dispositivos coronarios<sup>32,33</sup>.

A pesar de ello, este modelo comparte alguna de las limitaciones de los modelos murinos:

- La naturaleza elástica de las arterias iliacas podría limitar el daño vascular inducido.
- Se pierde el análisis del potencial daño específico que se observaría en órganos terminales como el corazón (embolización, toxicidad, ...).

Una característica distintiva del modelo de iliaca de conejo es una re-endotelización del *stent* retrasada en comparación con el modelo coronario porcino<sup>43,44,46-48</sup>, mientras que el resto de los fenómenos de reparación vascular sigue una cronología paralela en ambos casos. Aunque ésta podría ser una característica inherente a la especie animal, importantes diferencias metodológicas podrían explicar este fenómeno: los modelos de coronarias porcinas suelen ser modelos de “daño simple” con implantación directa del *stent* en arterias

sanas, sin tratamiento previo; al contrario, en los modelos de conejo se suele emplear un sistema de doble lesión<sup>39,43,49-51</sup>. Incluso en los modelos que emplean conejos blancos de Nueva Zelanda normolipémicos, se induce denudación del endotelio mediante la dilatación con balón de ICP o con balón de Fogarty antes de la implantación del *stent*<sup>31,43,47,52-56</sup>. Cuando este procedimiento se lleva a cabo semanas antes de la implantación del *stent*, se observan de forma reproducible lesiones arterioscleróticas en fases precoces<sup>27,39</sup>. El desarrollo de complejos modelos animales arterioscleróticos se describe más adelante.

El **modelo de arterias coronarias porcinas** es, con mucho, el más empleado en la evaluación preclínica de los dispositivos intracoronarios, especialmente los *stents*. Las ventajas de este modelo animal incluyen la gran similitud anatómica y fisiológica de su aparato cardiovascular con el humano<sup>57</sup>. La distribución, tamaño y potencial flujo colateral de las arterias coronarias son virtualmente las mismas en ambas especies. La fisiología plaquetaria<sup>58,59</sup> y muchas de las características del sistema de coagulación<sup>57,60</sup> también son muy similares a las humanas. Además, este modelo ofrece una gran disponibilidad de localizaciones coronarias para implantar *stents* individuales o solapados que reproducen el escenario de la clínica humana.

Sin embargo, también presenta limitaciones:

- Aunque la producción de los animales no es cara, los costes del manejo y estabulación son considerablemente más altos. El cerdo doméstico normalmente empleado en este modelo suele pesar entre 25 y 60 kg en el momento de la implantación del *stent*. Al mes del procedimiento, el peso alcanza el doble del inicial y podría llegar a pesar 400 kg en periodos de seguimiento por encima del año. Esta es la razón fundamental para que se hayan desarrollado especies porcinas miniatura, con un potencial de crecimiento más reducido como el *minipig* de Yucatán<sup>42</sup>. No obstante, este tipo de animales son considerablemente más caros y tienen una menor tasa de reproducción.
- Algunos autores defienden la hipótesis de que el modelo porcino es un modelo hiperproliferativo, destacando la intensa reacción inflamatoria y la frecuente presencia de granulomas<sup>61-67</sup>, relativamente infrecuentes en las muestras humanas<sup>65,68-70</sup>.

Un hallazgo distintivo en el análisis histopatológico de las muestras porcinas es la frecuente presencia de infiltrados eosinófilos<sup>45,67</sup>, representativos de reacciones de hipersensibilidad, que también han sido descritos en autopsias humanas<sup>71,72</sup>. Esta reacción es infrecuente en otros modelos animales, aunque también se ha descrito en el conejo<sup>73</sup>.

**Otros modelos animales** de grandes mamíferos como perros, ovejas o primates no humanos se han empleado en algunas ocasiones. Puesto que no ofrecen claras ventajas sobre los modelos descritos previamente y adolecen de limitaciones iguales o superiores a las mencionadas, su empleo es reducido. La excepción más notable es el modelo de **arterias coronarias ovinas**, que muestra una gran similitud con el de coronarias porcinas en términos de respuesta vascular y con la fisiología humana en cuanto al sistema de coagulación y actividad fibrinolítica<sup>74</sup>. Además, este modelo ofrece una gran disponibilidad de bifurcaciones de las grandes ramas coronarias para analizar el funcionamiento específico de los dispositivos analizados en estas localizaciones.

### 2.1.2. Cronología de la reparación vascular tras la implantación del *stent* en humanos y animales

La reparación vascular en respuesta al daño arterial comprende procesos y fases similares tanto en humanos como en las especies animales, aunque la cronología de los eventos es diferente. Basándonos en los períodos de desarrollo de reestenosis tras la implantación de los SMC<sup>43,44,68,75-78</sup>, podemos aceptar que los sucesos aparecen 6 veces más rápido en los animales que en los humanos. Son varios los factores que pueden explicar este calendario acelerado:

- La expectativa de vida habitual de un humano se sitúa por encima de los 70 años, mientras en los cerdos oscila entre 10 y 15 años y en los conejos alrededor de 5 años<sup>79</sup>.
- Los animales empleados en estos modelos son individuos jóvenes y sanos con mecanismos de reparación normales o incluso exagerados<sup>80</sup>; sin embargo, los pacientes humanos son más viejos con mecanismos defectuosos de reparación.
- La ausencia de arteriosclerosis en las arterias tratadas puede modificar de forma sustancial la respuesta y su cronología. Aunque se considera que la respuesta a la implantación de los SMC en arterias sanas podría ser equivalente a la de su implantación en arterias enfermas, algunos datos obtenidos de autopsias humanas señalan que esta relación no necesariamente es válida en el análisis de los SFA<sup>44,81</sup>.

La Tabla 2.1 y la Figura 2.1 resumen las fases de la reparación vascular tras el implante de *stent* en humanos<sup>68,76,82</sup> y en animales<sup>43,44,75,77,78,83,84</sup>, fundamentalmente en los modelos de coronarias porcinas y de iliacas de conejo, que presentan una cronología muy similar<sup>30,43,44</sup>.

Tabla 2.1– Fases de la reparación vascular (y de la reestenosis) tras el implante de *stent*

Humanos (días)	Animales (días)	Características histológicas y fisiológicas
0–30	0–14	Activación plaquetaria, depósito de fibrina, trombo
0–30	0–14	Inflamación: células adheridas en luz (precoz), profunda (tardía)
14–90	4–16	Re–endotelización y formación de tejido de granulación
60–180	14–28	Proliferación y migración celular, producción matriz extracelular
60–?	14–180	Remodelado arterial

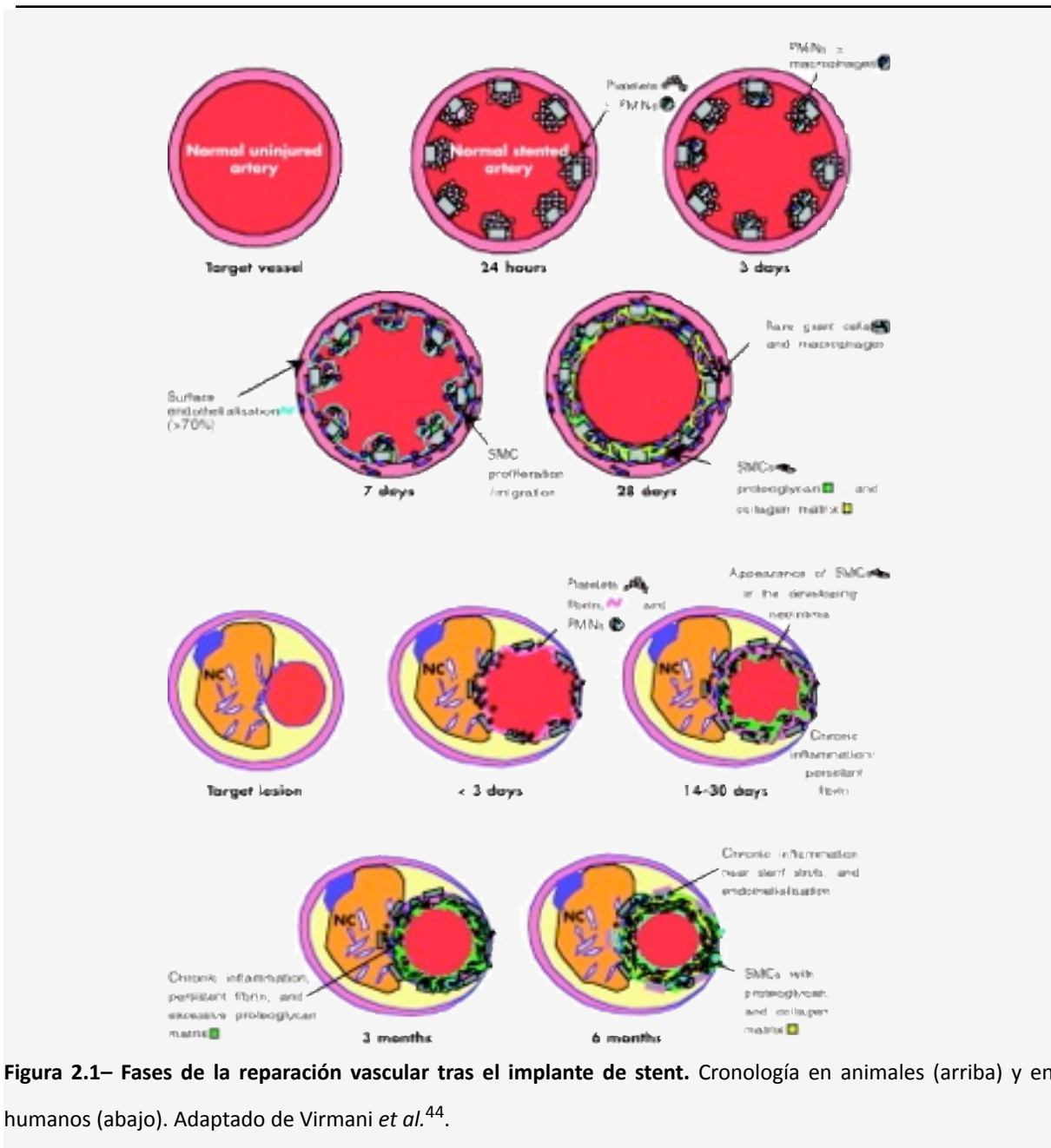


Figura 2.1– Fases de la reparación vascular tras el implante de *stent*. Cronología en animales (arriba) y en humanos (abajo). Adaptado de Virmani *et al.*<sup>44</sup>.

Las particularidades y cronología de la respuesta vascular al implante de SMC en animales están bien caracterizadas<sup>43,44,68,75-78,82-84</sup>.

- La fase más precoz, entre 1 y 3 días, está protagonizada por las plaquetas y el sistema de coagulación, con adhesión y agregación plaquetaria asociada a depósito de fibrina alrededor del *stent* y una reacción inflamatoria moderada con escasos neutrófilos adheridos a la superficie luminal del *stent*, como reflejan la Figuras 2.2 y 2.3.
- El trombo mural organizado se identifica alrededor del *stent* a los 7 días, apareciendo también células musculares lisas (CML) y macrófagos, con escasos linfocitos, fibrina y hematíes, así como las primeras células endoteliales en la superficie luminal. En el modelo de coronarias porcinas es frecuente observar en este punto un número moderado de células gigantes, adheridas a la superficie luminal del *stent*, como se aprecia en las Figuras 2.4 y 2.5.
- La fibrina permanece hasta los 14 días, con escasas células inflamatorias alrededor del *stent*.
- Aunque el crecimiento neointimal comienza precozmente, su máxima intensidad no se aprecia hasta la segunda semana con un número limitado de CML en una matriz rica en proteoglicanos. La proliferación celular dentro de la neointima alcanza su pico a los 7 días, reduciéndose a la mitad a los 14 días y regresando a valores basales al mes<sup>44</sup>.
- En el punto de máximo crecimiento miointimal, entre los 14 y 28 días, la neointima contiene CML y colágeno tipo III, con escasas células gigantes alrededor del *stent* y desaparición progresiva y completa de la fibrina en los SMC. La presencia de células inflamatorias y fibrina alrededor del *stent* a los 28 días es una característica distintiva de los SFA en comparación con los SMC<sup>53,73,85</sup>.



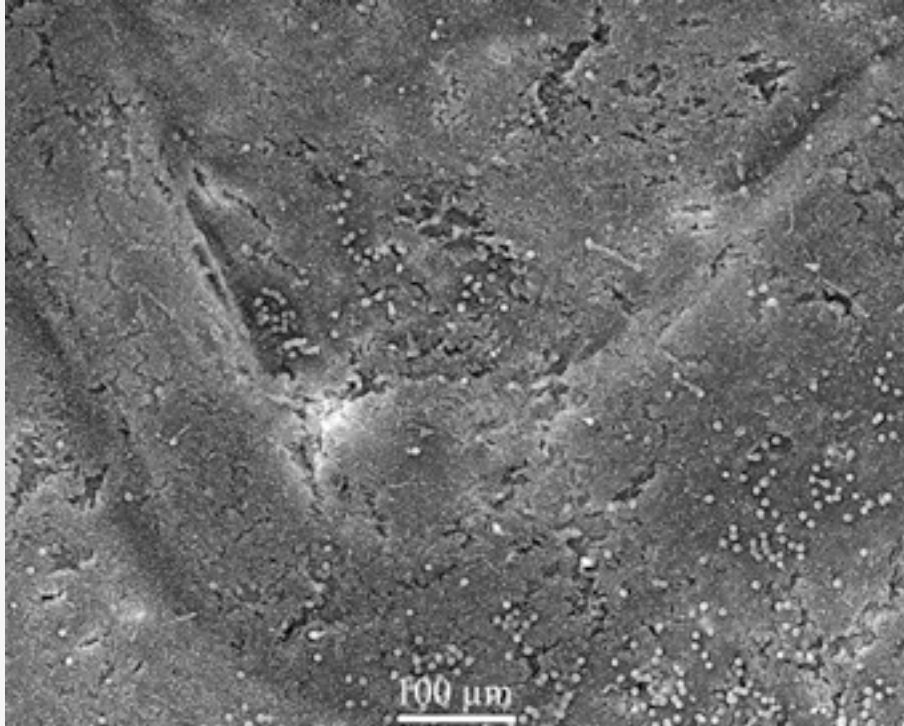


Figura 2.2– Imagen de microscopía electrónica de barrido (SEM) de arteria coronaria porcina, 1 día tras el implante de *stent* farmacoadactivo (SFA). La superficie no endotelizada del *strut* aparece recubierta de fibrina, plaquetas y células inflamatorias.

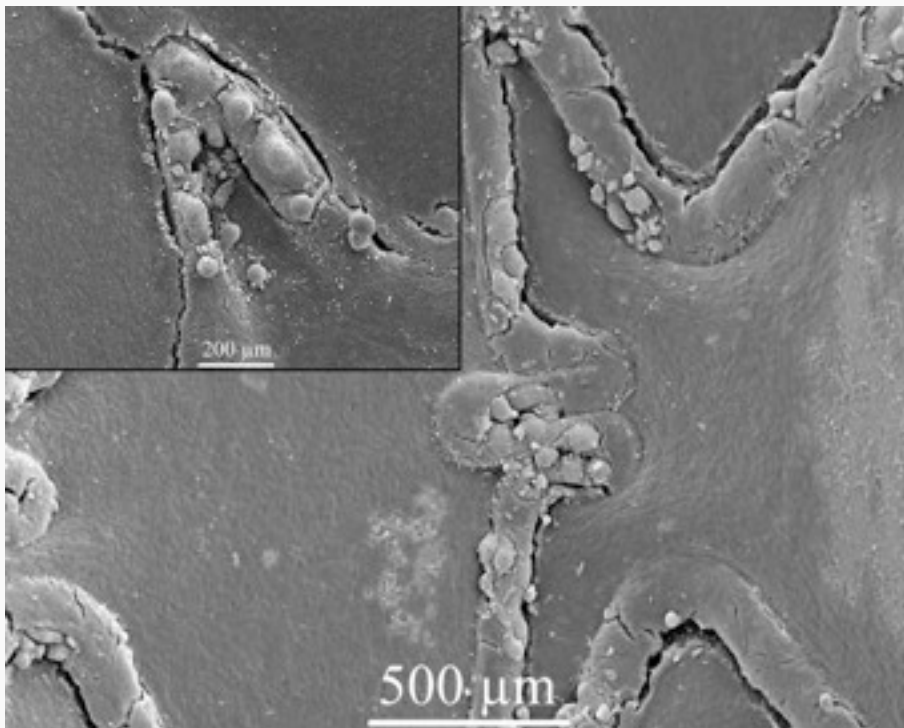
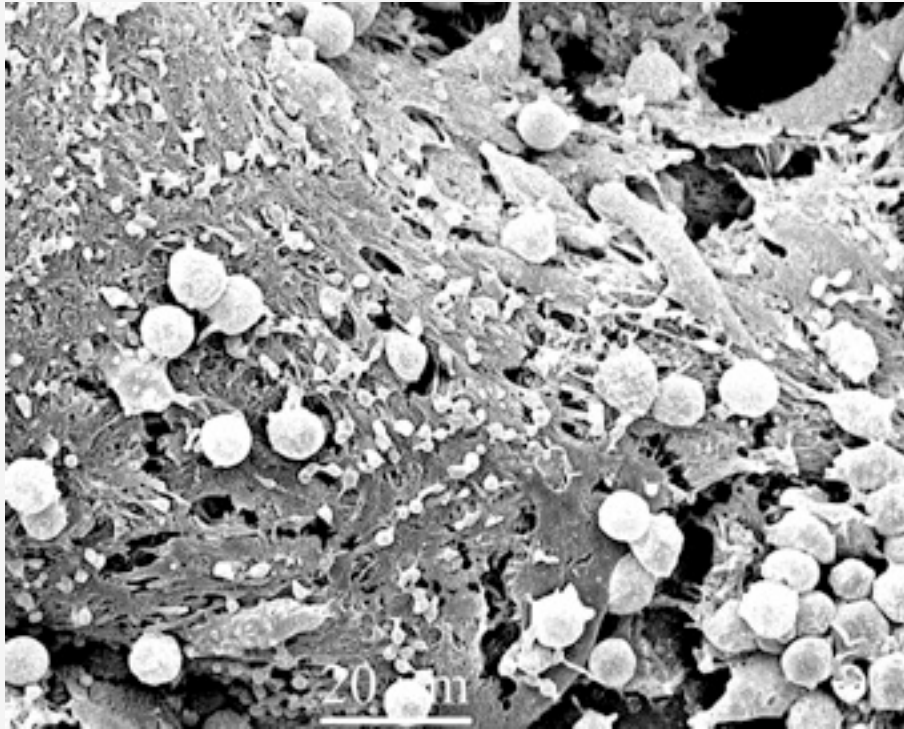
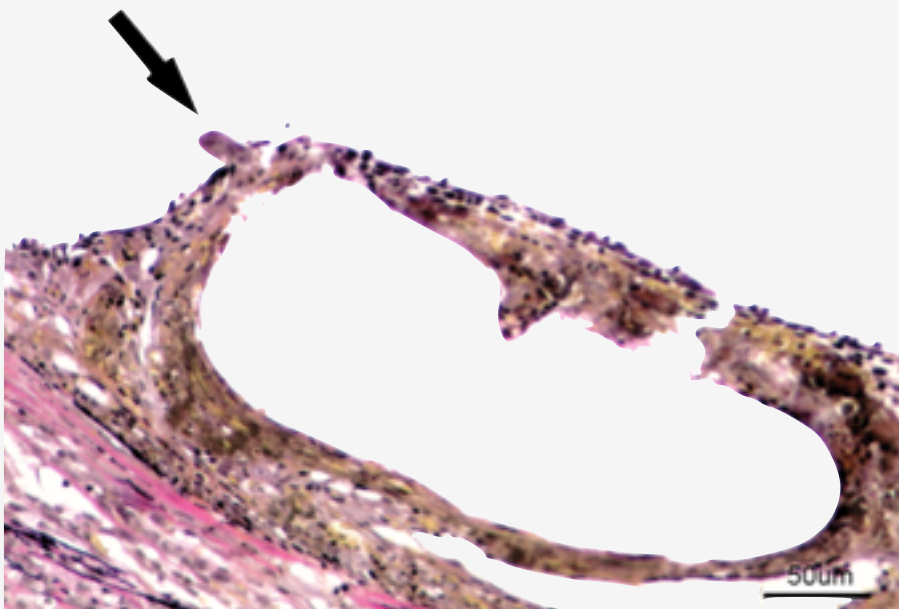


Figura 2.3– Imagen SEM de arteria coronaria porcina, 1 día tras el implante de SFA. A mayor magnificación se aprecian los detalles de la fibrina, plaquetas y células inflamatorias.



**Figura 2.4–** Imagen SEM de arteria coronaria porcina, 7 días tras el implante de SFA. Presencia de células gigantes luminales sobre las superficie no endotelizada de los *struts*. **Esquina superior izquierda:** detalle de las células gigantes.



**Figura 2.5–** Corte histológico con tinción de Verhoeff–Van Gieson de arteria coronaria porcina, 28 días tras el implante de SFA. Presencia de célula gigante luminal (flecha) con endotelización parcial del *stent*. Material amorfo (fibrina y restos celulares) y reacción inflamatoria alrededor de los *struts*.

Los estudios humanos muestran ligeras diferencias en el proceso de reparación vascular. La adhesión plaquetaria y el depósito de fibrina aún son evidentes hasta los 14 y 30 días, respectivamente<sup>76</sup>. La respuesta inflamatoria, fundamentalmente compuesta por polimorfonucleares y macrófagos, aparece precozmente, entre 1 y 3 días. Los macrófagos pueden seguir detectándose durante al menos 3 meses. Los linfocitos T aparecen más tardíamente, alrededor de los 14 días, y persisten más allá de los 6 meses. La proliferación celular en el interior de la neointima es evidente a los 14 días, pero aún carecemos de todos los datos acerca de la cronología de la proliferación celular en humanos. Al contrario de la composición casi exclusivamente celular en la neointima animal, la migración de CML desde la placa aterosclerótica o la capa media a la neointima puede ser el factor predominante en la génesis de la reestenosis en humanos<sup>44</sup>. En fases más tardías, y como reflejo de la evolución de la cicatrización de cualquier herida, el colágeno tipo I se convierte en el componente principal de la matriz extracelular, reemplazando al colágeno tipo III y provocando así una reducción en el espesor neointimal y un remodelado vascular positivo, con ganancia neta del área intraluminal<sup>86</sup>.

### **2.1.3. Profilaxis y tratamiento de la reestenosis: resultados del uso de la radiación y fármacos antiproliferativos**

Ante la evidencia de que la reestenosis tras el tratamiento endovascular de la enfermedad coronaria era el “talón de Aquiles” de la técnica, se ensayó la administración de múltiples fármacos por vía sistémica (antiagregantes plaquetarios, anticoagulantes, antiinflamatorios, inhibidores de la proliferación y migración celular, hipolipemiantes y vasodilatadores) para su prevención, si bien no se obtuvo un éxito definitivo. Los siguientes métodos ensayados para frenar la proliferación neointimal descrita emplearon distintos tipos y fuentes de radiación. La braquiterapia puede administrarse mediante el uso de catéteres (radiación  $\beta$  o  $\gamma$ ) o de *stents* radiactivos (radiación  $\beta$ ). Su eficacia en la inhibición de la proliferación neointimal se ha demostrado en distintos estudios animales<sup>49,50,87-93</sup>. Sin embargo, en estos ensayos se describe por primera vez el precio que hay que pagar por la eficacia: una reparación vascular defectuosa<sup>94-98</sup>. La neointima presente en estas arterias irradiadas muestra un número reducido de CML y un aumento en la formación de matriz extracelular<sup>49</sup>. Y al prolongar los períodos de observación en los modelos animales se apreció que el crecimiento neointimal no se eliminaba sino que se retrasaba, alcanzando los niveles de reestenosis observados en los controles a los 6 meses<sup>97</sup> y al año de seguimiento<sup>99</sup>. Además, comenzaron a detectarse

hallazgos histológicos preocupantes: depósitos de fibrina e inflamación persistentes en el interior de la neoíntima, así como una completa ausencia de re-endotelización luminal<sup>92,95,98,100-102</sup>. Estos hallazgos patológicos se correlacionan con una elevada incidencia de trombosis arterial subaguda y tardía y, consecuentemente, una elevada tasa de mortalidad: hasta el 50% de los animales tratados con aplicación de radiación  $\beta$  en un modelo coronario porcino murieron prematuramente<sup>102</sup>. La aparición de la temida complicación de la trombosis tardía del *stent* se confirmó clínicamente como una de las mayores limitaciones de esta técnica<sup>103</sup>.

Ante los frustrantes resultados de la braquiterapia, el desarrollo de los SFA se aceleró. El primer SFA que demostró su superioridad respecto a la terapia convencional en términos de reducción de la reestenosis fue el *stent* liberador de sirolimus (SLS), Cypher® (Cordis, USA), que en el primer ensayo clínico –RAVEL– demostró una, hasta entonces desconocida, tasa de reestenosis del 0% a los 6 meses<sup>11</sup>. Los resultados clínicos apoyaban así los prometedores datos obtenidos en la investigación experimental empleando sirolimus de forma parenteral<sup>104</sup> o mediante administración local<sup>105,106</sup>. Poco después de la publicación del citado estudio RAVEL, comenzaron a publicarse evidencias preclínicas de la pérdida de eficacia de este dispositivo en periodos de seguimiento más largos<sup>107</sup>, y las primeras comunicaciones de trombosis tardía del *stent* en el escenario clínico<sup>108,109</sup>. El siguiente SFA lanzado al mercado fue el *stent* liberador de paclitaxel (SLP) Taxus® (Boston Scientific, USA) que, de igual modo que el *stent* Cypher®, demostró una tasa de reestenosis a los 6 meses del 0% en el primer estudio publicado –TAXUS I<sup>110</sup>–. De nuevo, el dispositivo confirmaba los resultados observados en animales, pero la evidencia de progresión de la reestenosis a largo plazo<sup>85</sup> y la relación con episodios de trombosis tardía del *stent*<sup>109</sup> aparecieron incluso antes que en el caso anterior.

Las similitudes en la histopatología vascular tras la aplicación de braquiterapia y la implantación de SFA en los modelos animales apoyan la teoría de un fallo en la eficacia común a ambas: el crecimiento neointimal parece más retrasado que eliminado, lo que explica el fenómeno de *catch-up* tardío con aparición de reestenosis más allá de los plazos de seguimiento habituales. Distintos grupos han confirmado su presencia tras la aplicación de braquiterapia<sup>97,99</sup> y tras el implante de SFA<sup>85,107,111</sup>. Este fenómeno también se ha descrito en la clínica humana, tanto con SLP<sup>112-114</sup> como con SLS<sup>115-117</sup>. Se han sugerido distintos mecanismos fisiopatológicos para explicar esta reacción:

- Aoki *et al.*<sup>118</sup> describen una reducción en el volumen de la neointima entre los 6 meses y los 2 años tras el implante de SMC, mientras que el volumen neointimal aumenta en el caso de los SLP. Este fenómeno no se acompaña de pérdida luminal tardía, lo que sugiere un aumento compensatorio del tamaño total del vaso, es decir, un remodelado positivo de la arteria.
- Park *et al.*<sup>119</sup> demuestran la presencia de reestenosis muy tardía –2 años– restringida exclusivamente al subgrupo de alta dosis de paclitaxel en pacientes tratados con un SLP sin polímero.
- Byrne *et al.*<sup>120</sup> analizan los resultados de diferentes SFA en más de 1300 pacientes, demostrando la presencia de una pequeña pero significativa pérdida luminal muy tardía –entre los 6 meses y los 2 años– asociada con los SFA que emplean polímeros permanentes, tanto SLS como SLP, en comparación con los SLS sin polímero.

Otro fenómeno indeseable relacionado con los SFA es la aparición de nuevas lesiones arterioscleróticas en el interior de los *stents*, la denominada “neaterosclerosis”. Esta no es una entidad nueva, puesto que ya fue descrita por Van Beusekom *et al.*<sup>82</sup> hace 20 años tras la implantación de SMC en injertos venosos aorto–coronarios. Recientemente, los casos de neaterosclerosis se han relacionado con ciertas características de vulnerabilidad de la placa –mayor contenido lipídico, fibroateroma de capa fina, placas rotas– detectadas por ecografía intravascular (IVUS) e histología<sup>121</sup>, así como por tomografía de coherencia óptica (OCT)<sup>122,123</sup>. Esta complicación aparece en los SMC, y aún más a menudo tras la implantación de SFA y de forma más precoz. Nakazawa *et al.*<sup>124</sup> describen estos cambios patológicos hasta en el 31% de las lesiones tratadas con SFA en comparación con el 16% de las tratadas con SMC en una gran serie de autopsias humanas. El tiempo medio desde la implantación del *stent* a la aparición de neaterosclerosis es significativamente menor en los SFA ( $1.5 \pm 0.4$  años) que en los SMC ( $6.1 \pm 1.5$  años). Kang *et al.*<sup>123</sup> analizaron una serie de SFA con reestenosis intra–*stent* y demostraron una elevada prevalencia de características de placa vulnerable en los *stents* más antiguos ( $\geq 20$  meses) frente a los más recientemente implantados –fibroateroma de capa fina, 69% vs 33%; trombo rojo, 27% vs 0%–.

La aparición de estos fenómenos tardíos motiva que los documentos de consenso recomienden periodos de seguimiento más prolongados en los modelos animales para detectar este tipo de complicaciones antes de su uso clínico. El primer documento de

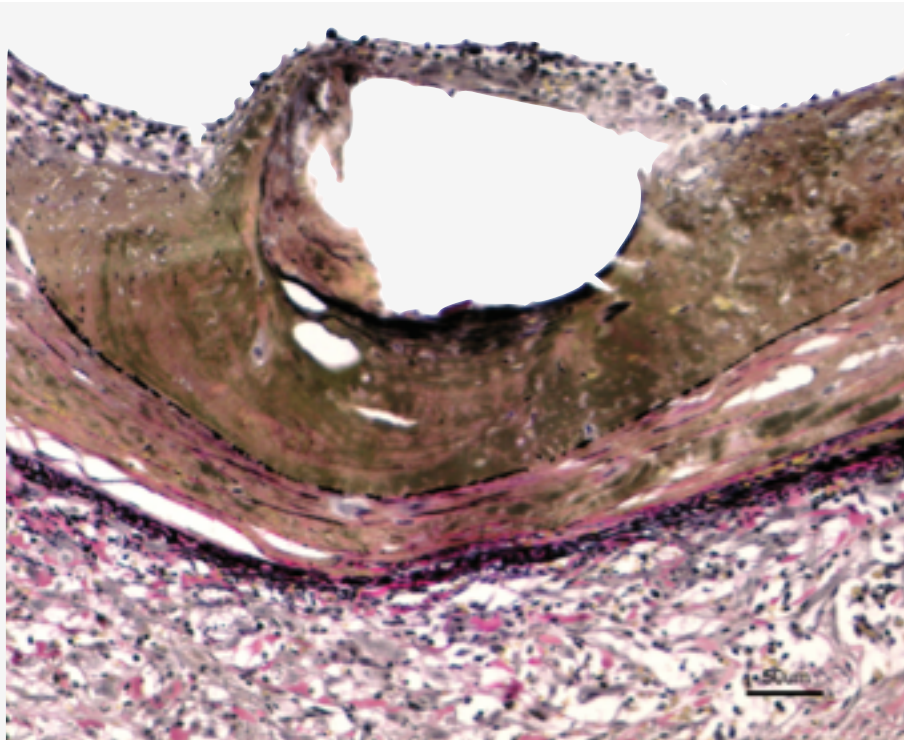
consenso<sup>32</sup> recomendaba seguimientos de entre 3 y 6 meses, y así lo sanciona el documento correspondiente de la agencia americana FDA<sup>24</sup>. La segunda versión del documento de consenso<sup>33</sup> extiende este plazo más allá del primer año de la implantación, como recogen las guías de la agencia europea EMA<sup>25</sup>.

## 2.2. Re–endotelización: la relevancia de recuperar un endotelio normal

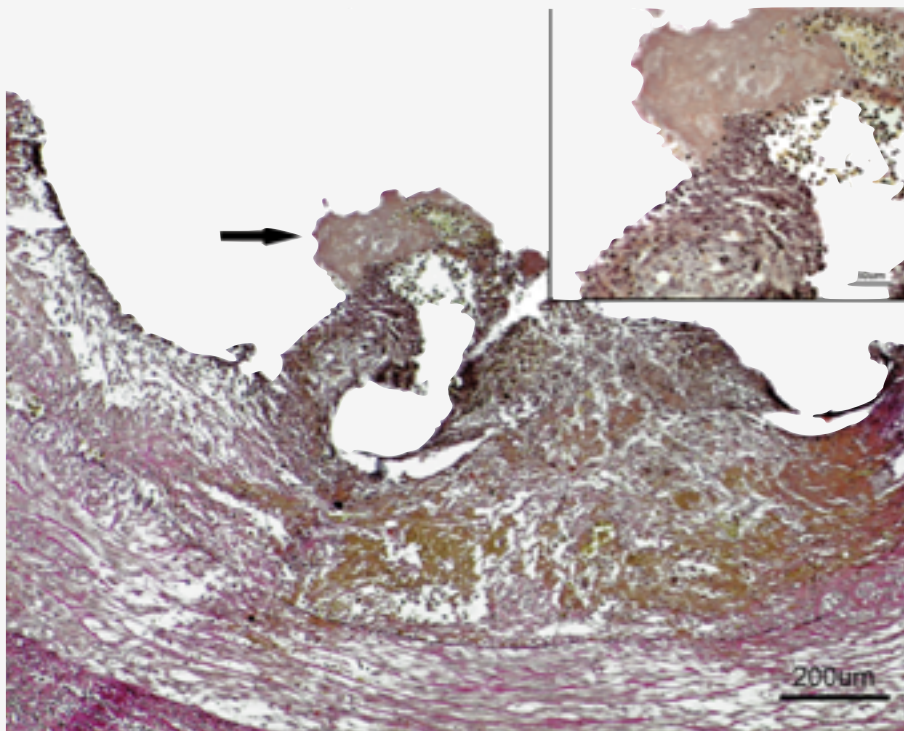
### 2.2.1. Reparación vascular retrasada: hallazgos en modelos animales y observaciones humanas

La denudación endotelial es una consecuencia común a la angioplastia con balón y la implantación de *stent*. La pérdida de la monocapa endotelial implica la exposición de estructuras muy trombogénicas como la propia capa media y los componentes de la placa arteriosclerótica subyacente. Por ello, es crítico recuperar este escudo que evita la trombosis arterial. El tiempo necesario para recuperar la completa endotelización del vaso varía desde los 7 días del modelo coronario porcino tratado con SMC<sup>83</sup>, a las 3–4 semanas necesarias en el modelo de arterias ilíacas de conejo<sup>43,69</sup> o los 3 meses observados en humanos<sup>68,76</sup>. Como se describe previamente, la braquiterapia induce un marcado retraso en la reparación vascular con endotelización incompleta incluso en periodos de seguimiento muy largos<sup>94-98,102</sup>. Por tanto, es de esperar que las arterias tratadas con SFA presenten hallazgos similares: Farb *et al.*<sup>85</sup> ya describieron reparación incompleta a los 28 días de la implantación de SLP en el modelo de arteria ilíaca de conejo.

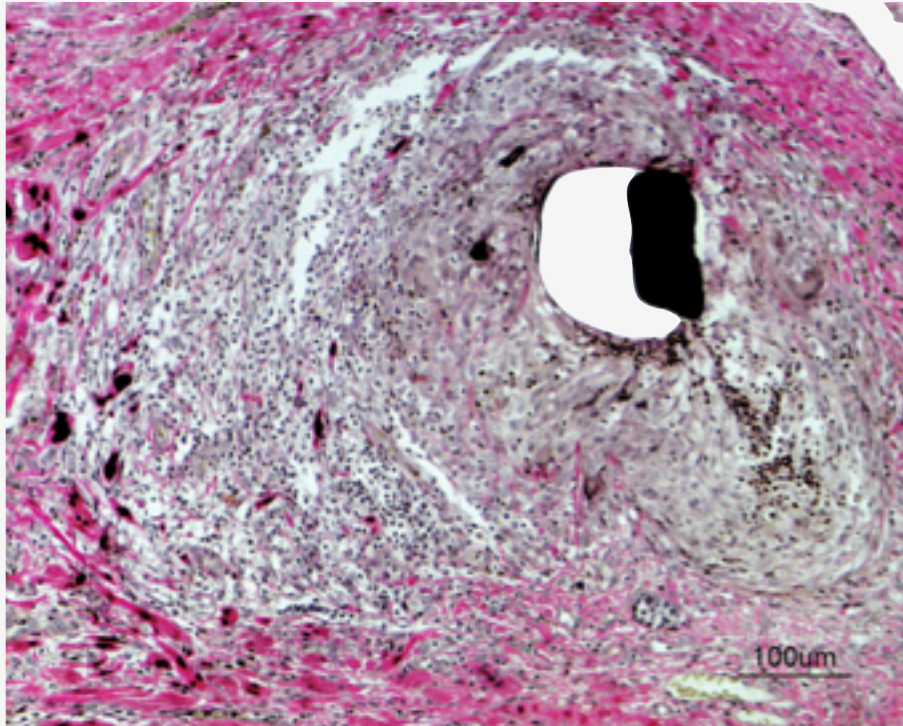
Otros marcadores de reparación retrasada que se ilustran en las Figuras 2.6 y 2.7, como el depósito significativo de fibrina alrededor del *stent*, la pérdida de masa celular en la capa media y los signos persistentes de inflamación, han sido descritos en relación tanto con SLS como con SLP<sup>73</sup>. La presencia de eosinófilos en la reacción inflamatoria apoya la existencia de reacciones locales de hipersensibilidad que pueden relacionarse con acontecimientos clínicos adversos<sup>71,72,125</sup>. Los dos SFA de primera generación, Cypher® y Taxus®, parecen mostrar diferentes características histopatológicas representativas de reparación retrasada. Los SLS tiende a mostrar más frecuentemente eosinófilos alrededor del *stent*<sup>66,73</sup> y granulomas en profundidad (como se observa en la Figura 2.8), incluso a nivel adventicial<sup>67</sup>. Por el contrario, los SLP se asocian más frecuentemente con necrosis de la capa media<sup>73</sup>, remodelado positivo<sup>118</sup> y depósito persistente de fibrina<sup>66,85</sup>.



**Figura 2.6–** Corte histológico con tinción de Verhoeff–Van Gieson de arteria coronaria porcina, 28 días tras el implante de SFA. Presencia de material amorfo alrededor del *strut*. Malaposición del *strut*, sin apoyo sobre la lámina elástica interna (LEI). Necrosis de la capa media bajo el *stent* y reacción inflamatoria adventicial.



**Figura 2.7–** Corte histológico con tinción de Verhoeff–Van Gieson de arteria coronaria porcina, 28 días tras el implante de SFA. Trombo luminal (flecha) y depósito de material amorfo y células inflamatorias alrededor del *strut*. Malaposición del *strut*, sin apoyo sobre la LEI. Necrosis de la capa media bajo el *stent*. **Esquina superior derecha:** Detalle del trombo. Presencia de células espumosas y polimorfonucleares.



**Figura 2.8–** Corte histológico con tinción de Verhoeff–Van Gieson de arteria coronaria porcina, 28 días tras el implante de SFA. Reacción inflamatoria granulomatosa con polimorfonucleares alrededor del *stent*.

Las muestras de autopsias humanas confirmaron posteriormente los hallazgos observados en la experimentación animal. Farb *et al.*<sup>126</sup> fueron los primeros en describir la reparación retrasada en casos de trombosis tardía tras el implante de SFA: 12 de los 13 casos analizados mostraron una neoíntima inmadura sobre el *stent*. El mismo grupo de investigadores<sup>127</sup> completó posteriormente la información en un estudio esencial en este campo, con un periodo de seguimiento tras el implante de los *stents* de más 220 días. Los SFA mostraron una menor superficie del *stent* endotelizada ( $56 \pm 26\%$  vs  $90 \pm 21\%$ ) y una mayor cantidad de fibrina (grado  $2.3 \pm 1.1$  vs  $0.9 \pm 0.8$ ) que los SMC. En una publicación posterior<sup>128</sup>, se confirma que el predictor histológico más importante de la trombosis del *stent* es la ausencia de cobertura endotelial, lo que cuantifican como relación de *struts* (puntales o componentes metálicos del *stent*) descubiertos respecto al número total de *struts* por sección estudiada (RUTSS). Una RUTSS  $>30\%$  se asocia con una incidencia de trombosis tardía 9 veces superior (odds ratio –OR– 9.0, IC95% 3.5–22). El punto de corte RUTSS  $>30\%$  discrimina la presencia de trombosis tardía con una sensibilidad del 75% y especificidad del 76%. Cifras más elevadas de RUTSS así como mayores depósitos de fibrina y signos de inflamación persistente aparecen más frecuentemente en los pacientes tratados con SFA en el seno del infarto agudo de miocardio en comparación con pacientes con angina inestable, lo que podría



correlacionarse con una mayor incidencia de trombosis tardía en los casos de infarto agudo de miocardio tratados con SFA de 1ª generación<sup>70</sup>.

Otras variables asociadas con los citados datos de reparación defectuosa son las fracturas de los *stents*, especialmente aquellas que muestran una separación completa<sup>129</sup>, y, de forma muy importante, los *stents* solapados<sup>67,69,73,130-132</sup>. En el uso clínico diario, hasta en el 30% de los procedimientos de implante de *stent* se emplean 2 ó más dispositivos solapados. La cantidad de fármaco y polímero presente es mucho mayor, y por tanto la posibilidad de efectos indeseables se incrementa. Por ello es crítico conocer las implicaciones y resultados de este tipo de tratamientos, recomendándose por consenso el uso de modelos animales de *stents* solapados<sup>24,25,33</sup>, al menos en las fases más avanzadas de cualquier protocolo de evaluación preclínica de SFA. Este modelo también resulta adecuado para evaluar las fracturas de los *stents* ya que proporciona un punto de flexión o “bisagra” que puede facilitar su rotura.

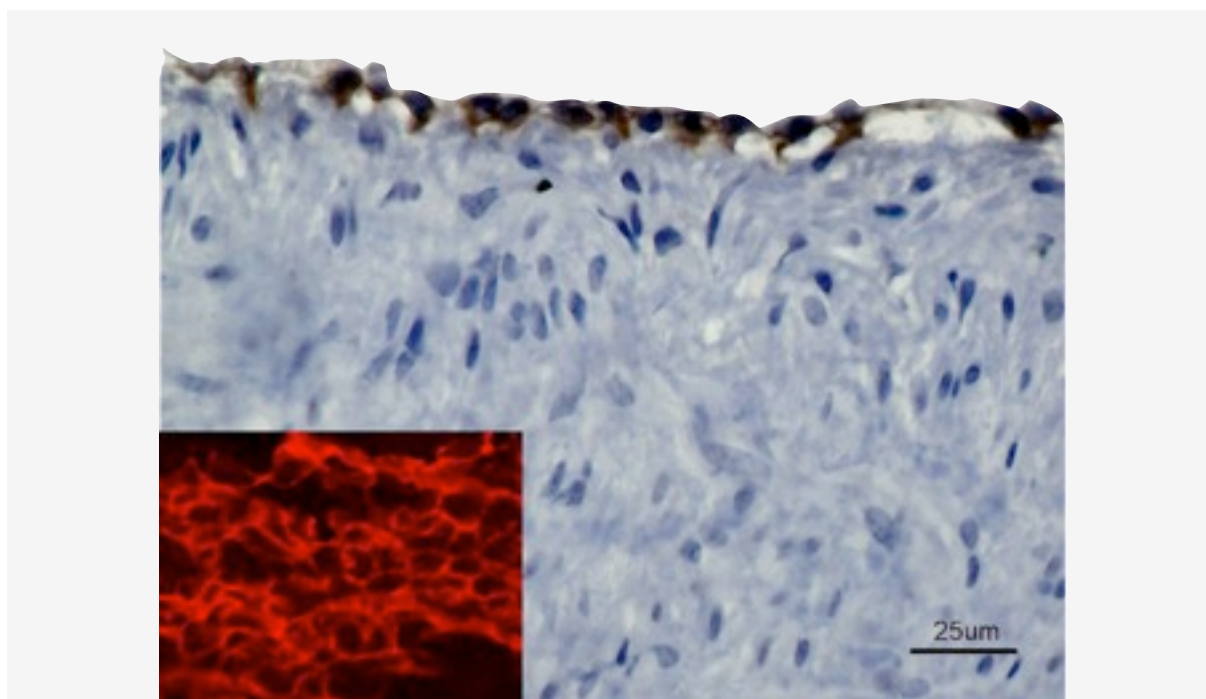
### **2.2.2. Re-entotelización morfológica y recuperación funcional: respuesta vasomotora**

La ausencia de una cobertura endotelial sobre el *stent* se ha asociado con un pronóstico negativo, pero la mera presencia de células endoteliales no implica una recuperación de la fisiología vascular. Aunque son muchas las comunicaciones que reflejan un marcado retraso de la reparación vascular tras la implantación de SFA, otros trabajos han descrito una aceptable tasa de endotelización en el modelo coronario porcino a los 28 días con SLS<sup>105</sup>, SLP<sup>131</sup> o el *stent* liberador de tacrolimus (SLT)<sup>133</sup>. Los SFA de 2ª generación como el *stent* liberador de zotarolimus (SLZ) o de everolimus (SLE), han demostrado incluso mejores resultados preclínicos<sup>47,130,134</sup>. Sin embargo, la mayoría de estos estudios destaca la inmadurez de las células endoteliales identificadas, lo cual en muchos casos se relaciona con función alterada<sup>133,135-140</sup>. Es bien conocido que la implantación del *stent* induce una disfunción endotelial más pronunciada y prolongada que la observada tras la dilatación simple con balón<sup>141</sup>.

Para analizar la funcionalidad del endotelio se han descrito distintos marcadores inmunohistoquímicos de madurez de las células endoteliales:

- **Molécula 1 de adhesión celular plaqueta–endotelio (PECAM–1, CD31):** esta molécula es miembro de la superfamilia de las proteínas transmembrana, que se concentran en las uniones endoteliales<sup>142</sup>. Su interacción con las integrinas parece esencial en la migración transendotelial de leucocitos, más que la propia permeabilidad endotelial. Su función también influyen en la vasculogénesis, apoptosis y hemostasis. Distintos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que PECAM–1 inhibe la agregación plaquetaria, lo que reduce la velocidad de formación del trombo y, finalmente, su tamaño<sup>143</sup>. La Figura 2.9 (esquina inferior izquierda) ilustra la distribución de este marcador en una muestra de microscopía confocal *en face*.
- **Trombomodulina (CD141):** es una proteína de membrana encontrada en la superficie de células endoteliales. Sirve de cofactor para la activación de la proteína C por la trombina en la vía de la coagulación. La trombina unida a la trombomodulina no tiene efecto procoagulante sino que estimula la fibrinólisis<sup>144</sup>. La pérdida de la función de la trombomodulina causa trombosis espontánea en la circulación arterial y venosa<sup>145</sup>.
- **Factores de crecimiento vascular endotelial (VEGF):** son un importante conjunto de proteínas de señal involucradas en la vasculogénesis –formación de novo del sistema circulatorio embrionario– y angiogénesis –desarrollo de nuevos vasos a partir de la vasculatura existente–. Los VEGF inducen actividad mitogénica específica en las células endoteliales y son considerados reguladores clave en la angiogénesis normal y patológica, así como en la permeabilidad vascular<sup>146</sup>. Las proteínas VEGF y los niveles de mRNA se encuentran aumentados en los tejidos con angiogénesis en curso mientras que se aprecia regulación a la baja tras el desarrollo completo de los vasos. VEGF–A es el responsable de la inducción de angiogénesis patológica así como del mantenimiento del endotelio vascular normal.
- **Óxido nítrico (NO):** se asocia con la inhibición plaquetaria y la activación de leucocitos, así como el mantenimiento de las CML vasculares en un estado quiescente, no proliferativo<sup>137</sup>. Además de ser el principal responsable del mantenimiento del tono vascular, el NO se opone a la acción de potentes factores vasoconstrictores derivados del endotelio, como la angiotensina–II y la endotelina–1<sup>147-149</sup>, las cuales también inducen la activación plaquetaria y la liberación de factores de crecimiento. La disminución de la actividad de NO o el desequilibrio entre los factores vasoconstrictores y vasodilatadores derivados del endotelio es crucial en la aparición de disfunción

endotelial. La Figura 2.9 refleja la expresión de sintetasa endotelial de NO (eNOS) en una capa de células endoteliales y la presencia de PECAM-1/CD31 en las uniones intercelulares.



**Figura 2.9–** Tinción con inmunoperoxidasa (ABC–peroxidasa) que muestra una expresión elevada de anticuerpo anti–eNOS (sintetasa de óxido nítrico endotelial, color marrón) en la monocapa endotelial. **Esquina inferior izquierda:** Imagen confocal *en face* de hemisección arterial completa, inmunofluorescencia que demuestra expresión (color rojo) de PECAM–1 / CD31 en los bordes celulares endoteliales.

El principal marcador *in vivo* de disfunción endotelial es la alteración de la respuesta vasomotora. Togni *et al.*<sup>150</sup> fueron los primeros en describir la evidencia de una respuesta vasomotora anómala en pacientes que habían sido tratados con SLS 6 meses antes: el ejercicio, uno de los más potentes estímulos fisiológicos de la vasodilatación dependiente del endotelio, inducía vasoconstricción paradójica en el vaso distal a la localización del *stent*. Aunque datos previos<sup>151</sup> demostraban que la aplicación local de sirolimus induce un severo deterioro de la respuesta vasodilatadora de las arterias epicárdicas a la serotonina y bradiquinina, los ensayos preclínicos para analizar la respuesta vasomotora tras el implante de SFA se realizaron posteriormente a la primera observación clínica<sup>152</sup>. Esta respuesta vasomotora anormal tras la implantación de SLS se ha ratificado posteriormente en distintos ensayos en animales<sup>133,139,153</sup> y humanos<sup>154-160</sup> empleando distintos agentes dependientes del endotelio, como la acetilcolina (ACh), sustancia P, serotonina, bradiquinina, endotelina–1 y estimulación cardíaca rápida. Los resultados con SLP son superponibles a los descritos,

tanto en animales<sup>133,136,139,161,162</sup> como en humanos<sup>155,157-159,163</sup>. Parece que el SLZ<sup>159,160</sup> y el *stent* liberador de biolimus (SLB)<sup>158,159,164</sup> muestran mejores resultados en términos de función vasomotora dependiente del endotelio que los SFA de 1ª generación.

Una de las teorías que explican este fenómeno paradójico de vasoconstricción se basa en el papel de *los vasa vasorum*, que pueden extenderse varios centímetros a lo largo de la pared arterial coronaria<sup>165</sup>. Así, los fármacos antiproliferativos pueden difundir a través de estos pequeños canales alcanzando las zonas distales. Algunos hallazgos relacionan un aumento en el número de los *vasa vasorum* con el implante de SFA y un potencial papel en la persistencia de la inflamación<sup>166</sup>. El polímero presente en muchos de estos *stents* también puede inducir reacciones de hipersensibilidad que podrían participar en la respuesta vasomotora anómala<sup>71,137</sup>. La respuesta vasomotora anómala y las características morfológicas de inmadurez endotelial, como la expresión de eNOS reducida<sup>133</sup> y marcadores de estrés oxidativo aumentados<sup>162</sup>, aparecen de forma simultánea tras la implantación de SLP. Sin embargo, la conexión entre los marcadores morfológicos de inmadurez endotelial, como la expresión de eNOS, y la respuesta funcional vasomotora a la ACh aún es motivo de controversia.

### 2.2.3. Recuperación endotelial y reestenosis: ¿existe una conexión?

Algunos autores<sup>167</sup> defienden una conexión entre la disfunción endotelial, demostrada mediante insuficiente vasodilatación de la arteria braquial en respuesta a estímulos dependientes del endotelio, y la reestenosis después del implante de SMC; mientras, otros estudios no logran confirmar esta conexión<sup>168</sup>. El potencial papel de la recuperación endotelial en la génesis de la reestenosis se extiende al análisis de las células progenitoras del endotelio (EPC), caracterizadas por la expresión de CD34+/KDR+/CD45-, que aparecen en mayor número circulante en los pacientes que presentan reestenosis frente a los controles<sup>169</sup>. El endotelio modula la homeostasis local a través de componentes vasoactivos y constituye una barrera que aísla las CML de los factores de crecimiento circulantes. Las células endoteliales sintetizan distintos factores de crecimiento, como el factor de crecimiento de los fibroblastos, los factores de crecimiento derivados de plaquetas y el factor de transformación / crecimiento  $\beta$ , críticos en la proliferación de CML<sup>170</sup>. Además, el endotelio funcional mantiene la quiescencia mitogénica de las CML mediante el efecto inhibitorio del NO<sup>171</sup>. Por tanto, la pérdida de las células endoteliales provoca proliferación y

migración de las CML hacia la superficie del vaso desnuda, donde secretan las proteínas que componen la matriz extracelular y finalmente conducen a la formación de la neoíntima<sup>172</sup>. La relación proporcional entre la extensión de superficie endotelial desnuda y el grado de desarrollo de neoíntima se ha demostrado por distintos grupos<sup>173,174</sup>. Otro dato que apoya estas teorías es el hecho de que las CML sólo aparecen en la íntima de aquellas zonas desprovistas de endotelio a los 7 días<sup>175</sup>.

¿De donde provienen las nuevas células endoteliales que repueblan las zonas previamente desnudas? Su origen desde las EPC circulantes es bien conocido desde hace tiempo<sup>176</sup>, pero también pueden proliferar desde los bordes indemnes de la arteria<sup>170</sup> o incluso derivarse de la estirpe celular monocito/macrófago<sup>177</sup>. Basándose en los datos previos, Van Belle *et al.*<sup>178</sup> exploraron la hipótesis de que una endotelización acelerada mediante la administración local de factores de crecimiento específicos del endotelio en un modelo de arteria iliaca en conejo podría relacionarse con una reducción en la formación de la neoíntima intra-*stent*. Otros estudios confirmaban la conexión entre la función endotelial y la reestenosis, tanto en modelos animales<sup>179,180</sup> como en clínica humana<sup>181-183</sup>. Basándose en esta hipótesis, se desarrolló un *stent* con tratamiento de bio-ingeniería, el *stent* Genous® (OrbusNeich, USA), recubierto con anticuerpos anti CD34 con la capacidad de fijar EPC circulantes y promover una rápida re-endotelización<sup>184,185</sup>. Los análisis preclínicos en el modelo de arterias coronarias porcinas y en el modelo de *bypass* de primate demostraron una rápida y completa endotelización tras el implante de este *stent*<sup>186</sup>. Aunque los primeros ensayos clínicos mostraron resultados prometedores en términos de reducción de la reestenosis<sup>187</sup>, no se confirmaron en los estudios posteriores<sup>188,189</sup>. Una de las posibles explicaciones para la desconexión entre endotelización y reestenosis con este dispositivo es el número relativamente bajo de EPC circulantes en pacientes ancianos y enfermos<sup>183,188</sup> en comparación con los animales jóvenes y sanos usados en los modelos preclínicos. Por otra parte, el marcador CD34+ no es específico y está presente en otras células madre hematopoyéticas. Es probable que la captura de células progenitoras por parte de este dispositivo sea indiscriminada, atrayendo otras precursoras como las de las CML, que pueden incluso aumentar la proliferación neointimal<sup>190-192</sup>. En esta línea se han desarrollado otros dispositivos como los *stents* recubiertos de péptidos arginina-glicina-aspártico, fijadores de las integrinas de las EPC, que han demostrado una re-endotelización acelerada<sup>193,194</sup>.

## 2.3. Las 3 variables en la ecuación de los SFA = Armazón metálico + Polímero (si lo hay) + Fármaco

### 2.3.1. Armazón o estructura metálica

Son varias las características de la estructura metálica del *stent* que pueden tener influencia sobre su funcionamiento a largo plazo y, por lo tanto, deben ser analizadas:

- **Aleación metálica:** los primeros *stents* disponibles para el uso coronario eran prótesis auto-expandibles construidas con acero inoxidable 316L<sup>8</sup> o con nitinol, una aleación de níquel y titanio con una gran memoria de forma, como el Wallstent<sup>®16</sup>. Durante muchos años, la mayoría de los *stents* empleados en las arterias coronarias han sido dispositivos de acero inoxidable expandibles con balón. Más recientemente, nuevas aleaciones metálicas que permiten mantener la fuerza radial reduciendo la masa de metal han sustituido al acero inoxidable como base de los *stents* coronarios. Actualmente, la mayoría de ellos utiliza aleaciones de cromo y cobalto o de cromo y platino, lo que permite reducir el espesor de los *struts* sin perder fuerza radial. La proporción de níquel y molibdeno presente en los distintos *stents* no es la misma. Las distintas cantidades de estos elementos podrían explicar, al menos en términos de reestenosis, algunos resultados que relacionan la alergia de contacto a estos metales con la reestenosis intra-*stent*<sup>195</sup>. Este es un tema controvertido, como demuestran Messer *et al.*<sup>196</sup> al no encontrar diferencias en términos de expresión de moléculas de adhesión celular en las células endoteliales expuestas a distintas aleaciones metálicas. Otros grupos tampoco logran confirmar la asociación clínica entre la alergia al níquel y la reestenosis<sup>197</sup>.
- **Grosor de la estructura metálica:** los estudios ISAR-STEREO e ISAR-STEREO 2<sup>198,199</sup> ya demostraron en el terreno clínico que el uso de una estructura metálica más fina (*struts* de 50 vs 140  $\mu\text{m}$ ) se asociaba con una reducción significativa en la reestenosis clínica y angiográfica tras el implante de *stent*. Briguori *et al.*<sup>200</sup> confirmaron los hallazgos en un subgrupo de lesiones localizadas en vasos pequeños. Sin embargo, datos experimentales de un modelo de arteria iliaca de conejo empleando *stents* de acero inoxidable con dos grosores de los *struts* distintos (125 y 200  $\mu\text{m}$ ) no demostraron diferencias en la hiperplasia neointimal<sup>201</sup>. En términos de reparación vascular en un modelo de arterias iliacas de conejo, la cobertura de la superficie luminal del *stent* es significativamente menor a los 14 días con *stents* de acero inoxidable de *struts* más gruesos (132  $\mu\text{m}$ ) que

en los que tienen *struts* más finos, sean éstos de acero inoxidable (97  $\mu\text{m}$ ) o de cromo-platino (81  $\mu\text{m}$ )<sup>202</sup>. Otros estudios *in vitro*<sup>203</sup> demuestran que la cobertura de células endoteliales podría estar disminuida en aquellos *stents* con *struts* más anchos ( $\geq 75 \mu\text{m}$ ).

- **Diseño y geometría:** algunos autores<sup>31,204</sup> defienden la influencia que el diseño del *stent* puede tener sobre la aparición de reestenosis. La geometría de estos dispositivos es de particular importancia como ya se demostró hace casi dos décadas<sup>31</sup>: la reducción del número de intersecciones entre los *struts* en un 29%, sin afectar la masa total o la superficie ocupada, reducía el daño vascular en un 42%, la trombosis un 69% y la hiperplasia neointimal un 38%. El mismo grupo de investigadores comprobó que el diseño del *stent* (8 vs 12 *struts* por sección) y la geometría arterial son los principales predictores de reestenosis *in vitro*<sup>201</sup>. El diseño del *stent*, en forma de hilo en espiral –*coil*– o de tubo cortado<sup>205</sup>, y el tipo del *stent*, auto-expandible de nitinol o expandible por balón<sup>77,206</sup>, pueden representar también un papel importante en la respuesta vascular. La peor cobertura endotelial observada en *struts*  $\geq 75 \mu\text{m}$ <sup>203</sup> podría explicarse por las alteraciones del flujo ocasionadas por la obstrucción parcial que condicionan estas estructuras más grandes y que dificultarían el anidamiento celular<sup>207</sup>. Incluso características tan sutiles como el ángulo que forma la estructura metálica con la pared arterial podrían condicionar el grado de endotelización, resultando éste mayor cuando el ángulo formado entre el *strut* y la pared arterial es más pequeño<sup>208</sup>.
- **Recubrimiento:** para mejorar la biocompatibilidad y, potencialmente, los resultados clínicos de los *stents*, se emplean distintos recubrimientos de la estructura metálica. Los *stents* recubiertos de heparina parecen asociarse con una mejor reparación vascular<sup>209,210</sup>. El recubrimiento con lámina de carbono (Carbofilm®, CID, Italia) ha demostrado un excelente perfil en términos de reparación vascular<sup>211,212</sup>. El recubrimiento con titanio y óxido nítrico (Titan®, Hexacath, Francia) ha demostrado una reducción en la adhesividad plaquetaria y en la formación de fibrina, así como una reducción en la hiperplasia neointimal en el modelo coronario porcino<sup>213</sup>. Los resultados clínicos del *stent* Titan® son similares a los obtenidos con la primera versión de SLZ, *stent* Endeavor® (Medtronic, USA)<sup>214</sup>. El recubrimiento con carburo de silicio (ProBio®, Biotronik, Germany) reduce la trombogenicidad *in vitro*<sup>215</sup> y muestran menor adhesión de proteínas, con una rápida re-endotelización, lo cual conduce a la recuperación funcional<sup>216</sup> con resultados clínicos equivalentes a los obtenidos con SFA<sup>217</sup>.

- **Andamiaje –scaffolding– permanente vs. temporal:** Desde su nacimiento, el concepto del *stent* implica la colocación de una estructura permanente para evitar la oclusión aguda y las fuerzas de retroceso elástico de la arteria. Sin embargo, ambos fenómenos aparecen restringidos a una ventana de tiempo, habitualmente limitada a las primeras semanas tras la ICP. Pasado ese tiempo, el riesgo de sufrir cualquiera de estas complicaciones es casi despreciable y la presencia de una estructura extraña permanente podría aumentar el daño vascular inducido. Además, la presencia de esta estructura metálica puede limitar futuros procedimientos de revascularización así como la obtención de imágenes diagnósticas por técnicas no invasivas. Las primeras experiencias preclínicas<sup>218</sup> y clínicas<sup>219</sup> con endoprótesis bioabsorbibles emplearon *stents* de ácido poli-L-Láctico (PLA), el *stent* de Igaki-Tamai. Como ya se había observado con el empleo de distintos polímeros en investigación animal<sup>61-63</sup>, la respuesta inflamatoria desencadenada es intensa y conduce a una mayor proliferación neointimal. Esta investigación pionera sentó la base del desarrollo de una endoprótesis temporal combinada con un fármaco antiproliferativo, el sistema Absorb BVS® (Abbott Vascular, USA). Se han desarrollado otros sistemas de endoprótesis temporales basados en copolímeros de policarbonato de tirosina (REVA *stent*®, REVA Medical, USA)<sup>220</sup> o en ácido salicílico mezclado con un éster poli-anhídrido (IDEAL BDS®, Bioabsorbable Therapeutics, USA)<sup>221</sup>. Un enfoque distinto lo constituyen los *stents* metálicos reabsorbibles. El *stent* metálico reabsorbible de magnesio (AMS®, Biotronik, Germany) ha demostrado una alta tasa de degradación a los 2 meses<sup>222</sup>. Los *stents* reabsorbibles de hierro se han analizado en modelos animales con resultados que sugieren “bio-corrosión” tardía, a los 18 meses<sup>223,224</sup>.

### 2.3.2. Polímeros y otros vehículos para la administración de fármacos antiproliferativos

Los SFA de 1ª generación emplean polímeros permanentes ya comercializados, no específicamente diseñados para su uso vascular. Aunque éstos cumplían los requisitos para la liberación controlada del fármaco, los datos acerca del funcionamiento a largo plazo en territorio vascular eran escasos. A medida que se realizaron más estudios histopatológicos, creció la evidencia de que estos polímeros permanentes podían contribuir a la aparición de la trombosis tardía del *stent* induciendo inflamación vascular localizada, hipereosinofilia, reacciones trombóticas y apoptosis de las CML<sup>71,72,112</sup>. El SLS Cypher® está recubierto de una



mezcla de polímeros Poli(etilen co–vinil acetato) –PEVA– y Poli(n–butil metacrilato) –PBMA– que se ha asociado con la aparición de reacciones granulomatosas y de hipersensibilidad en modelos animales y en humanos<sup>66,225</sup>. El SLP Taxus® emplea el polímero Poli(estireno–b–isobutileno–b–estireno) –SIBBS– que se ha asociado con necrosis de la capa media, remodelado positivo y excesivo depósito de fibrina<sup>67,131</sup>.

Los SFA de 2ª generación han mejorado en la selección de los polímeros. La primera versión de SLZ, *stent* Endeavor® (Medtronic, USA), está recubierto de fosforilcolina. Este recubrimiento se asocia con un alto grado de endotelización a los 5 días<sup>226,227</sup>. Desafortunadamente, los resultados clínicos de este SFA no cumplieron las expectativas en cuanto a reestenosis<sup>228</sup>. La segunda versión de este SLZ, *stent* Endeavor Resolute® (Medtronic, USA), emplea el polímero biocompatible Biolinx®, una mezcla de tres polímeros distintos: el polímero hidrofóbico C10 para el control de la liberación del fármaco, el polímero hidrofílico y biocompatible C19 y la polivinil–pirrolidona que permite una liberación inicial más rápida. Los resultados preclínicos de este nuevo SFA<sup>130,134,229</sup> en términos de eficacia y seguridad se vieron confirmados en los posteriores ensayos clínicos<sup>159,160</sup>. Otro SFA de 2ª generación que ha demostrado eficacia superior en comparación con los de 1ª generación<sup>230,231</sup> es el SLE (Xience®, Abbott, USA; Promus®, Boston Scientific, USA), recubierto de una combinación de polímero de fluoruro de polivinilidina, co–hexafluoropropileno y poli–n–butil–metacrilato. Este SLE no sólo presenta mejores resultados en eficacia, sino que ha mostrado un mejor perfil de reparación vascular en comparación con otros SFA en ensayos preclínicos<sup>47,134,202</sup>.

Los nuevos polímeros permanentes pretenden solventar las limitaciones de los compuestos previos. Un ejemplo es el polímero P5® (Iberhospitex, España), un copolímero acrílico/metacrílico derivado del triflusal (antiplaquetario desarrollado por Uriach, España) y butil–acrilato. En la evolución de la tecnología de los SFA también podemos encontrar intentos fallidos en el campo de los polímeros. El SFA QuaDS–QP2 es un *stent* de acero inoxidable recubierto de múltiples capas de poliacrilato que liberan un derivado del paclitaxel, 7–hexanoil–taxol o taxano. En el seguimiento a 12 meses de los pacientes tratados con este *stent*, la tasa de reestenosis fue llamativamente alta. Las muestras de las lesiones reestenóticas obtenidas mediante aterectomía direccional mostraron depósitos de fibrina persistentes acompañados de distintos grados de inflamación, culpando al polímero de estos hallazgos indeseados<sup>112</sup>.

Ante la sospecha de que algunos de los polímeros permanentes podían ser responsables en buena medida de los acontecimientos adversos con los SFA, se han propuesto distintos abordajes para eliminar esta variable de la “ecuación SFA”. Algunos dispositivos se basan en modificaciones de la superficie para evitar la necesidad de polímero:

- el *stent* AmazoniaPax® (Minvasys, Francia) libera paclitaxel desde la superficie modificada de un *stent* de cromo–cobalto;
- el *stent* BioFreedom® (Biosensors, Suiza) es un SLB basado en un *stent* de acero inoxidable con modificación microporosa de la superficie;
- el *stent* VESTASync® (MIV Therapeutics, USA) es un SLS de acero inoxidable con superficie de hidroxiapatita nanoporosa;
- el *stent* Yukon® (Translumina, Alemania) es un SLS de acero inoxidable con superficie microporosa;
- el *stent* Janus® (CID, Italia) es un SLT que libera tacrolimus desde pequeños reservorios labrados en la estructura de acero inoxidable, sin presencia de polímero en su diseño original.

Otros dispositivos han empleado polímeros biodegradables:

- Los *stents* de acero inoxidable Biomatrix® (Biosensors, Suiza) y Nobori® (Terumo, Japón), de nitinol Axxess® (Devax, USA) o de cromo–cobalto Xtent® (Xtent, USA) son SLB que emplean PLA como polímero regulador de la liberación de biolimus.
- El ácido poli–DL–láctico–co–glicólico (PLGA) es otro polímero bioabsorbible empleado en los *stents* Nevo® (Cordis, USA) en el interior de reservorios y Synergy® (Boston Scientific, USA) como recubrimiento de la superficie abluminal.

Los *stents* Nobori® han demostrado un efecto favorable en la respuesta vasomotora a los agentes dependientes del endotelio a los 9 meses de la implantación de los dispositivos<sup>158,159</sup>, lo que sugiere una recuperación funcional del endotelio cuando el polímero desaparece. Otros estudios realizados en modelo coronario porcino muestran una adecuada endotelización del *stent* Axxess®, pero con pérdida de la eficacia antiproliferativa en los seguimientos a largo plazo<sup>111</sup>.

### 2.3.3. Fármacos: derivados –limus vs paclitaxel. Otros fármacos

Los SFA de 1ª generación introdujeron los agentes antiproliferativos que se han establecido posteriormente como las 2 familias farmacológicas más usadas en los actuales dispositivos comerciales: el sirolimus y sus derivados inmunosupresores y los taxanos. El sirolimus (rapamicina) es un antibiótico macrólido aprobado para su uso como agente inmunosupresor que previene el rechazo en los trasplantes; se une a la proteína FKBP12, que inhibe la vía mTOR en mamíferos. Su efecto previene la regulación a la baja de la kinasa inhibidora de la división celular p27kip1, bloqueando la división celular entre las fases G1 y S1<sup>232</sup>. El sirolimus tiene un amplio rango de dosis hasta la toxicidad, es más citostático que citotóxico y presenta propiedades antiinflamatorias adicionales a través de la inhibición de la interleucina-2, que reduce la activación de células T y B<sup>104</sup>. Sin embargo, no todos los efectos antiproliferativos de este fármaco son beneficiosos. Fukuda *et al.*<sup>233</sup> demostraron que el sirolimus puede afectar el crecimiento y diferenciación de las EPC. El grupo de las lactonas macrocíclicas comparten los mismos mecanismos de acción descritos para el sirolimus:

- El everolimus es un derivado sintético del sirolimus (40-O-[2-hidroxiethyl]-rapamicina) con una elevada potencia antiproliferativa<sup>234,235</sup>.
- El zotarolimus (ABT-578) incorpora un anillo tetrazólico, que aumenta su lipofilidad y facilita el cruce de las membranas de las CML<sup>236</sup>.
- El biolimus A9 es también un análogo del sirolimus altamente lipofílico<sup>237,238</sup>.
- El tacrolimus, el novolimus y el miolimus completan la familia de los llamados derivados –limus<sup>133,239-248</sup>.

Por otro lado, el paclitaxel es el único agente de su familia que se utiliza actualmente en los SFA tras el fracaso del *stent* QuaDS-QP2<sup>®112,249,250</sup> que empleaba su derivado, taxano. El paclitaxel es un extracto obtenido de la corteza del tejo –*Taxus Brevifolia*– que inhibe la proliferación de las CML y su migración a través de la estabilización de los microtúbulos<sup>251</sup>.

El debate sobre la superioridad de los SFA que emplean fármacos –limus sobre los SLP parece concluir con la publicación de distintos resultados que señalan en la misma dirección, favorable a los primeros. Como se menciona previamente, los SLS y los SLP muestran características histopatológicas distintivas<sup>66,73,85,118</sup>, aunque muchos estudios coinciden en señalar peores resultados en términos globales de reparación vascular y respuesta

vasomotora con los SLP<sup>47,65,130,133,139,252</sup>. El mayor metaanálisis publicado, basado en los datos individuales de pacientes, demuestra que los SLS reducen significativamente el riesgo de reintervención en un 26% y de trombosis del *stent* un 34% respecto a los SLP, sin cambios significativos en el riesgo de muerte o infarto de miocardio<sup>253</sup>. Los SFA de 2ª generación han demostrado incluso mayores diferencias en términos de resultados clínicos a favor de SLE, SLZ y SLB<sup>228,231,238</sup>.

Otros fármacos empleados en distintas formulaciones de SFA incluyen estatinas<sup>254-264</sup>, estrógenos<sup>265,266</sup> o esteroides<sup>267-269</sup>. No todos los fármacos probados han demostrado ser igualmente efectivos y seguros. Así, fármacos de elevada potencia antiproliferativa como la vinblastina se han probado como componentes de nuevos SFA, pero su ventana terapéutica es tan estrecha que resulta difícil evitar un marcado efecto negativo en la reparación vascular<sup>270-272</sup>. En esta dirección y como ocurría en el caso del *stent* QUADS-QP2®, otro SFA en cuya formulación se incorporaba actinomicina D, agente antineoplásico que bloquea la fase S del ciclo celular formando complejos estables con el ADN, fue probado en el ensayo clínico ACTION<sup>273</sup> con resultados negativos caracterizados por necrosis tardía de la capa media y marcado remodelado positivo de la arteria. Los autores de este estudio concluyen que “no todos los fármacos antiproliferativos son efectivos en la prevención de la reestenosis”. Éste es otro ejemplo que demuestra como resultados prometedores en ensayos preclínicos de corto seguimiento (28 días) no necesariamente se traducen en resultados clínicos similares a medio plazo (6 meses) y, por ello, los estudios preclínicos de más larga duración son fundamentales para evaluar respuestas tardías<sup>32</sup>.

Además de la selección del fármaco adecuado, existen distintas variables críticas que condicionan el éxito de un SFA, como la capacidad de liberar el fármaco cargado en el dispositivo y alcanzar las concentraciones deseadas a nivel local en la pared vascular durante el tiempo suficiente. Para garantizar concentraciones adecuadas en el tiempo, los fabricantes de SFA de 1ª generación cargaron los dispositivos con dosis mucho más elevadas de las necesarias. Sin embargo, distintos grupos de investigadores<sup>48,264,274</sup> han demostrado que se puede disminuir la dosis de sirolimus o paclitaxel en distintos SFA sin comprometer su eficacia antiproliferativa, lo que redundaría en una mejora de la reparación vascular. Otro aspecto relevante en el análisis de estos dispositivos es la valoración de la farmacocinética, con confirmación de concentraciones adecuadas del fármaco en la pared vascular y cantidades despreciables de fármaco circulante. Pueden encontrarse datos al respecto con

los distintos fármacos como sirolimus<sup>106</sup>, paclitaxel<sup>275-278</sup>, everolimus<sup>279</sup>, zotarolimus<sup>280</sup> y biolimus<sup>281</sup>. Igualmente, el uso de modelos matemáticos de flujo puede ayudar a valorar la influencia de distintas variables como la posición de los *struts*, el solapamiento de *stents* o las distintas condiciones de flujo sanguíneo. Balakrishnan *et al.*<sup>282</sup> han demostrado que la liberación del fármaco ocurre menos a través del contacto directo entre el *stent* y la pared que a través de la liberación de fármaco soluble provocada por el propio flujo sanguíneo, especialmente en el caso de los *stents* solapados. Finalmente, los resultados de la investigación experimental sólo sirven como una aproximación al escenario clínico, imposible de ser reproducido de forma completa. Por ejemplo, es complejo imitar una característica clínica frecuente: la presencia de placas arterioscleróticas complicadas con una carga significativa de trombo. Hwang *et al.*<sup>283</sup> han caracterizado la influencia del trombo adyacente a los *stents*, que genera grandes variaciones en la concentración de fármaco en la pared arterial pudiendo actuar tanto como favorecedor como bloqueador del depósito del fármaco, dependiendo de la cantidad de trombo y de la geometría del *stent*.

## 2.4. Evaluación de la respuesta vascular a los dispositivos coronarios

### 2.4.1. Características histopatológicas propias del análisis de los SFA en los protocolos preclínicos

En el análisis de los resultados de los SFA hay una serie de características patológicas comunes que deben ser analizadas y comparadas con *stents* control, habitualmente SMC<sup>284</sup>. Los documentos de consenso<sup>32,33</sup> recomiendan analizar las siguientes características:

- **Daño vascular e inflamación:** la evaluación histológica debe incluir una graduación del daño inducido en la pared vascular, mediante la escala de valoración clásica de Schwartz – *injury score* –<sup>29</sup>, que establece 4 intensidades (Tabla 2.2). Sin embargo, este método no es un indicador perfecto del daño, ya que fue descrito y debe ser aplicado sólo a las arterias musculares y no a las arterias elásticas. La escala de Schwartz analiza precisamente la profundidad del daño vascular pero no tiene en cuenta el grado de afectación circunferencial o su propagación longitudinal. Para solventar estas limitaciones, Gunn *et al.* proponen una escala modificada de 5 valores<sup>285</sup> que analiza cada *strut* individual en las secciones examinadas (Tabla 2.2). La Figura 2.10 ilustra los distintos grados de daño vascular. El análisis del daño vascular inducido debe también

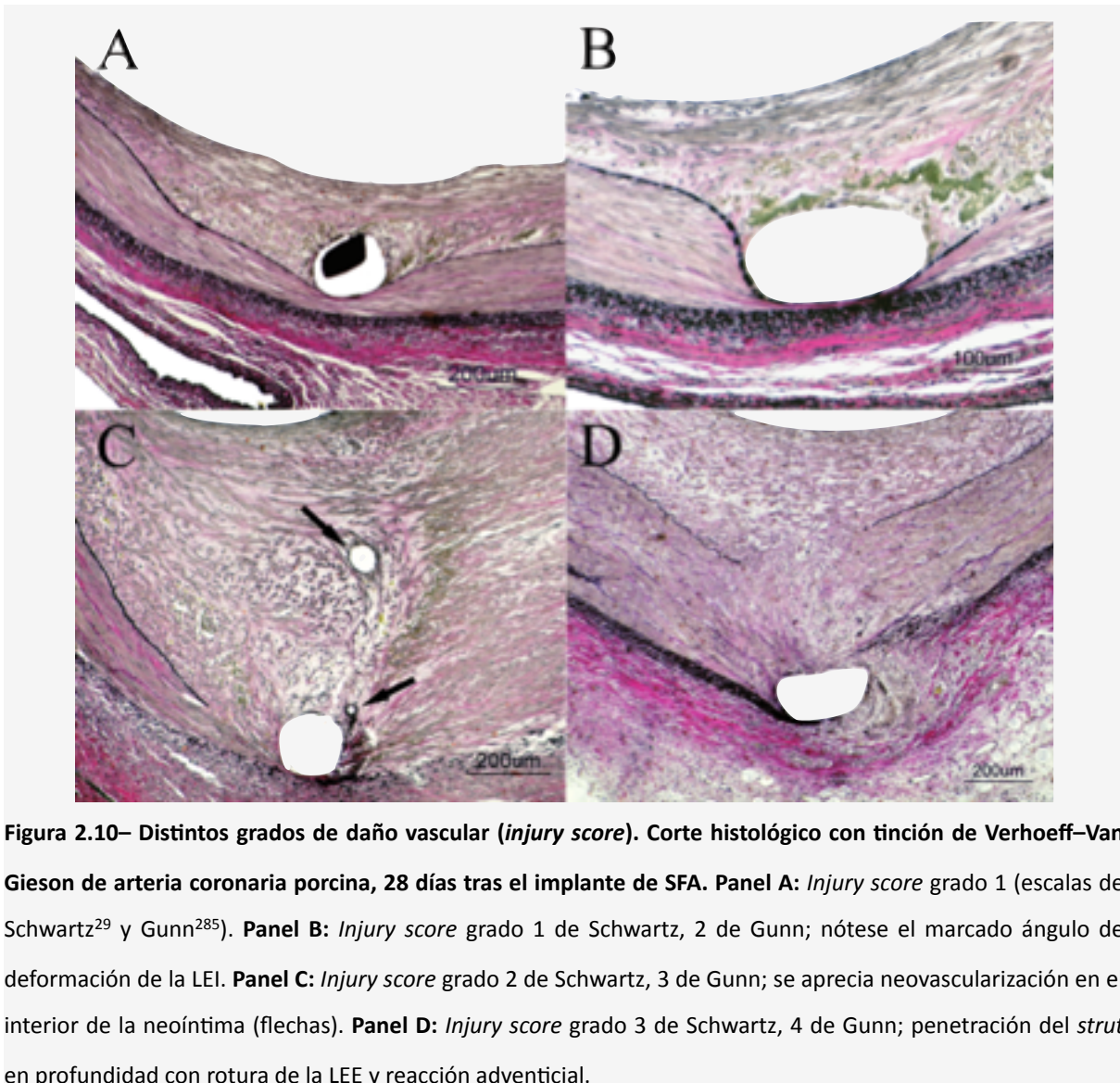
incluir una descripción de la actividad inflamatoria (presencia, tipos celulares, localización y profundidad) y una cuantificación del grado de inflamación global del vaso, así como de la localización adventicial, media, neointimal y alrededor de los *struts*. Se han propuesto múltiples escalas de valoración por los distintos grupos de investigación<sup>98,107,205,286</sup> con gran heterogeneidad en sus criterios (Tabla 2.3). Del mismo modo que sucede con las escalas del daño vascular, los datos son analizados de forma semicuantitativa, por lo que la presentación y análisis de éstos debe ser realizada considerando la variable como categórica. También se recomienda obtener mediciones cuantitativas de la densidad celular en el caso de las escalas de inflamación.

Tabla 2.2– Escalas de valoración del daño vascular (*injury score*), según afectación de láminas elásticas interna (LEI) y externa (LEE)

Grado	Escala de Schwartz <sup>29</sup>	Escala de Gunn <sup>285</sup>
0	Sin deformación LEI ni capa media	Sin deformación
1	LEI lacerada, media comprimida	LEI deformada <45°
2	LEI y media laceradas, sin ruptura LEE	LEI deformada >45°
3	Ruptura de todas las capas hasta afectar la adventicia	Ruptura de LEI
4	–	Ruptura de LEE

Tabla 2.3– Escalas de valoración de la inflamación

Autor	Hofma <sup>205</sup>	Kornowski <sup>286</sup>	Cheneau <sup>98</sup>	Carter <sup>107</sup>
Grado	( <i>Adventicia</i> )	( <i>Peri-strut</i> )	( <i>Peri-strut</i> )	( <i>Peri-strut</i> )
0	Sin inflamación	Sin inflamación	Sin células	Sin inflamación
1	Infiltrado ligero	Infiltrado ligero, no circunferencial	1–10 células por <i>strut</i>	Escaso infiltrado
2	Infiltrado difuso	Infiltrado moderado, no circunferencial	11–20 células por <i>strut</i>	Infiltrado <i>peri-strut</i> no circunferencial, 25–50% área arterial
3	Infiltrado severo, granulomas, afecta íntima	Infiltrado denso, circunferencial	>20 células por <i>strut</i>	Infiltrado <i>peri-strut</i> circunferencial, 25–50% área arterial



**Figura 2.10– Distintos grados de daño vascular (*injury score*). Corte histológico con tinción de Verhoeff–Van Gieson de arteria coronaria porcina, 28 días tras el implante de SFA. Panel A: *Injury score* grado 1 (escalas de Schwartz<sup>29</sup> y Gunn<sup>285</sup>). Panel B: *Injury score* grado 1 de Schwartz, 2 de Gunn; nótese el marcado ángulo de deformación de la LEI. Panel C: *Injury score* grado 2 de Schwartz, 3 de Gunn; se aprecia neovascularización en el interior de la neoíntima (flechas). Panel D: *Injury score* grado 3 de Schwartz, 4 de Gunn; penetración del *strut* en profundidad con rotura de la LEE y reacción adventicial.**

- **Depósitos de fibrina/fibrinoide, trombos y hemorragia** (Figuras 2.6, 2.7 y 2.11): cuando cualquiera de estas formas de colecciones hemáticas es persistente, se considera señal de reparación retrasada<sup>67,73,85,95,101,102,112,127,252,287</sup>. Su presencia debe ser descrita y cuantificada, proponiéndose una escala semicuantitativa para estandarizar las mediciones<sup>105</sup> (Tabla 2.4).

Tabla 2.4– Escala de valoración del depósito de fibrina

Grado	Escala de Suzuki <sup>105</sup>
1	Depósito de fibrina focal residual en cualquier lugar de la arteria o moderado alrededor del <i>strut</i> . Involucra <25% de la circunferencia arterial
2	Depósito moderado de fibrina en >25% de la circunferencia arterial o depósito severo alrededor de o entre los <i>struts</i> en <25% de la circunferencia arterial
3	Depósito severo de fibrina en >25% de la circunferencia arterial

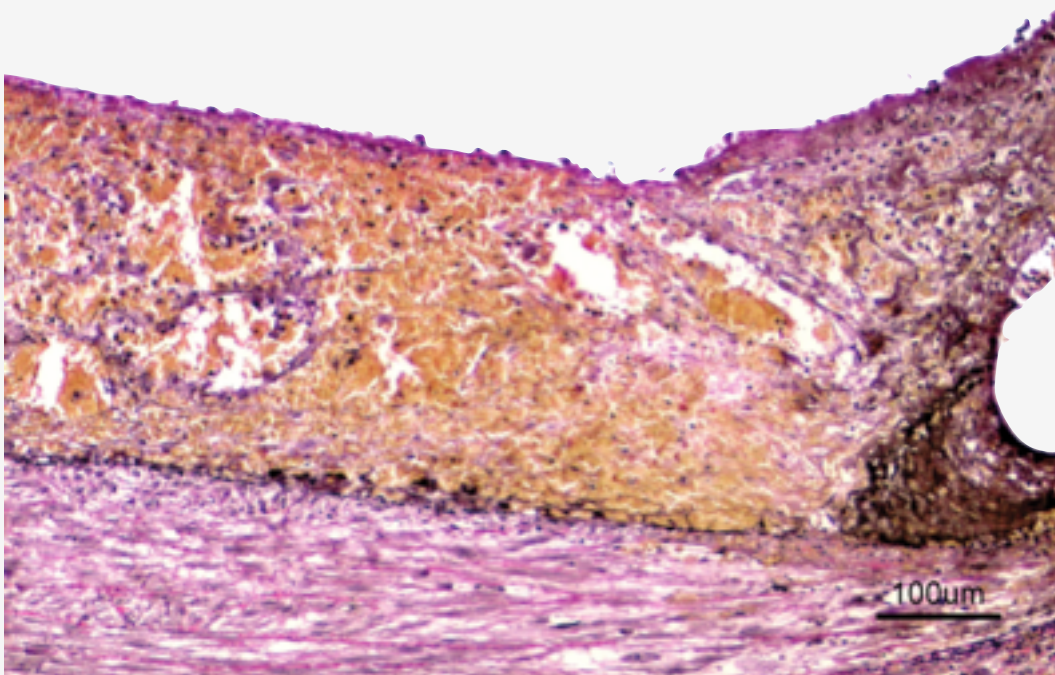
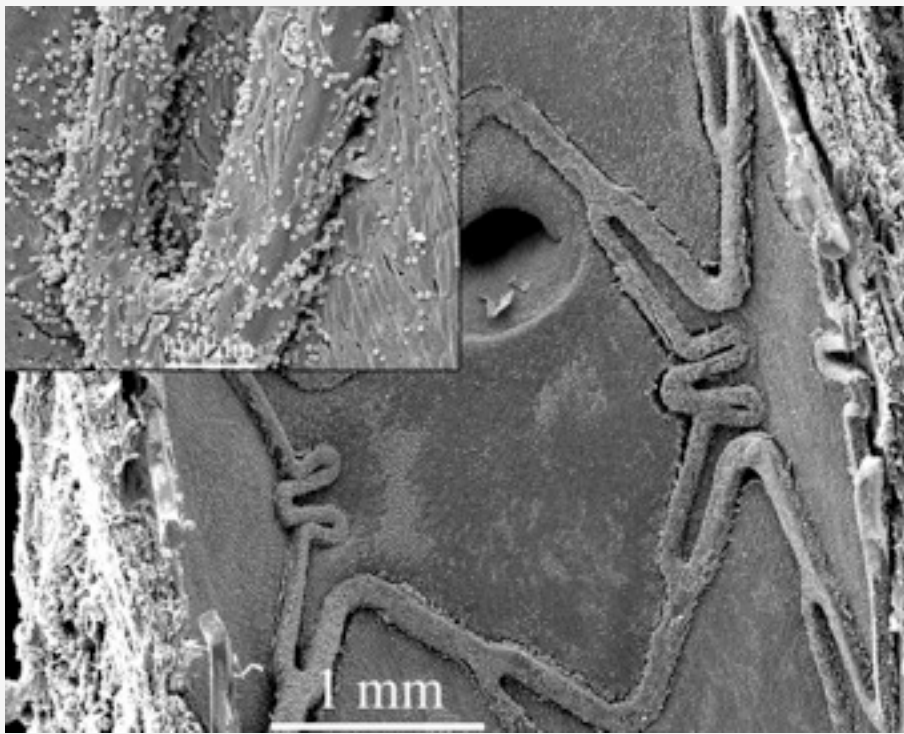


Figura 2.11– Corte histológico con tinción de Verhoeff–Van Gieson de arteria coronaria porcina, 28 días tras el implante de SFA. Hemorragia intramural y re-endothelialización incompleta.

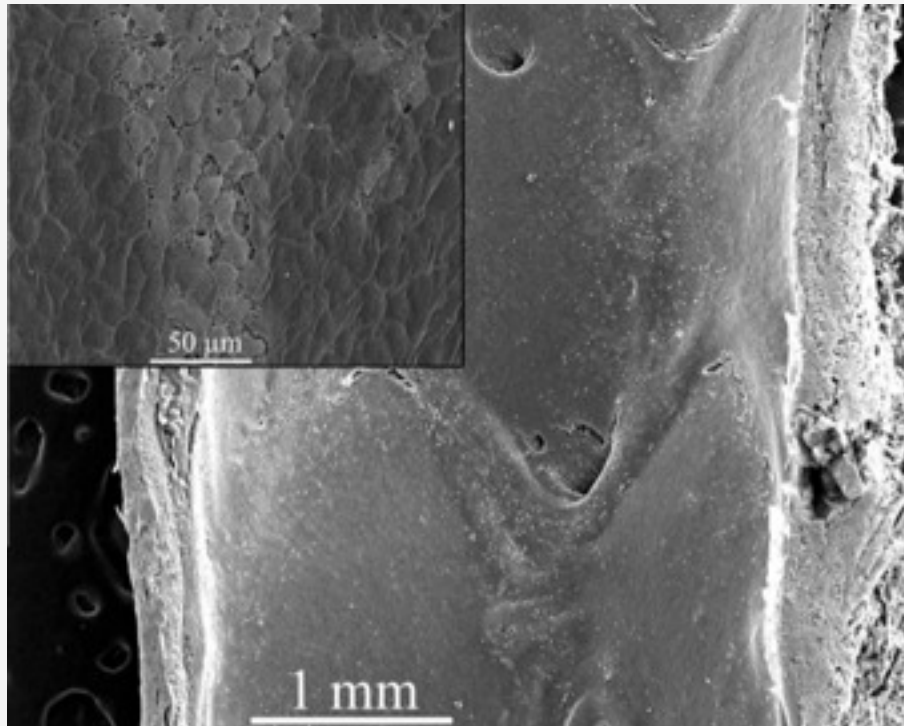
- **Endotelización** (Figuras 2.12 y 2.13): el recubrimiento endotelial debe ser registrado y calificado como ausente, parcial o completo en todas las secciones. El análisis semicuantitativo propuesto por Suzuki *et al.*<sup>105</sup> valora en 3 grados la cobertura endotelial del porcentaje de la circunferencia (1, <25%; 2, 25%–75%; 3, >75%). Esta escala resulta probablemente inadecuada para el análisis de muchas de las muestras obtenidas, que presentan cobertura endotelial por encima del 75% en la mayoría de las ocasiones, excepto para las obtenidas en los primeros días tras la implantación de *stents*. Cabe señalar que existe cierta confusión en la terminología empleada en la literatura cuando se habla de “cobertura tisular” de la estructura metálica del



*stent*<sup>202,288-291</sup>. Esto es particularmente importante en el análisis de las fases más precoces de la reparación vascular tras el implante del *stent* porque es muy frecuente observar fibrina o diferentes células inflamatorias cubriendo la superficie del *stent*, y no células endoteliales.



**Figura 2.12–** Imagen SEM de arteria coronaria porcina, 3 días tras el implante de SFA. El *stent* aparece recubierto. **Esquina superior izquierda:** El detalle de alta magnificación demuestra que sobre el *strut* son pocas las células endoteliales visibles.



**Figura 2.13**– Imagen SEM de arteria coronaria porcina, 7 días tras el implante de SFA. Tanto los espacios entre los *struts* como éstos mismos aparecen completamente recubiertos. **Esquina superior izquierda:** Se aprecia el patrón de empedrado característico de las células endoteliales, de forma poligonal, con núcleo prominente; sin embargo, las uniones intercelulares son laxas.

- **Angiogénesis** (Figura 2.10): debe registrarse y valorarse, en una escala de 4 grados, la angiogénesis presente en adventicia, media y neoíntima. Alternativamente, puede ofrecerse un valor cuantitativo como el número y tamaño de vasos por unidad de área o el número de células que expresan VEGF<sup>292,293</sup>.
- **Aposición del *stent* y valoración de la capa media** (Figuras 2.6 y 2.7): otros datos relevantes son la aposición de la estructura metálica a la pared del vaso (proporción de *struts* en contacto con la pared) y la descripción del tejido adyacente, incluyendo adelgazamiento de la capa media, pérdida de celularidad e hialinización<sup>33</sup>. Como se ha descrito previamente, la necrosis de la media puede aparecer en el análisis de las muestras de arterias tratadas con *stent*<sup>44,66,67,85,273</sup>, y representa el mayor grado de daño vascular que un dispositivo puede inducir al vaso, habitualmente involucrando reacciones tóxicas al fármaco.
- **Evaluación de la adventicia:** el análisis histológico no debe circunscribirse a las capas interiores del vaso en busca de problemas relacionados con la seguridad, sino que debe

extenderse también a la capa más externa. Son varios los estudios que han relacionado la aparición de arteriosclerosis coronaria y desarrollo de neoíntima con un número elevado de *vasa vasorum*, tanto en la adventicia como dentro de la placa<sup>294,295</sup>. La distribución y cuantificación de estos pequeños vasos ha sido analizada por distintos autores<sup>295-298</sup>. Otra característica que debe ser valorada en la profundidad de la arteria es la respuesta inflamatoria presente<sup>62,65-67</sup>. En algunos estudios es frecuente encontrar reacciones granulomatosas intensas (*granulomata*) que afectan a todo el vaso. La exclusión del análisis final de estas muestras es aceptada aunque su significado es incierto, debiendo en cualquier caso anotar el número de vasos afectados que no deberían superar el 10% de las muestras analizadas<sup>33</sup>.

- **Histomorfometría cuantitativa:** este análisis resulta fundamental en la evaluación terapéutica. Las medidas de todas las secciones deben incluir las áreas de capa media, el interior de la lámina elástica interna (LEI), interior de la lámina elástica externa (LEE), área luminal y área en el interior del *stent*. Los principales parámetros de eficacia, el área neointimal y su espesor, pueden calcularse a partir de las citadas áreas. Pero además, algunos detalles relacionados con la seguridad pueden analizarse cuantitativamente. La separación de la estructura metálica del *stent* de la LEI, malposición del *stent*, es un marcador de necrosis subyacente y debe ser medido y descrito. El remodelado debe ser calculado como la relación entre las áreas de LEE en el centro del *stent* y en la región proximal al *stent*. Esta variable es particularmente importante puesto que ciertos datos señalan que algunas respuestas tóxicas a los SFA pueden aparecer como remodelado positivo tardío del vaso tratado<sup>67,112,118,297</sup>.
- **Histopatología miocárdica:** el análisis histopatológico del tejido directamente suplido por los vasos tratados debe ser realizado con especial atención a la presencia de infartos de miocardio. Las reacciones tóxicas o de hipersensibilidad también pueden aparecer como consecuencia de la liberación del fármaco al torrente sanguíneo o de la degradación de componentes del dispositivo.

#### 2.4.2. Técnicas de imagen en la valoración de la reparación vascular

La técnica histológica sigue siendo el método de referencia en el análisis de los resultados de estos dispositivos. Las arterias tratadas con *stent* previo lavado con suero fisiológico o suero tamponado –*phosphate buffered saline*– (PBS) se fijan in situ mediante perfusión a presión

de 100 mmHg con formol al 10% o paraformaldehído al 4%, siendo posteriormente introducidas en la solución de fijación para permitir una rápida y completa percolación de toda la arteria<sup>27</sup>. Transcurridas 24–48 horas las arterias son procesadas para embeberlas en medios plásticos o resinas epoxy, lo cual permite mediante el uso de un microtomo rotacional con cuchilla de carburo de tungsteno obtener secciones de los segmentos proximal, medio y distal del *stent*. Así mismo, se recogen muestras de los segmentos arteriales no tratados (proximal y distal), que son incluidas en parafina con el fin de determinar el impacto en los tejidos peri-*stent*. Las tinciones más comúnmente utilizadas para realizar el análisis histopatológico son Hematoxilina–Eosina (HE), elastina de Van Gieson, tricrómico de Masson y pentacrómico de Movat. La proliferación celular puede ser analizada con el empleo de la técnica inmunohistoquímica mediante la identificación de bromodeoxiuridina –BrdU– o antígeno Ki–67. Para analizar respuestas celulares más específicas, principalmente relacionadas con el endotelio, se recurre a la detección de distintos antígenos como PECAM–1, VEGF, trombomodulina o expresión de eNOS<sup>33</sup>. La expresión de los marcadores de madurez endotelial también puede analizarse mediante microscopía confocal con muestras *en face* (habitualmente, mitades del *stent* obtenidas de la bisección longitudinal del espécimen completo)<sup>47,134,299</sup>. La tinción azul de Evans es un marcador específico de permeabilidad endotelial: su persistencia en el exterior de la pared vascular después de la perfusión intravascular señala la inmadurez de las uniones intercelulares endoteliales<sup>101,141,300</sup>.

La microscopía electrónica de barrido –*scanning electron microscopy*– (SEM) de los *stents en face* tras la bisección longitudinal permite analizar precisamente la endotelización de los SFA, caracterizando las células y otras estructuras depositadas sobre la superficie luminal de la arteria. La fijación, procesado y análisis de las muestras se ha descrito previamente<sup>101</sup>. En los documentos de consenso se recomienda realizar el análisis mediante SEM de 3 o más muestras para valorar la recuperación endotelial<sup>33</sup>. Puesto que la cobertura de la estructura metálica puede incluir células inflamatorias o componentes sanguíneos distintos de las células endoteliales, se debe realizar un análisis detallado que permita caracterizar las poblaciones celulares observadas. Para ello, se recomienda examinar las imágenes de distintos segmentos del *stent* con alta magnificación. Las células endoteliales son fácilmente reconocibles por su morfología poligonal, con bordes bien definidos entre ellas, núcleos prominentes de tamaño irregular y altamente orientadas exhibiendo un patrón en empedrado, apareciendo como una monocapa confluyente<sup>301</sup>.

Las técnicas de imagen *in vivo* pueden mejorar la evaluación de los SFA puesto que permiten analizar en el mismo animal la evolución de la reparación vascular en distintos momentos, lo que reduce el número de individuos necesarios en cada punto temporal. La realización de angiografía de seguimiento tiene un gran valor para la evaluación de estos dispositivos, ya que permite la medición de parámetros como la pérdida tardía, una de las variables más empleadas en el análisis de la eficacia. También puede revelar problemas serios como la trombosis del *stent*. Sin embargo, ofrece poca información acerca de la endotelización, reparación vascular o actividad inflamatoria. La angiografía coronaria cuantitativa (QCA) permite la valoración funcional global del proceso de cicatrización, analizando la respuesta vasomotora a distintos agentes vasodilatadores. En la investigación preclínica se han utilizado distintos fármacos vasodilatadores endotelio-dependientes como la serotonina<sup>58,302,303</sup>, bradikina<sup>58,302</sup> o la sustancia P<sup>132,162</sup>. En este grupo también se encuentra la ACh, uno de los agonistas más usados en la investigación clínica; sin embargo, existe debate acerca de lo apropiado de su uso en el modelo porcino puesto que las arterias de esta especie parecen presentar una cantidad limitada de receptores muscarínicos, por lo que la ACh no induciría suficiente vasodilatación<sup>133,304,305</sup>. Sin embargo, otros autores han demostrado diferencias significativas entre distintos SFA utilizando ACh como vasodilatador dependiente del endotelio en el modelo porcino<sup>161,306</sup>. Puesto que el segmento arterial tratado con *stent* es rígido, no es posible observar cambios en el diámetro en esta zona tras la administración de vasodilatadores, que sí se aprecian en los segmentos arteriales proximal y distal al *stent*. Las mediciones suelen realizarse mediante QCA en segmentos separados al menos 10–15 mm del *stent*, en estado basal, tras vasodilatación dependiente del endotelio y en la máxima vasodilatación con nitroglicerina o nitroprusiato. Del mismo modo que los vasos epicárdicos pueden cambiar su diámetro en respuesta a distintos estímulos, el lecho microvascular (vasos de resistencia) puede variar su tamaño<sup>133,139,156,162</sup>. Una estimación *in vivo* simple de la respuesta vasomotora de la microvasculatura puede obtenerse analizando en la angiografía el *TIMI frame count*<sup>307</sup>, cuenta de imágenes necesarias para el relleno completo de la arteria epicárdica. Este parámetro se ha correlacionado con mediciones más sofisticadas del estado microvascular, como la reserva de flujo coronario por guía Doppler<sup>308</sup>.

Los estudios angiográficos de seguimiento pueden complementarse con otras técnicas de imagen invasiva. El estudio ecográfico IVUS, que se utiliza ampliamente en los estudios clínicos humanos, también es una herramienta muy empleada en la investigación preclínica para cuantificar la formación neointimal, pudiendo ofrecer estimaciones volumétricas.

Aunque se han probado distintos métodos de caracterización tisular basada en IVUS –análisis de la señal reflejada difusa (*backscatter*), histología virtual–, la correlación con los resultados histológicos no es buena<sup>309-312</sup>. Tampoco el IVUS es la mejor técnica para valorar la presencia de fibrina o trombo, ni tiene la resolución espacial necesaria para determinar si los *struts* están cubiertos o descubiertos. En cambio, el IVUS parece una técnica adecuada para analizar el proceso de biodegradación de los *stents* metálicos reabsorbibles<sup>313</sup> o de las endoprótesis bioabsorbibles basadas en PLA<sup>314</sup>.

La angioscopia, otra técnica invasiva de imagen, ha mostrado mejores resultados para la detección de trombo y análisis de la cobertura de los *struts*<sup>132,289,300,315-318</sup>. Sin embargo, su utilidad está limitada por la naturaleza semicuantitativa de los resultados y su incapacidad para discriminar entre células endoteliales y otras estructuras que cubren los *struts*.

El análisis en vivo de la re–endotelización de los *stents* ha mejorado con la tomografía de coherencia óptica, OCT. La OCT intravascular (análisis en el dominio del tiempo) se vale de una guía con fibra óptica que emite luz y registra su reflejo mientras es retirada a lo largo de la arteria. La resolución axial varía entre 12 y 18  $\mu\text{m}$  (la resolución del IVUS está entre 150 y 200  $\mu\text{m}$ ), mientras que la resolución lateral oscila entre 20 y 90  $\mu\text{m}$  (150–300  $\mu\text{m}$  en IVUS). En cambio, su penetración tisular es más reducida que la del IVUS: 1–3 mm vs 4–8 mm)<sup>319</sup>. La OCT muestra una elevada correlación con los valores derivados de histología del área neointimal o su espesor<sup>320-322</sup> y una resolución axial que permite clasificar a los *struts* como cubiertos o descubiertos<sup>288,290,291,323</sup>. Sin embargo, carece de especificidad al determinar si la cobertura de los *struts* está constituida por células endoteliales u otro tipo de estructuras<sup>321,322</sup>. Finalmente, la OCT tiene un gran valor para el análisis del proceso de reabsorción de las endoprótesis bioabsorbibles basadas en PLA<sup>314,324</sup>. El análisis de la señal en el dominio de la frecuencia (OFDI) permite obtener una mayor frecuencia de imágenes por segundo a velocidades de retirada más rápidas, y ligeras mejorías en la resolución axial (10–15  $\mu\text{m}$ ), lateral (20–40  $\mu\text{m}$ ) y profundidad de penetración tisular (2–3.5 mm). Y lo que es más importante, el análisis de la intensidad de la señal con OFDI permite discriminar las características de la cobertura sobre los *struts*<sup>325</sup>: las señales ópticas de la cobertura rica en fibrina y de la neointima madura son significativamente distintas, lo que permite una adecuada discriminación (área bajo la curva en el análisis ROC, 0.86)<sup>326</sup>.

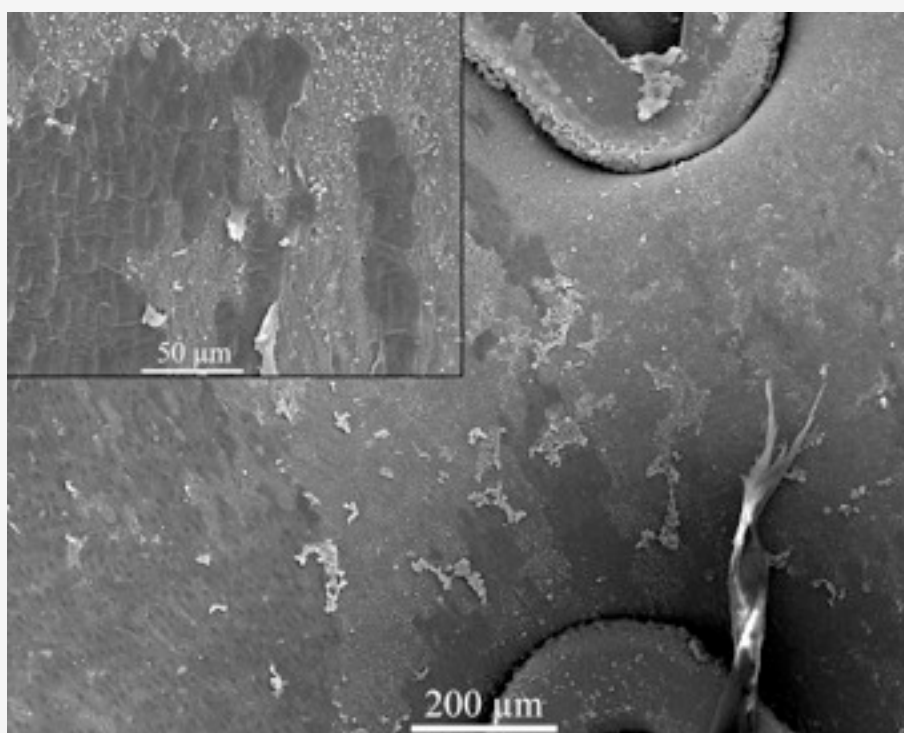
Aunque todas estas técnicas *in vivo* no son especialmente lesivas, debe tenerse en cuenta que el simple avance de una guía de angioplastia puede inducir daños en la delicada cobertura endotelial que pueden prolongarse durante al menos 5 días en el modelo animal<sup>327</sup>. Su potencial contribución a los resultados finales debe ser tenida en cuenta.

## 2.5. Hacia el modelo preclínico perfecto: modelos de animal enfermo

Una de las mayores limitaciones de la investigación preclínica en este campo sigue siendo la diferencia significativa entre animales jóvenes y sanos y el escenario arteriosclerótico que presentan los envejecidos pacientes humanos. Para solventar este problema existen múltiples modelos de animal enfermo, como los de ratón aterosclerótico: ratones con deficiencia de apolipoproteína E (ApoE  $-/-$ ), deficiencia de receptor de lipoproteínas de baja densidad  $-LDL-$  (LDLr  $-/-$ ) o el ratón transgénico ApoE\*3 Leiden (E3L)<sup>26</sup>. En el campo de los grandes mamíferos, el número de modelos, tanto genéticamente modificados como de alta susceptibilidad natural, es más escaso. Los conejos Watanabe  $-WHHL-$  son una cepa variante de los conejos blancos de Nueva Zelanda, desprovistos del receptor para LDL<sup>328</sup>. Tanto las características del daño vascular tras ICP como la respuesta en este modelo son casi idénticas a la observadas en pacientes humanos. Los cerdos con hipercolesterolemia familiar Rapacz (LDLr  $-/-$ ) pueden mostrar 3 alotipos de deficiencias relacionadas con el receptor de LDL, conocidas como Lpb5, Lpr1, and Lpu1<sup>329</sup>. Estos animales sufren hipercolesterolemia incluso alimentados con dietas de bajo contenido graso, sin colesterol, y desarrollan placas ateroscleróticas complicadas que son muy semejantes a las lesiones ateroscleróticas avanzadas encontradas en humanos<sup>330</sup>.

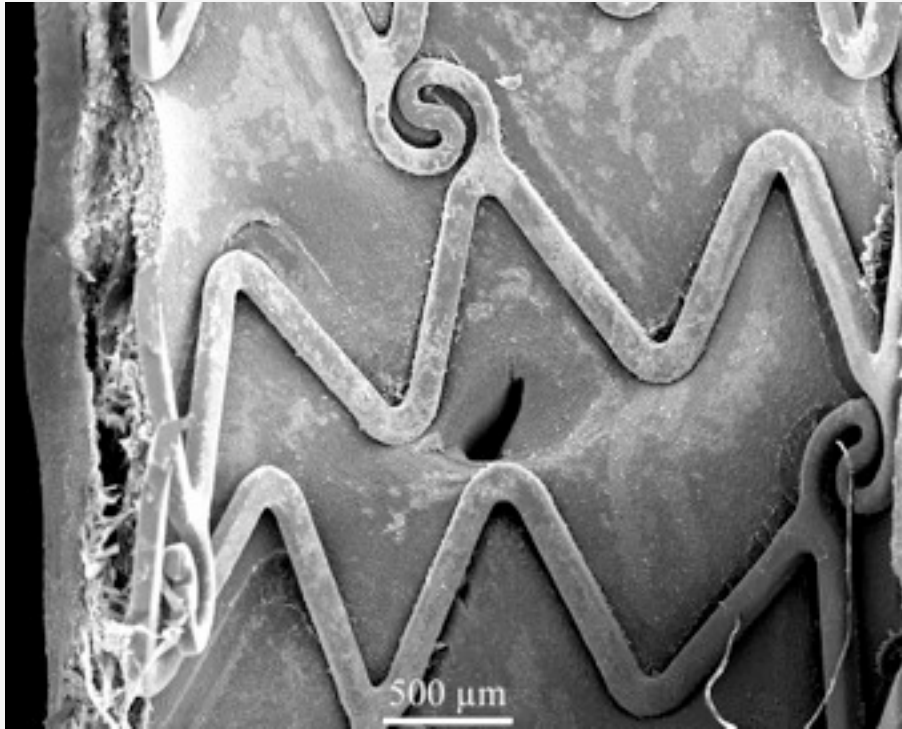
La denudación del endotelio, incluso en animales sanos, es un método simple para inducir la aparición de lesiones ateroscleróticas. Por sí sola, es frecuentemente usada para analizar la respuesta vascular a distintos dispositivos, tratamientos o para profundizar en el conocimiento de los mecanismos etiopatogénicos<sup>47,52,53,202</sup>. El procedimiento más empleado para llevar a cabo la denudación endotelial endovascular es realizar dilataciones repetidas con balones de Fogarty o balones de ICP de las arterias ilíacas. Aunque la simple implantación de un *stent* montado en balón puede inducir una denudación endotelial significativa, hay que considerar que en estos casos aún son visibles áreas de recubrimiento endotelial intacto entre los *struts*, como se ilustra en las Figuras 2.14 y 2.15. En cualquier

caso, se debe valorar que la denudación con balón no sólo afecta al endotelio sino que daña toda la arteria<sup>331</sup>. Por otro lado, es posible inducir con relativa facilidad hipercolesterolemia y aterosclerosis en conejos sanos mediante una dieta aterogénica ( $\geq 0.15\%$  colesterol y 6% aceite de cacahuete)<sup>51</sup>. Este modelo de animal hipercolesterolémico sirve de base para distintos experimentos<sup>258,293,332-336</sup>. Con el objetivo de mejorar la similitud con la enfermedad humana, algunos autores utilizan además la denudación endotelial mediante inflado de balón o con secado por aire<sup>337</sup>, en el llamado “modelo animal de doble lesión”<sup>50,54,134,269,334,338-342</sup>. Tanto los cerdos domésticos como los *minipigs* son susceptibles de desarrollar hipercolesterolemia y aterosclerosis tras una dieta adecuada<sup>58,343</sup>. Sin embargo, el modelo de cerdo doméstico arteriosclerótico requiere mucho más tiempo para el desarrollo de la enfermedad, precisando al menos 9 meses en comparación con los 2 meses necesarios para observar placas ateroscleróticas en el conejo. Además, la tasa de mortalidad de los cerdos ateroscleróticos es muy alta puesto que la enfermedad coronaria inducida condiciona un elevado riesgo de muerte súbita, como la que se aprecia en los pacientes humanos.



**Figura 2.14– Imagen SEM de arteria coronaria porcina, inmediatamente tras el implante de *stent*.** Se aprecian áreas de denudación endotelial significativa (zonas claras), pero con abundantes áreas de endotelio preservado (zonas más oscuras).





**Figura 2.15**– Imagen SEM de arteria coronaria porcina, inmediatamente tras el implante de *stent*. Detalle de endotelio denudado (áreas claras) entre los *struts* del *stent*, con zonas de endotelio preservado mostrando el característico patrón en empedrado.

Entre los factores de riesgo que favorecen el desarrollo de arteriosclerosis, enfermedad coronaria y reestenosis intra-*stent* se encuentra la diabetes<sup>9,10</sup>. De hecho, incluso los mejores SFA de 2ª generación en términos de prevención de la reestenosis, como el SLE, muestran resultados subóptimos en los pacientes diabéticos<sup>344</sup>. Por ello, la inducción de diabetes en los animales de investigación con inyección de aloxano en conejos<sup>345</sup> o estreptozotocina en cerdos<sup>346-348</sup>, se ha utilizado para analizar la influencia de esta patología en la progresión de la aterosclerosis y comprender sus mecanismos íntimos. Sin embargo, no hay datos publicados sobre el empleo del modelo de conejo diabético para analizar la respuesta a dispositivos endovasculares y son escasos los datos disponibles empleando el modelo de cerdo diabético. Carter *et al.*<sup>349</sup> observaron que el engrosamiento neointimal y el grado de reestenosis intra-*stent* eran similares en este modelo respecto a los obtenidos en cerdos normales. Además, la tasa de muerte súbita debido a la trombosis del *stent* alcanzó el 45% de los individuos. Llano *et al.*<sup>350</sup> demostraron que los cerdos diabéticos e hipercolesterolémicos presentan grandes diferencias en términos de reestenosis y reparación vascular (re-endotelización e inflamación persistente) con SLP en comparación con SMC. La tasa de mortalidad a corto plazo en este grupo es menor del 10%, lo que

probablemente refleja mejores tratamientos antiplaquetarios. En cualquier caso, estos resultados resaltan el concepto de alta vulnerabilidad de los animales enfermos, lo que les convierte en un modelo complejo para analizar dispositivos coronarios.

En conclusión, aunque los últimos resultados resultan prometedores en cuanto a la consecución de mejores modelos animales, de mayor similitud al escenario clínico, aún se recomiendan por consenso los modelos de animales sanos para llevar a cabo los análisis preclínicos<sup>33</sup>.

## 2.6. Nuevos dispositivos para el tratamiento de la enfermedad coronaria

El conocimiento acumulado en este campo ha permitido el desarrollo de nuevos conceptos en el área de los SFA. De esta manera, se han desarrollado *stents* combinados (o duales) en busca del mejor balance entre las propiedades antiproliferativas y de reparación vascular. El *stent* Combo<sup>®</sup> (OrbusNeich, USA) combina la liberación de sirolimus desde la superficie abluminal con la capacidad de captura de EPCs que presenta el *stent* Genous<sup>®</sup>, recubierto de anticuerpos anti CD34. Nakazawa *et al.*<sup>299</sup> describen una tasa de endotelización significativamente mayor con el *stent* Combo<sup>®</sup> que con SLS, tanto a los 3 como a los 14 días. De hecho, la tasa de endotelización de este dispositivo a los 14 días no es significativamente distinta de la de un *stent* Genous<sup>®</sup> ( $82 \pm 8$  vs  $98 \pm 2\%$ ). Resultados similares en términos de endotelización se describen para el dispositivo combinado que libera paclitaxel y simvastatina (Irist<sup>®</sup>, Iberhospitex)<sup>264</sup>. Otros autores han descrito resultados prometedores con SFA duales combinando fármacos antiproliferativos clásicos con agentes antiplaquetarios como la combinación de sirolimus y triflusal<sup>351,352</sup>, cilostazol y paclitaxel<sup>353</sup> o sirolimus con el hipolipemiente probucol<sup>354</sup>.

Ya se han descrito los interesantes resultados de los *stents* recubiertos de polímero reabsorbible o sin polímero, tanto en términos de eficacia como de seguridad. El siguiente paso lógico en esta carrera conduce a la desaparición de dispositivos permanentes, apareciendo las endoprótesis totalmente biodegradables (andamiaje o *scaffolding* temporal). En este campo se han propuesto dos conceptos fundamentales, las endoprótesis metálicas y las poliméricas. El mejor ejemplo del primer grupo lo constituye el *stent* metálico reabsorbible de Magnesio AMS<sup>®</sup> (Biotronik, Alemania). Tras los resultados positivos obtenidos en el programa preclínico<sup>313,355-359</sup>, el primer ensayo clínico en humanos

PROGRESS AMS<sup>222</sup> no obtuvo los resultados esperados, con una necesidad de nuevos procedimientos de revascularización que alcanzó el 45% a los 12 meses y datos que señalaban pérdida de fuerza radial antes de lo previsto. Después de realizar cambios estructurales en el diseño y en la composición de la estructura metálica así como la adición de un polímero bioabsorbible para la liberación controlada de fármacos antiproliferativos, apareció la siguiente generación de este dispositivo llamada DREAMS<sup>®</sup> (*Drug Eluting Absorbable Metallic Stent*) que ha demostrado resultados positivos en el primer ensayo clínico en humanos<sup>360</sup>. Respecto a las endoprótesis bioabsorbibles poliméricas, el *stent* REVA<sup>®</sup> de policarbonato de tirosina se degrada en agua, dióxido de carbono y etanol, además de de-amino-tirosil-tirosina, que se excreta finalmente del cuerpo<sup>238,361</sup>. Los datos disponibles en la literatura sobre los resultados preclínicos y clínicos de este dispositivo son escasos<sup>220,361</sup>, pero la tasa de reestenosis inicial parece demasiado alta a los 4–6 meses. De nuevo, se está modificando el diseño del dispositivo añadiendo un derivado –limus en busca de mejor eficacia. El sistema Absorb BVS<sup>®</sup> (Abbott Vascular, USA), basado en una estructura de PLA y una matriz de cobertura poli-D,L-lactato que controla la liberación de everolimus, ha demostrado resultados positivos en modelos animales<sup>362</sup>. Onuma et al<sup>324</sup> demuestran que la estructura de la endoprótesis en arterias coronarias porcinas sigue siendo visible por OCT a los 2 años, aunque los *struts* aparecen reabsorbidos en gran medida, lo que demuestran por técnicas histológicas y por cromatografía de permeación en gel. A los 3 y 4 años, tanto la OCT como la histología confirman la completa integración de su estructura en la pared arterial. Este dispositivo se ha empleado en ensayos clínicos humanos demostrando aceptables resultados en términos de eficacia (pérdida luminal tardía de 0.44 mm, similar a los SLP pero aún lejana de la cifra obtenida con SLE, 0.11 mm)<sup>363</sup>. En los seguimientos más largos, hasta los 2 años, en los ensayos clínicos humanos se comprueba que la reabsorción del endoprótesis por OCT, la recuperación de la respuesta vasomotora y la eficacia antiproliferativa mantenida, sin evidencia de trombosis tardía del *stent*<sup>314</sup>. Asimismo, se ha descrito una interesante observación: el crecimiento luminal tardío debido a reducción en la carga de placa sin remodelado del vaso. La nueva generación de este dispositivo, BVS<sup>®</sup> Revisión 1.1, que utiliza la misma base polimérica con un cambio en el diseño de la endoprótesis para aumentar su fuerza radial, ha demostrado unos excelentes resultados en términos de pérdida luminal tardía de 0.19 mm<sup>238</sup>. A la vista de los plazos de reabsorción de estos dispositivos, gana importancia la necesidad de extender los plazos de seguimiento en el análisis preclínico.

En línea con los dispositivos totalmente reabsorbibles, el concepto de aplicación local de fármacos antiproliferativos sin necesidad de dispositivos permanentes, mediante balones liberadores de fármaco ha ganado fuerza. Utilizando fundamentalmente paclitaxel, son varios los balones liberadores de paclitaxel (BLP) que han demostrado su eficacia en la investigación preclínica<sup>364-368</sup>. Estos resultados se han traducido en una elevada eficacia en el tratamiento de una situación clínica realmente adversa, la reestenosis intra-*stent*<sup>369</sup>. Sin embargo, no todos los dispositivos disponibles comercialmente ofrecen los mismos resultados ni en la investigación preclínica<sup>370</sup> ni en los ensayos clínicos<sup>371</sup>. De cualquier manera, como cualquier dispositivo con capacidad antiproliferativa, se observan datos de retraso en la re-endotelización del vaso tratado<sup>370</sup> y respuestas vasomotoras anormales<sup>306</sup>.

# ***HIPÓTESIS Y OBJETIVOS***



### 3. HIPÓTESIS

A la luz de las observaciones presentadas en la revisión bibliográfica del tema, parece razonable argumentar que los nuevos dispositivos para el tratamiento endovascular de la enfermedad coronaria, concebidos para solucionar el problema de la reestenosis coronaria, deben demostrar su eficacia en modelos preclínicos antes de su uso clínico. Sin embargo, y puesto que adolecen de inespecificidad en el mecanismo de inhibición de la proliferación celular, el proceso de reparación vascular puede ser anormal en sus características y en su evolución temporal con potenciales implicaciones clínicas muy graves. La hipótesis inicial de esta tesis es:

**El modelo experimental de empleo de dispositivos en arterias coronarias sanas porcinas permite evaluar su eficacia en términos de reducción de la proliferación y su seguridad en cuanto al proceso de reparación vascular**

### 4. OBJETIVOS

Formulada la hipótesis inicial, y sin olvidarnos de ella y de lo que significa, preferimos de forma pragmática y reduccionista hablar de OBJETIVOS a conseguir, uno general y otros específicos, entendidos éstos como peldaños a lograr para alcanzar el objetivo principal.

#### 4.1. Objetivo general

El objetivo general y compartido de las distintas publicaciones presentadas es profundizar en el conocimiento y mejorar la metodología del modelo porcino de arterias coronarias sanas como instrumento de análisis comparativo de los resultados en eficacia antiproliferativa y en la reparación vascular de distintos dispositivos de tratamiento de la enfermedad coronaria.

#### 4.2. Objetivos específicos

1. Revisar de forma crítica la evidencia publicada en el análisis preclínico de la seguridad de los *stents* coronarios, en particular de los *stents* farmacoactivos.

2. Analizar la respuesta vasomotora a distintos agentes vasodilatadores dependientes del endotelio tras denudación endotelial provocada por el implante de *stents* coronarios.
3. Describir un método de análisis de la inflamación superficial (luminal) inducida por los *stents* coronarios que permita valorar su magnitud y la evolución con el uso de distintos dispositivos.
4. Examinar las diferencias observadas en la reestenosis tras el implante de distintos *stents* convencionales y farmacoactivos y relacionarlas con el grado de daño vascular inducido.
5. Describir la cronología la de re–endotelización de distintos *stents* y caracterizar la respuesta celular que inducen estos dispositivos.
6. Evaluar el grado de re–endotelización de los *struts* no apuestos a la pared vascular, situados sobre el origen de ramas laterales, de distintos *stents* convencionales y farmacoactivos.
7. Comparar los resultados en seguridad y eficacia de distintos balones liberadores de paclitaxel.



***MATERIAL y  
MÉTODOS***



## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1. Modelo experimental de coronarias sanas porcinas

#### 5.1.1. Selección y preparación del animal

Para la realización de los distintos protocolos se emplearon cerdos domésticos (raza Large White) de 2–3 meses de edad y peso  $25 \pm 3$  kg. Todos los procedimientos se llevaron a cabo según la normativa legal vigente española (Reales Decretos 223/1998 y 53/2013, por los que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia) y europea (Directivas 1986/609/CE y 2010/63/UE) y tras la aprobación por parte del Comité de Bioética de la Universidad de León.

Una semana antes de realizar el procedimiento experimental, los animales fueron trasladados desde la Granja Experimental de la Universidad de León a las instalaciones del animalario de la Facultad de Veterinaria, periodo durante el cual se realizó el control veterinario para evaluar el estado de salud y descartar posibles enfermedades. Además, este periodo permitió la habituación a su nueva ubicación y alimentación, lo que disminuía el estrés antes del procedimiento experimental. Durante todo el estudio los animales se alojaron en jaulas individuales para la correcta administración de los fármacos y seguimiento de su estado de salud. Se identificó a cada animal mediante la colocación subcutánea de un microchip electrónico con código de 12 dígitos y lectura mediante escáner electrónico.

Todos los animales se pretrataron, 24 horas antes del procedimiento, con ácido acetilsalicílico (AAS) 325 mg y clopidogrel 300 mg y se sometieron a un ayuno de sólidos (24 h), aunque se permitió un acceso libre al agua de bebida.

#### 5.1.2. Protocolo anestésico y medicación

Los animales se pre-anestesiaron con una combinación de midazolam (0.3 mg/kg) y ketamina (5 mg/kg) intramuscular; tras 5–10 minutos se realizó la venoclisis en la vena auricular marginal, administrándose una perfusión continua de suero fisiológico 0.9% (10 ml/kg/h) durante todo el procedimiento. La inducción anestésica se efectuó con inyección

intravenosa de propofol (2–4 mg/kg), tras comprobar la pérdida de reflejos del animal se procedió a la intubación endotraqueal e inmediatamente se conectó esta sonda al equipo anestésico. El mantenimiento anestésico se realizó con anestesia inhalatoria (Isoflurano 2%), aplicando ventilación controlada y ajustando los parámetros ventilatorios para mantener normocapnia durante todo el procedimiento. La monitorización anestésica se llevó a cabo mediante electrocardiografía (ECG 6 derivaciones), presión arterial invasiva, frecuencia cardíaca, pulsioximetría y capnometría.

Como terapia antibiótica intraoperatoria se administró amoxicilina–clavulánico a dosis de 20 mg/kg vía intramuscular y como terapia anticoagulante cada animal recibió una dosis de 5000 UI de heparina sódica. Como medida analgésica se administró buprenorfina a dosis de 0.01 mg/kg vía intramuscular.

### 5.1.3. Preparación quirúrgica y procedimiento endovascular

El área quirúrgica se preparó asépticamente mediante rasurado y desinfección de la misma. Se incidió la piel en la línea media del cuello y mediante disección roma, separando las capas musculares, se alcanzó la arteria carótida izquierda, donde se colocó el introductor arterial.

Bajo guía fluoroscópica (Stenoscop GE OEC 9900 Elite®, GE Healthcare), se colocó un catéter guía especialmente diseñado (AL modificado 6F, 40 cm de longitud) en ambos ostia coronarios, realizándose coronariografía tras la administración de 0.2 mg de nitroglicerina intracoronaria. Los datos obtenidos se registraron en sistemas digitales compatibles con el estándar DICOM de obtención de imágenes radiológicas como serie de imágenes en formato JPEG sin pérdida de calidad (compresión 2:1). Con el objetivo de implantar los dispositivos con una relación de tamaños *stent* / arteria de 1.1 a 1.3 se localizó el mejor segmento en cada una de las 3 coronarias mayores. Tras el paso de la guía de angioplastia, en la localización seleccionada de cada vaso coronario mayor se implantó un *stent* distinto (3 ó 3.5 mm de calibre, según los diferentes protocolos), seleccionado mediante tablas de aleatorización que permitían una distribución homogénea de los dispositivos analizados en cada arteria coronaria. La presión de hinchado de los mismos se ajustó para alcanzar la sobredimensión deseada. Tras los implantes se realizó una coronariografía de control tras la administración de 0.2 mg. de nitroglicerina intracoronaria.

Como particularidades al método general descrito cabe señalar que:

- En el estudio nº2 “*Vasomotor response to different endothelium-dependent vasodilators in an animal model*” se planteó un estudio de respuesta vasomotora inmediatamente tras el implante de los *stents*, según se describe en el correspondiente epígrafe.
- Y en el estudio nº 7 “Análisis pre-clínico de la eficacia y seguridad de distintos balones liberadores de paclitaxel”, después de la implantación de los *stents* se realizó post-dilatación con distintos balones, según tabla de asignación aleatorizada durante 1 ó 2 minutos, con el fin de analizar posibles diferencias en la liberación del fármaco por los dispositivos en función del tiempo.

#### **5.1.4. Seguimiento, eutanasia y necropsia**

Tras el procedimiento se retiró todo el sistema, procediéndose a ligar la arteria carótida y a cerrar por planos la herida quirúrgica. Se mantuvo al animal bajo observación hasta su completa recuperación. Durante todo el seguimiento se administraron diariamente 125 mg de aspirina y 75 mg de clopidogrel, así como amoxicilina-clavulánico (20 mg/kg) cada 12 h durante 7 días. El periodo de seguimiento de los animales fue variable, según el estudio realizado y abarcó desde 1 día (estudios nº 3, 5 y 6) hasta los 28 días (estudios nº 2, 4 y 7).

En los estudios con seguimiento a los 28 días (nº 2, 4 y 7), se repitió el procedimiento quirúrgico descrito con abordaje de la arteria carótida derecha antes de la eutanasia para realizar coronariografía de control tras administración de 0.2 mg de nitroglicerina intracoronaria, revisando las arterias coronarias en las mismas proyecciones en las que se registró la angiografía inicial. La eutanasia de los animales se realizó siguiendo las directrices previamente descritas, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. Los animales se tranquilizaron con una combinación de midazolam (0.3 mg/kg) y ketamina (5 mg/kg) intramuscular, administrando posteriormente 4 mg/kg de propofol endovenoso hasta la completa pérdida de reflejos del animal, momento en el que se inyectó el agente eutanásico T-61® (embutramida, mebezonio y tetracaína 0.3 ml/kg) por vía intravenosa y 10,000 UI de heparina intravenosa con el objetivo de prevenir la formación de trombos en el interior de los vasos y facilitar la limpieza de los mismos.

Inmediatamente después de la eutanasia se procedió a realizar la necropsia sistemática, ordenada y reglada, si bien una vez abiertas ambas cavidades, se efectuó en primer lugar la extracción de los órganos de la caja torácica, con el fin de recoger las arterias coronarias rápidamente evitando posibles artefactos. De esta manera, se sacó en bloque el aparato cardio-respiratorio y, se separó el corazón, cuyas arterias coronarias se perfundieron in situ: en primer lugar con PBS y, a continuación, con paraformaldehído al 4% a una presión aproximada de 100–110mm Hg. Tras ello, se realizó su disección de la superficie epicárdica, respetando los 5 mm proximales y distales al *stent*, y se marcó con un nudo de sutura el extremo proximal, lo que permitiría conocer su orientación una vez separadas de su localización original. Los especímenes se introdujeron en paraformaldehído al 4% durante 24–48 horas a una temperatura de 4°C.

Después de ser recogidas las arterias coronarias, se efectuaron cortes transversales del corazón, de aproximadamente 1 cm de grosor, desde la base hasta la punta para determinar posibles áreas de isquemia u otras alteraciones y se tomaron muestras que se fijaron en paraformaldehído al 4% para su análisis histopatológico. Una vez examinado el corazón, se prosiguió la necropsia del animal y se recogieron muestras representativas de distintos órganos (pulmón, hígado, bazo, riñones, intestino y diferentes ganglios), las cuales fueron procesadas de forma rutinaria para su estudio histopatológico.

## 5.2. Análisis cuantitativo de la angiografía (QCA)

Para el análisis cuantitativo de los datos angiográficos se empleó el programa validado Medis® QCA, versión 6.1. En la angiografía basal se midieron los diámetros lumbales mínimos (DLM) de los segmentos arteriales tratados antes (DLM Pre) y tras el implante del *stent* (DLM *stent*). Se calculó la relación *stent* / arteria comparando DLM Pre y DLM *stent*.

A los 28 días (estudios nº 4 y 7), se realizó coronariografía de control para la determinación del DLM al seguimiento, así como de los diámetros de referencia (DRef) de la arteria tratada. Se calculan así los parámetros de reestenosis angiográficos:

- Pérdida tardía ("*late loss*") = DLM *stent* inicial – DLM *stent* seguimiento.
- % estenosis por angiografía =  $[1 - (\text{DLM } \textit{stent} \text{ seguimiento} / \text{DRef})] \times 100$ .

### 5.2.1. Análisis de la respuesta vasomotora tras el implante de *stents*

En el estudio nº2 “*Vasomotor response to different endothelium–dependent vasodilators in an animal model*” se realizó un estudio comparativo de la respuesta vasomotora tras la denudación endotelial obtenida inmediatamente tras el implante de distintos *stents*. Se adquirieron imágenes angiográficas de alta resolución (matriz de 1024 píxeles, 25 imágenes por segundo) de cada arteria tratada en la proyección con menor solapamiento, y se midieron los diámetros de los segmentos arteriales proximal y distal al *stent* con una separación de al menos 5 mm de los respectivos bordes del dispositivo en distintas fases.

El protocolo farmacológico de agentes vasodilatadores, dependientes del endotelio (ACh, serotonina, isoproterenol) o independientes (nitroglicerina), se describe en la Tabla 5.1.

**Tabla 5.1– Protocolo farmacológico de respuesta vasomotora**

Agente, dosis y vía	Tiempo	Lavado
Basal	–	–
ACh, 20 µg, intracoronaria	2 minutos	≥ 2 minutos
ACh, 40 µg, intracoronaria	2 minutos	≥ 2 minutos
Serotonina, 100 µg, intracoronaria	Bolo	≥ 2 minutos
Isoproterenol, infusión creciente, intravenosa	Hasta máxima frecuencia cardiaca (FC) sin hipotensión	Hasta recuperar valor basal FC
Nitroglicerina, 200 µg, intracoronaria	Bolo	–

## 5.3. Análisis histológico

### 5.3.1. Procesado histológico

Una vez fijadas las muestras, se eliminaba la grasa y tejidos circundantes a los tramos arteriales recogidos, evitando aplastarlos o deformarlos. Seguidamente, se llevaba a cabo su deshidratación mediante la inmersión secuencial en una serie de alcoholes de gradación creciente: etanol 70% durante 10 minutos, etanol 100% durante 10 minutos y etanol 100% durante 15 minutos. A continuación, se realizaban dos pases de 15 minutos por acetona 100% y, tras ello se introducían durante 30 minutos en una mezcla constituida a partes

iguales por acetona y el medio de inclusión (*Agar Low Viscosity Resin kit*, Agar Scientific Ltd). Este medio se preparaba en el momento de su uso, siguiendo las instrucciones del fabricante, para la obtención de bloques de resina de consistencia dura, de acuerdo con la siguiente formulación:

- Resina Epoxy Agar 100, 20 ml
- Anhídrido dodecenil–succínico (DDSA), 9 ml
- Anhídrido metilnádico (MNA), 12 ml
- Bencildimetilamina (BDMA), 1.2 ml.

Transcurrido los 30 minutos, las muestras se introducían durante 2 h en la resina a temperatura ambiente, y de aquí pasaban a tubos eppendorf debidamente etiquetados, que servían como moldes. Para ello, los eppendorf se llenaban hasta la mitad con el medio de inclusión, se colocaba la arteria correspondiente y se terminaba de rellenar con resina, evitando en todo momento que la arteria flotase y que se formasen burbujas de aire. Las muestras así preparadas se situaban en una gradilla y se incuban durante 48 horas a 60° C en una estufa, con el fin de que la resina se endureciese uniformemente. Una vez pasado este tiempo, la muestra se extraía del molde y se cortaba transversalmente por la mitad con la ayuda de sierra para metales (Dremel®). De cada una de las dos mitades, se realizaban secciones de 7 µm de espesor de la zona central, donde se había hecho el corte con la sierra, y de las zonas laterales, así como de la zona de la arteria exterior al *stent* tanto en la parte proximal como distal (a unos 2–3 mm del borde del *stent*). Para llevar a cabo estas secciones se utilizó un microtomo de rotación modelo Leica RM2255® (Leica Biosystems, Alemania), con adaptador portamuestras universal de Leica y cuchillas de carburo Leica TC–65®. Con el fin de facilitar el corte de las muestras, se humedeció tanto el bloque como la cuchilla con metanol al 30%, puesto que la resina es hidrófoba.

Las secciones obtenidas se situaron sobre portas cargados eléctricamente (Fisherbrand®, Fisher Scientific, USA), y para favorecer su estiramiento se les colocó una gota de metanol 30%, que se secó con papel de filtro y paso de un rodillo de goma. A continuación, con el fin de propiciar la adherencia de las secciones a la superficie del porta, se situaba sobre ellas una gota de pegamento soluble en agua diluido al 20% y se fijaba suavemente mediante la colocación de papel de filtro y el paso, de nuevo, de un rodillo de goma. Los portas con las secciones obtenidas se dejaban secar en una estufa a 42° C durante un mínimo de 48 horas.



Para realizar las tinciones de las muestras fue preciso previamente desplastificar las secciones, incubándolas durante 12 minutos en la siguiente mezcla, modificada la técnica de Maxwell (1977):

- 10 ml de metanol
- 1 g de KOH
- 5 ml de óxido de propileno.

Se concluía el proceso con la hidratación de las secciones mediante los siguientes pasos: 15 minutos en alcohol al 100%; 30 minutos en xilol; 5 minutos en alcohol al 100%; 5 minutos en alcohol al 96%; y 20 minutos en agua corriente. Una vez desplastificadas las muestras se teñían mediante la técnica rutinaria de HE y, con el fin de destacar la localización de las láminas elásticas de las arterias, la técnica de Verhoeff–Van Gieson.

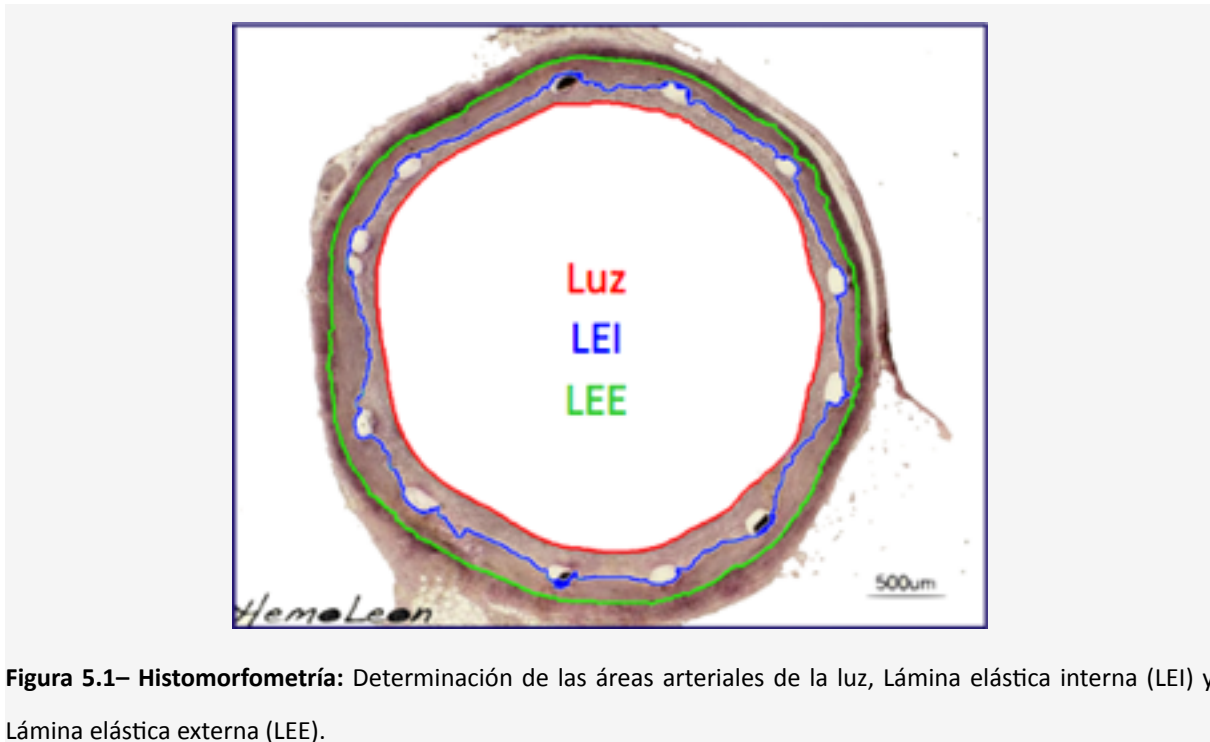
Las restantes muestras tomadas de los distintos órganos eran talladas e incluidas en parafina para su estudio histopatológico. Para ello, se procedía a su deshidratación en gradientes de alcohol, aclarado en xilol e inclusión en parafina, con punto de fusión 56–57°C (Vogel–Histocomp®) mediante un procesador automático de tejidos Autotechnicon Duo® Modelo 2A (Technicon Corporation Tarry Town, NY, EEUU), de ciclo continuo de 18 horas. Una vez concluido este proceso, el montaje definitivo de los bloques se realizaba en una unidad formadora de bloques Myr AR 280–2® (Meyer, Tarragona, España).

De cada bloque se obtenían secciones de 3–4 µm de grosor mediante un microtomo de rotación modelo Leica RM 2035®, con adaptador de casetes y cuchillas desechables Feather R35®. Las secciones se recogían en portas y después de 24 horas en una estufa a 37°C se teñían con HE. En aquellos casos en los que tras este primer análisis se consideraba necesario, se procedía a realizar tinciones adicionales como Tricrómico de Masson.

### **5.3.2. Histomorfometría y valoración histopatológica**

En cada una de las secciones (proximal, central y distal) del segmento con *stent* se analizaron las siguientes áreas (Fig. 3.1): Luz, LEI, LEE y *stent*. En las secciones de la arteria de referencia (proximal y distal) se evaluaron las áreas de la luz y la LEE. Con estos valores se calcularon las relaciones:

- Area Neoíntima = Area LEI (ó Area *stent* si no se puede medir ésta) – Area Luz.
- % estenosis por histología =  $100 \times (1 - \text{Area Luz} / \text{Area LEI ó Area } \textit{stent})$ .



**Figura 5.1– Histomorfometría:** Determinación de las áreas arteriales de la luz, Lámina elástica interna (LEI) y Lámina elástica externa (LEE).

Se analizaron también las respuestas vasculares en torno a cada uno de los *struts* identificados en las secciones, valorando el espesor de la neoíntima (desde la porción más profunda del *strut* hasta la luz suprayacente), la aposición del *stent* a la LEI en cada punto y los tipos celulares que rodeaban a cada *strut*. Se determinaron los valores recomendados de las siguientes escalas, tanto en las mediciones globales como en las mediciones por *struts*: daño vascular (*injury score*), inflamación, fibrina y endotelización, tal y como se describen en las Tablas 2.2, 2.3 y 2.4.

#### 5.4. Preparación del tejido y análisis SEM

Para el análisis de la endotelización se siguió la siguiente metodología:

- **Corte de las muestras:** los segmentos con *stent* se bisecaron mediante un corte longitudinal en 2 secciones.
- **Fijación:** 24 horas en glutaraldehído al 2.5% en PBS 0.01M y pH 7.4.
- **Lavados en PBS:** 3 x 1h en frío.

- **Post-fijación** en tetróxido de osmio al 2%, en oscuridad y temperatura ambiente durante 2–3h.
- **Lavados** en PBS: 3x1 hora.
- **Deshidratación** en serie creciente de etanol durante 1h en cada uno de ellos: 30, 50, 70, 80, 90, 96 x 3, 100% x 2 + 12 horas, a temperatura ambiente para evitar recondensación. Al no poder procesarse todas las muestras a la vez, algunas de ellas quedaron durante días en alcohol absoluto hasta que pasaron al desecado por punto crítico.
- **Desecado por punto crítico:** se hicieron varios lavados en CO<sub>2</sub> líquido para sustituir el alcohol, a 10C. Después se calentaron hasta los 40°C y se alcanzaron las condiciones del punto crítico (40°C y 90 atmósferas).
- **Recubrimiento con oro:** se sometieron las muestras a un bajo vacío con argón (0.05 mbar), aplicando un voltaje de 30 mA para recubrir las muestras con una fina capa de oro (30–40 nm).

Las superficies lumbinales de ambas mitades de los *stents* fueron examinadas *en face* con el uso de un microscopio electrónico de barrido JSM-6480 LV® (JEOL, Tokio, Japón). Cada hemisección se fotografió digitalmente y se analizó la superficie endotelizada en imágenes a 25 aumentos, empleando imágenes de alta magnificación (150–250 aumentos) para diferenciar las células endoteliales de formaciones de fibrina u otros tipos celulares. La adecuada discriminación de las células endoteliales se basó en criterios morfológicos: grupos celulares altamente orientados que exhiben un patrón en empedrado en forma de monocapa de células confluentes. Las fotografías digitalizadas se analizaron para determinar la superficie endotelizada (*NIH image/Image J software for Macintosh y Adobe Photoshop CS5® for Macintosh*).

#### 5.4.1. Medición global del área endotelizada

Se calculó el área arterial cubierta por el *stent* (área total medida, en color rojo en la Figura 5.2), se corrige por el porcentaje metal / arteria de cada *stent* (proporcionado por el fabricante) y se correlaciona con el área no endotelizada (en color negro en la Figura 5.2).

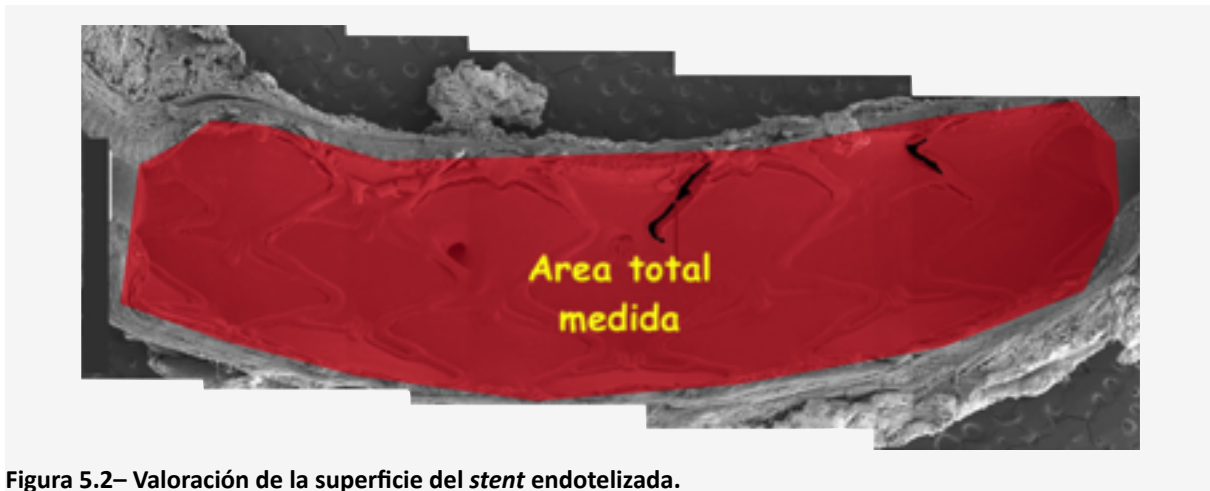


Figura 5.2– Valoración de la superficie del *stent* endotelizada.

#### 5.4.2. Respuesta inflamatoria en el vaso y sobre el entramado del *stent* (*struts*)

Se determinó mediante el análisis del número de células inflamatorias (identificadas por su mayor tamaño respecto al resto de elementos formes sanguíneos) en áreas cuadradas de 25 píxeles de lado (100  $\mu\text{m}$ ) sobre los *struts* y sobre la pared arterial, representativas del nivel global de inflamación, tras procesar la imagen obteniendo el nivel de umbral de grises (Figura 5.3). Se expresa como porcentaje del área ocupada por células inflamatorias.

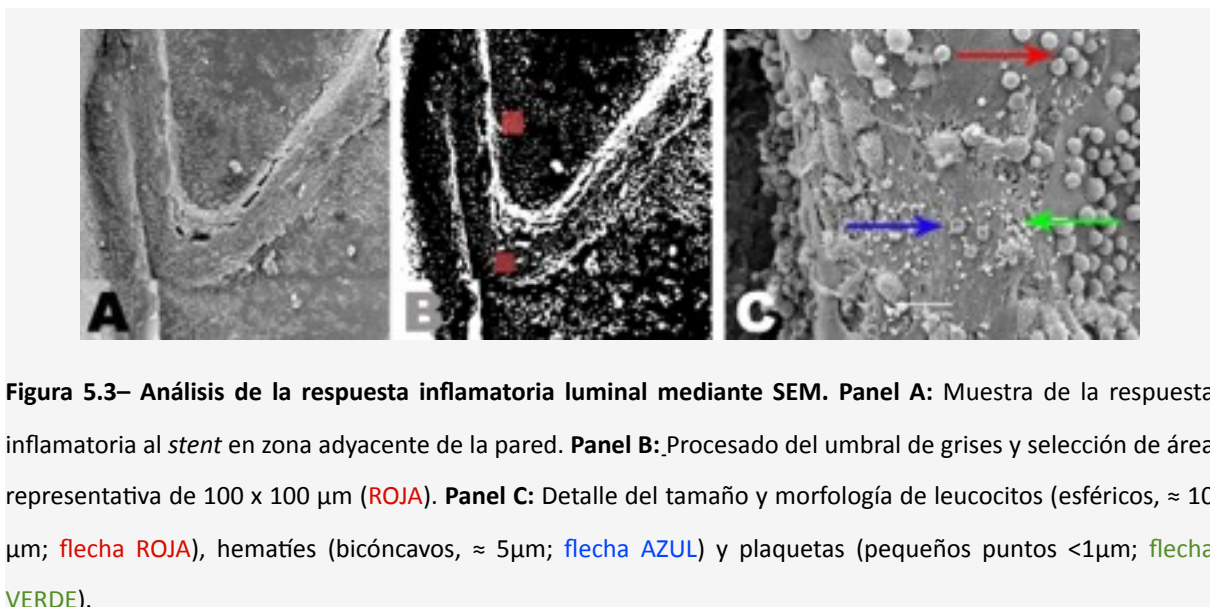


Figura 5.3– Análisis de la respuesta inflamatoria luminal mediante SEM. Panel A: Muestra de la respuesta inflamatoria al *stent* en zona adyacente de la pared. Panel B: Procesado del umbral de grises y selección de área representativa de 100 x 100  $\mu\text{m}$  (ROJA). Panel C: Detalle del tamaño y morfología de leucocitos (esféricos,  $\approx 10 \mu\text{m}$ ; flecha ROJA), hematíes (bicóncavos,  $\approx 5 \mu\text{m}$ ; flecha AZUL) y plaquetas (pequeños puntos  $<1 \mu\text{m}$ ; flecha VERDE).

## 5.5. Estudio farmacocinético (estudio nº7)

Para comprobar la tasa de transferencia del paclitaxel a la arteria, la remanencia de fármaco en el balón y la liberación al torrente sanguíneo se realizó una fase experimental sobre 3 animales con el siguiente protocolo: tras obtener canulación selectiva de coronarias izquierda y derecha según la metodología descrita previamente, se implantaron *stents* de cromo-cobalto en los segmentos proximal o medio cada una de las ramas coronarias mayores que se usaron como marcadores. Distalmente a cada uno de los *stents* se realizó una dilatación con balones liberadores de paclitaxel, BLP1, durante 60 segundos a presiones entre 7 y 10 atmósferas para obtener ratios balón / arteria de 1.1–1.2. Se programaron distintos tiempos de seguimiento (15–30 minutos, n=2 balones; 60–90 minutos, n=2; 2 horas, n=2; 24 horas, n=3) tras los cuales se extrajeron las arterias tratadas para su inmediata congelación y posterior análisis. En los mismos plazos temporales se obtuvieron muestras de sangre periférica.

La determinación de paclitaxel se realizó mediante cromatografía líquida (HPLC). Las zonas arteriales tratadas se procesaron mediante digestión de la muestra, concentrándose los extractos a sequedad y redisolviéndose con 1 ml de acetonitrilo. Tras la inyección de la muestra en el equipo de HPLC (1260 Infinity HPLC–Chip/MS System®, Agilent Technologies) se cuantificó la cantidad de paclitaxel por interpolación a una recta de calibrado, expresando los resultados en µg de paclitaxel / g de tejido. El flujo de trabajo fue de 0,8 ml/min, a través de una columna Zorbax Eclipse Plus®, C18, 5 µm, 4.6 x 100mm, y detección a 227nm.

## 5.6. Metodología estadística

Las variables no cuantitativas, como las escalas de las variables de seguridad analizadas por histopatología, se presentan mediante proporciones (como se recomienda en los documentos de consenso<sup>32,33</sup>), aunque también como media ± desviación estándar, al ser la forma más habitual de presentación en publicaciones previa. Se analiza la distribución de valores de las variables cuantitativas (test de normalidad de Shapiro–Wilk) y se expresan como media ± desviación estándar, en caso de distribución normal, o mediana (rango intercuartil), en caso de distribución no normal.

Se analizan las diferencias de las medias de los grupos con un test t de Student y análisis de las varianzas ANOVA; para comparaciones múltiples se utilizan los métodos de Dunnett (comparación con control) y de Tukey (comparación de todos los pares). En caso de distribución no normal, se emplea el test no paramétrico de Wilcoxon / Kruskal–Wallis (*Rank Sums Test*). Las variables semicuantitativas se analizan mediante el test  $\chi^2$  y test exacto de Fisher. Las correlaciones entre distintas variables cuantitativas se realizan con métodos de regresión lineal determinando la  $r^2$  de Pearson.

Para valorar la potencial influencia que distintas variables (ratio *stent* / arteria, arteria tratada, tiempo de hinchado, *injury score*) pueden tener en los resultados finales, se realizan análisis multivariado de regresión logística. En el estudio nº4, la influencia de las variables discretas sobre el grado de reestenosis y de área de neoíntima se analizó mediante la aplicación de modelos multivariantes de *splines* adaptativos regresivos (MARS). Se consideran significativas las diferencias con  $p < 0.05$ .

### 5.6.1. Cálculos de los tamaños muestrales

Aunque los citados documentos de consenso<sup>32,33</sup> ya establecen el número de observaciones para cada dispositivo en  $n=10-12$  para los estudios de reestenosis a los 28 días y  $n=3$  para estudios de re-endotelización a más corto plazo, se realizaron cálculos de la potencia estadística en los distintos estudios:

- En los estudios nº 5 y 6 se estima una  $n=5$  observaciones de cada *stent* a los 7 días del implante para demostrar diferencias de la superficie endotelizada del 17% (desviación estándar de 10%) con un poder del 80% y un error tipo I del 5%.
- En los estudios nº 4 y 7 se estima una  $n=12$  observaciones de cada *stent* a los 28 días del implante para demostrar diferencias en la reestenosis angiográfica o histológica del 18% (desviación estándar de 15%) con un poder del 80% y un error tipo I del 5%.

# ***RESULTADOS***





## 6. RESULTADOS

### 6.1. Artículo nº 1

***Preclinical evaluation of coronary stents: Focus on safety issues.***

***Perez de Prado A, Perez–Martinez C, Cuellas C, Gonzalo–Orden JM, Diego A, Regueiro M, Martinez–Fernandez B, Altonaga JR, Marin JF, Fernandez–Vazquez F.***

***Curr Vasc Pharmacol. 2013;11:74–99***

**Impact Factor 2012 (JCR) 2.821, (nº 24 de 67=Q2). H index 35, (Q2).**

Artículo de revisión, ver INTRODUCCION y REVISION BIBLIOGRAFICA.



## 6.2. Artículo nº 2

### ***Vasomotor response to different endothelium-dependent vasodilators in an animal model.***

**Perez de Prado A**, Cuellas C, Diego A, Gonzalo-Orden JM, Perez-Martinez C, Regueiro M, de Miguel A, Ajenjo JM, Martinez-Fernandez B, Altonaga JR, Fernandez-Vazquez F.

**J Invasive Cardiol. 2012;24:320–323.**

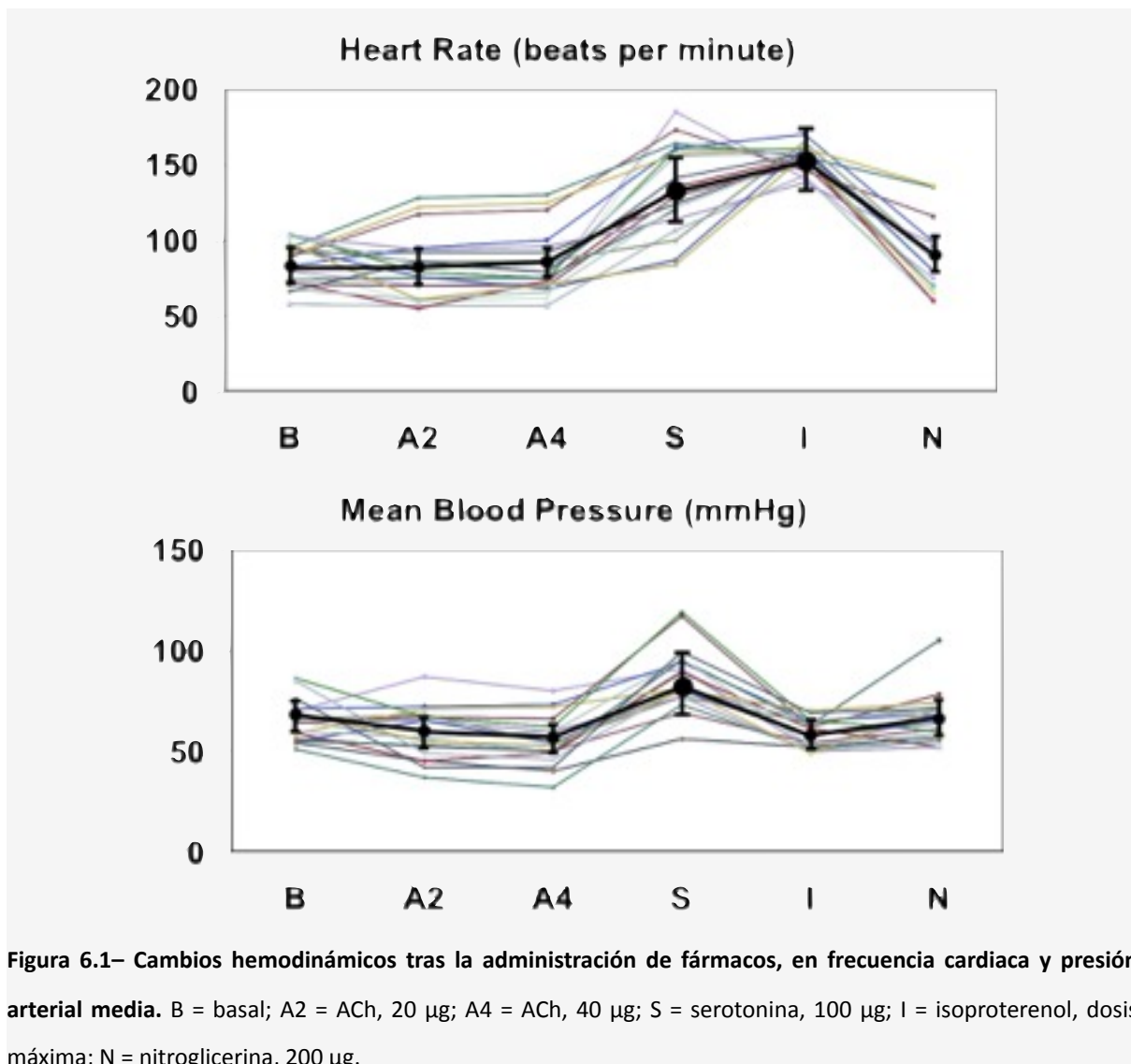
**Impact Factor (JCR) 1.569, (nº 68 de 122=Q3). H index 41, (Q2).**

### 6.2.1. Procedimientos

Todos los *stents* se implantaron de acuerdo al protocolo descrito. La relación *stent* / arteria fue de  $1.06 \pm 0.23$ , sin diferencias significativas entre los distintos *stents* o las arterias coronarias. Las pruebas de respuesta vasomotora se desarrollaron según lo planeado, sin complicaciones. Es de reseñar la aparición de espasmo oclusivo del vaso en 10 casos (37%) tras la infusión de ACh en dosis de 40  $\mu\text{g}$  (A4). Todos estos casos recuperaron el flujo espontáneamente en el primer minuto tras la infusión, sin posteriores consecuencias hemodinámicas o arrítmicas. En estos casos, la fase de lavado se prolongó hasta los 5 minutos.

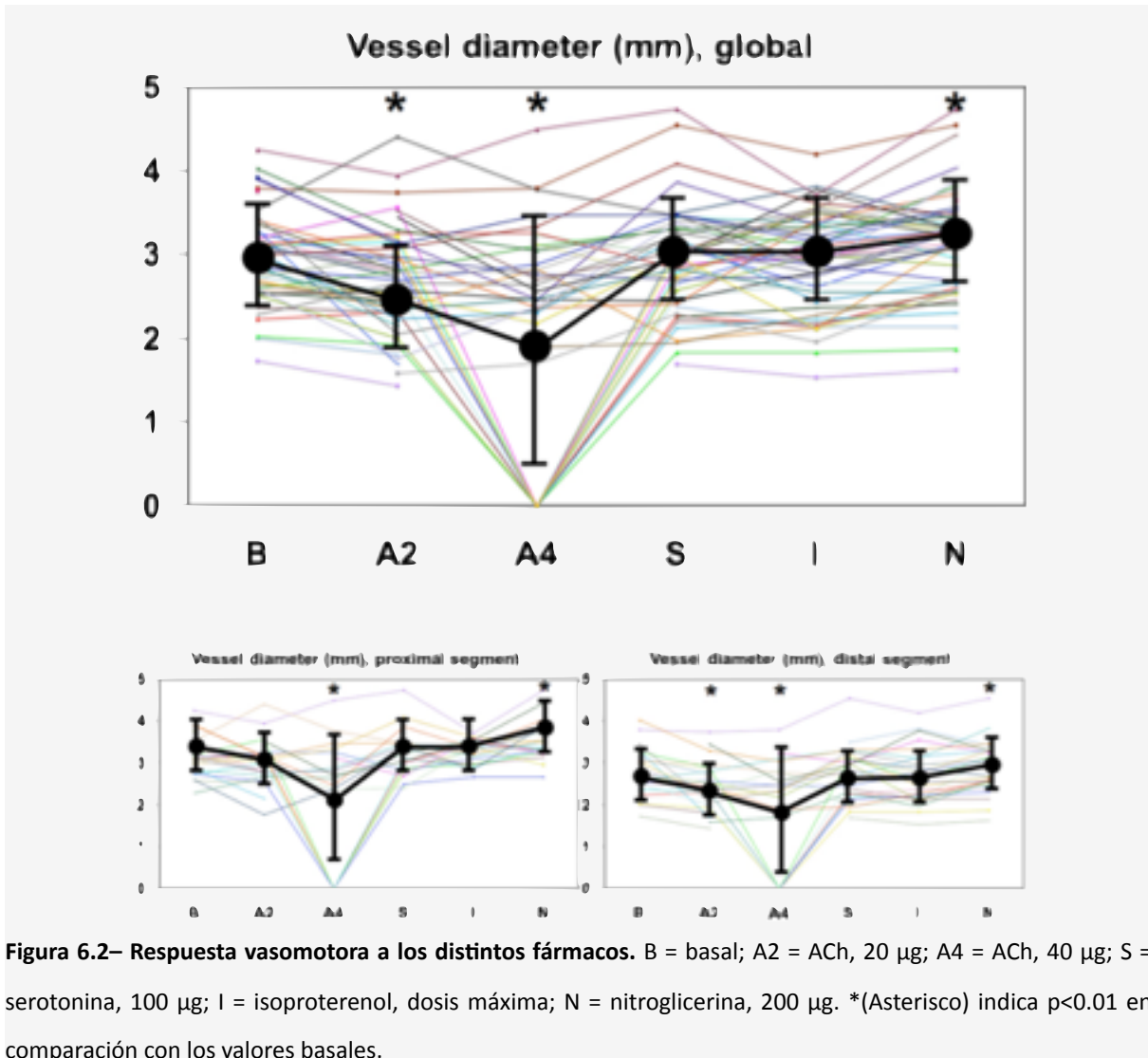
### 6.2.2. Resultados

Los animales mostraron los cambios hemodinámicos esperables tras la administración de vasodilatadores. La ACh no indujo cambios significativos en la frecuencia cardiaca y sólo una modesta caída de la presión arterial media ( $16 \pm 14$  mm Hg en la fase A4;  $p < 0.05$ ). Contrariamente, la serotonina se asoció con un incremento significativo tanto en la frecuencia cardiaca ( $54 \pm 42$  latidos por minuto;  $p < 0.01$ ) como en la presión arterial media ( $36 \pm 23$  mmHg;  $p < 0.01$ ). El isoproterenol también se asoció con un significativo aumento de la frecuencia cardiaca ( $82 \pm 33$  latidos por minuto;  $p < 0.001$ ) sin cambios en las presiones arteriales (Fig. 4.1).



Las 2 dosis de ACh indujeron vasoconstricción significativa: A2 indujo una constricción del  $16 \pm 14\%$  en comparación con el diámetro observado tras máxima vasodilatación con nitroglicerina,  $p < 0.01$ , y A4 mostró una reducción de los diámetros de  $42 \pm 39\%$ ,  $p < 0.001$ . La serotonina y el isoproterenol también se asociaron con diámetros ligeros, pero significativamente, menores que los observados tras máxima vasodilatación: S,  $-6 \pm 12\%$  ( $p < 0.05$ ) e I,  $-6 \pm 11\%$  ( $p < 0.05$ ); Figura 6.2. Las correlaciones entre los valores obtenidos en máxima vasodilatación y los diámetros medidos después de la administración de cada agonista endotelio-dependiente revelaron hallazgos similares: A2–N,  $r = 0.68$ ; A4–N,  $r = 0.64$ ; S–N,  $r = 0.82$ ; I–N,  $r = 0.81$ . Como era esperable, los diámetros distales fueron significativamente menores que los proximales. Sin embargo, los cambios observados después de la administración de los distintos fármacos son muy similares en ambos

segmentos. No se encontraron relaciones entre la tasa de constricción y el tipo de *stent*, arteria o localización arterial (más proximal o distal).





### 6.3. Artículo nº 3

**Análisis de la inflamación luminal inducida por distintos tipos de *stent* coronario en el modelo coronario animal mediante microscopía electrónica de barrido.**

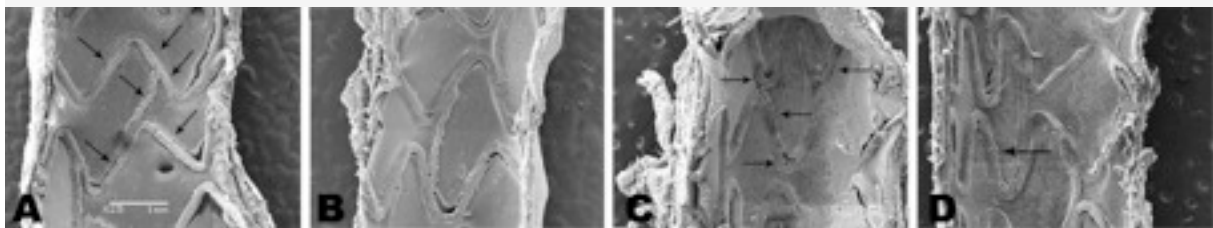
*Scanning electron microscopy analysis of luminal inflammation induced by different types of coronary stent in an animal model.*

**Perez de Prado A**, Perez–Martinez C, Cuellas–Ramon C, Gonzalo–Orden JM, Regueiro–Purriños M, Martinez–Fernandez B, Diego–Nieto A, Fernandez–Vazquez F.

**Rev Esp Cardiol.** 2011;64:159–162.

**Impact Factor (JCR) 2.53, (nº 48 de 117=Q2). H index 34, (Q2).**

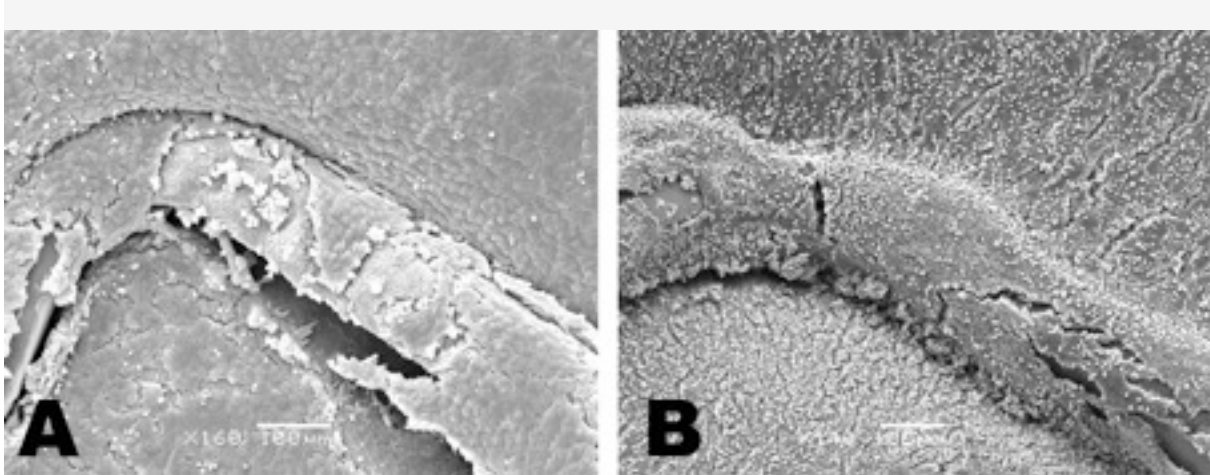
La endotelización de los SMC fue mayor que la de los SFA analizados (liberadores de vinblastina a distintas dosis) a los 3 días ( $82 \pm 18$  vs.  $28 \pm 14\%$ ,  $p=0.016$ ) y 7 días ( $97 \pm 3\%$  vs.  $44 \pm 15\%$ ,  $p=0.0001$ ) (Fig. 6.3). No se observaron diferencias en la endotelización entre los 2 tipos de SFA, las distintas arterias (descendente anterior, circunfleja y coronaria derecha) ni relación con el ratio *stent* / arteria (SMC  $1.17 \pm 0.1$ , SFA1  $1.07 \pm 0.07$ , SFA2  $1.13 \pm 0.16$ ;  $p=0.4$ ).



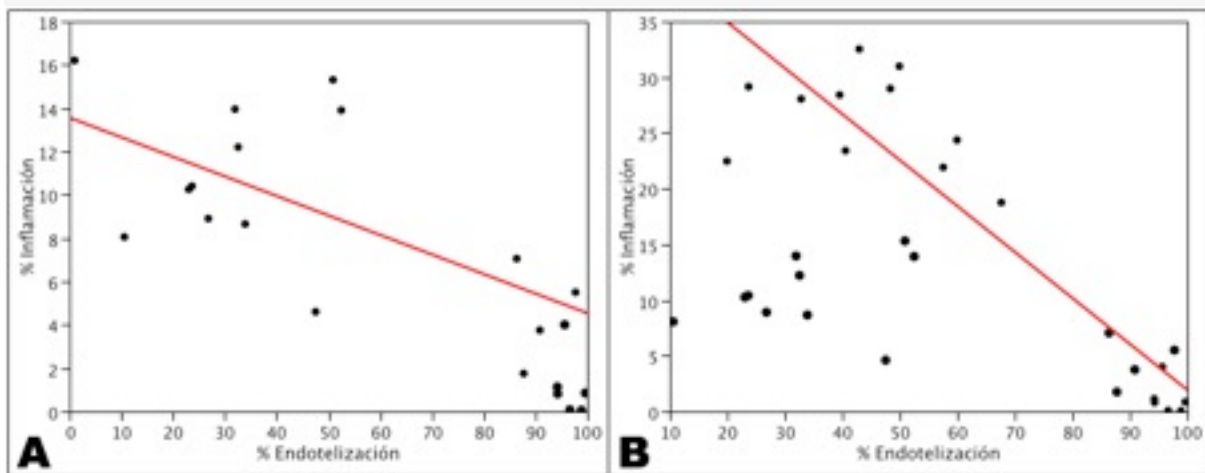
**Figura 6.3– Endotelización de SMC: 3 días, Panel A:** Endotelización parcial del *stent*; áreas desnudas (flechas). **7 días, Panel B:** Endotelización completa del *stent*. **Endotelización de SFA: 3 días, Panel C:** Áreas desnudas (flechas) y el resto, cubierto de fibrina. **7 días, Panel D:** Endotelización irregular; presencia de células gigantes (flechas).

Los SMC mostraron menor densidad de células inflamatorias que los SFA tanto a los 3 días ( $4.5 \pm 2\%$  vs.  $11.8 \pm 3.5\%$ ,  $p=0.001$ ) como a los 7 días ( $1.2 \pm 1.5\%$  vs.  $26.3 \pm 4.4\%$ ,  $p=0.0001$ ). No se apreciaron diferencias significativas a este respecto entre los 2 SFA. En los SMC disminuyó de forma significativa la densidad de células inflamatorias con el tiempo ( $4.5 \pm 2\%$

vs.  $1.2 \pm 1.5\%$ ,  $p=0.0001$ ), mientras en los SFA el comportamiento fue inverso, aumentando de forma significativa a los 7 días ( $11.8 \pm 3.5\%$  vs.  $26.3 \pm 4.4\%$ ,  $p=0.0001$ ). Se observaron correlaciones inversas entre el grado de inflamación (Fig. 6.4) y el porcentaje de endotelización con valores de  $r^2 = -0.40$  ( $p < 0.011$ ) a los 3 días y  $-0.84$  ( $p < 0.0001$ ) a los 7 días (Fig. 6.5).



**Figura 6.4– Grados de inflamación:** Panel A, SMC, 3 días: Escasa presencia de células inflamatorias (pared y *stent*). Endotelización parcial del *stent*; áreas con fibrina. Panel B, SFA, 7 días: Intensa reacción inflamatoria alrededor del *stent*. Cobertura de fibrina y plaquetas sobre el *stent*.



**Figura 6.5– Correlación entre el grado de endotelización y de inflamación:** Resultados a los 3 días (panel A) y a los 7 días (panel B).



## 6.4. Artículo nº 4

**La reestenosis en el *stent* depende del daño vascular inducido. ¿Son válidos los modelos experimentales actuales de análisis de los *stents* farmacoactivos?**

*Instent restenosis related to vessel injury score degree. Are current experimental models valid for drug-eluting stents analysis?*

Diego A, **Perez de Prado A**, Cuellas C, Perez–Martinez C, Gonzalo–Orden M, Altonaga JR, de Miguel A, Regueiro M, Ajenjo J, Sanchez–Lasheras F, Alvarez–Arenal A, Fernandez–Vazquez F.

**Rev Esp Cardiol. 2011;64:745–751.**

**Impact Factor (JCR) 2.53, (nº 48 de 117=Q2). H index 34, (Q2).**

### 6.4.1. Procedimientos

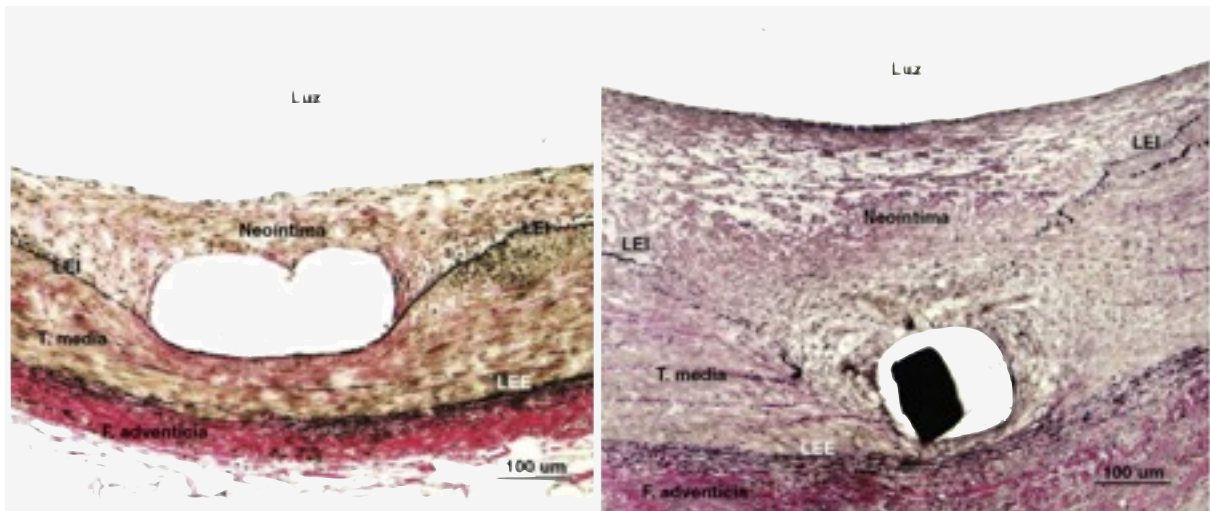
La tasa de éxito primario del procedimiento fue del 100%. Aún así cabe señalar que fallecieron 2 animales a las pocas horas de realizado el mismo por causa arrítmica, y se completó el seguimiento de 4 semanas en los 18 animales restantes. Además, se eliminaron del análisis 10 segmentos arteriales: 7 por sobreexpansión del *stent* que rompió la capa media (3 casos) y adventicia (4 casos) de la arteria, con una importante reacción granulomatosa. Y los otros 3 segmentos se vieron alterados durante el proceso de inclusión en resina, por lo que tuvieron que ser descartados. Por lo tanto, el análisis final se realizó sobre 18 animales y 44 segmentos arteriales tratados, más 22 segmentos arteriales no tratados como controles sanos.

### 6.4.2. Resultados: histomorfometría

Grupo control: los valores medidos en los 22 segmentos arteriales proximales a las zonas de implante, expresados como mediana [rango intercuartil], fueron: área de LEE 3.64 [2.94–4.45], área de LEI 2.44 [1.83–2.68], área luminal 2.44 [1.83–2.68] mm<sup>2</sup>.

Grupo de estudio: en los segmentos tratados se encontró un incremento significativo del tamaño del vaso con respecto a los controles. No se hallaron diferencias en el grado de daño

vascular en función de la arteria tratada ( $p=0.12$ ) y se graduó como *injury score*  $\leq 1$ , con integridad de la LEI en el 55% de los casos e *injury score*  $\geq 2$  en el 45% (Fig. 4.6).



**Figura 6.6– Grados de daño vascular.** A la izquierda, *injury score* 1 (integridad de la LEI). A la derecha, *injury score* 2 (rotura de LEI).

Al comparar los SMC con los SFA, independientemente del grado de daño vascular, los SFA presentaron significativamente menor área neointimal (AN) y % estenosis por histología y mayor área luminal (AL) que los SMC:

- AN: 1.26 [0.99–2.09] vs 2.54 [2.26–3.14] mm<sup>2</sup>;  $p < 0.001$ .
- % estenosis por histología: 15.4 [12.1–21.4] vs 29 [23.5–38.7] %;  $p < 0.001$ .
- AL: 7.84 [6.87–8.24] vs 5.96 [5.14–6.94] mm<sup>2</sup>;  $p = 0.006$ .

Analizados en función del grado de daño vascular, los segmentos con daño vascular más profundo (*injury score*  $\geq 2$ ) presentaron un menor tamaño de luz vascular y un mayor porcentaje de estenosis con respecto al grupo de *injury score*  $\leq 1$  (Tabla 6.1).

Tabla 6.1– Características histomorfométricas de los segmentos tratados en función del daño vascular.

	<i>Injury score</i> ≤ 1 (n=24)	<i>Injury score</i> ≥ 2 (n=20)	<i>p</i>
LEE (mm <sup>2</sup> )	11.04 [10.24–12.27]	10.99 [9.48–12.13]	0.005
LEI (mm <sup>2</sup> )	9.4 [8.69–10.35]	8.57 [7.54–9.36]	0.01
AN (mm <sup>2</sup> )	1.37 [1.13–2.32]	2.3 [1.24–3.06]	0.062
AL (mm <sup>2</sup> )	8.03 [7.29–8.36]	6.03 [4.98–7.18]	0.001
Estenosis (%)	15.3 [12.1–22.3]	26.4 [17.3–35.2]	0.003

En cuanto al tipo de *stent* implantado, en el grupo de *injury score* ≤ 1 no se encontraron diferencias significativas en los parámetros de proliferación neointimal, mientras que estas diferencias sí aparecieron, y de forma estadísticamente significativa, dentro del grupo de *injury score* ≥ 2 (Tabla 6.2).

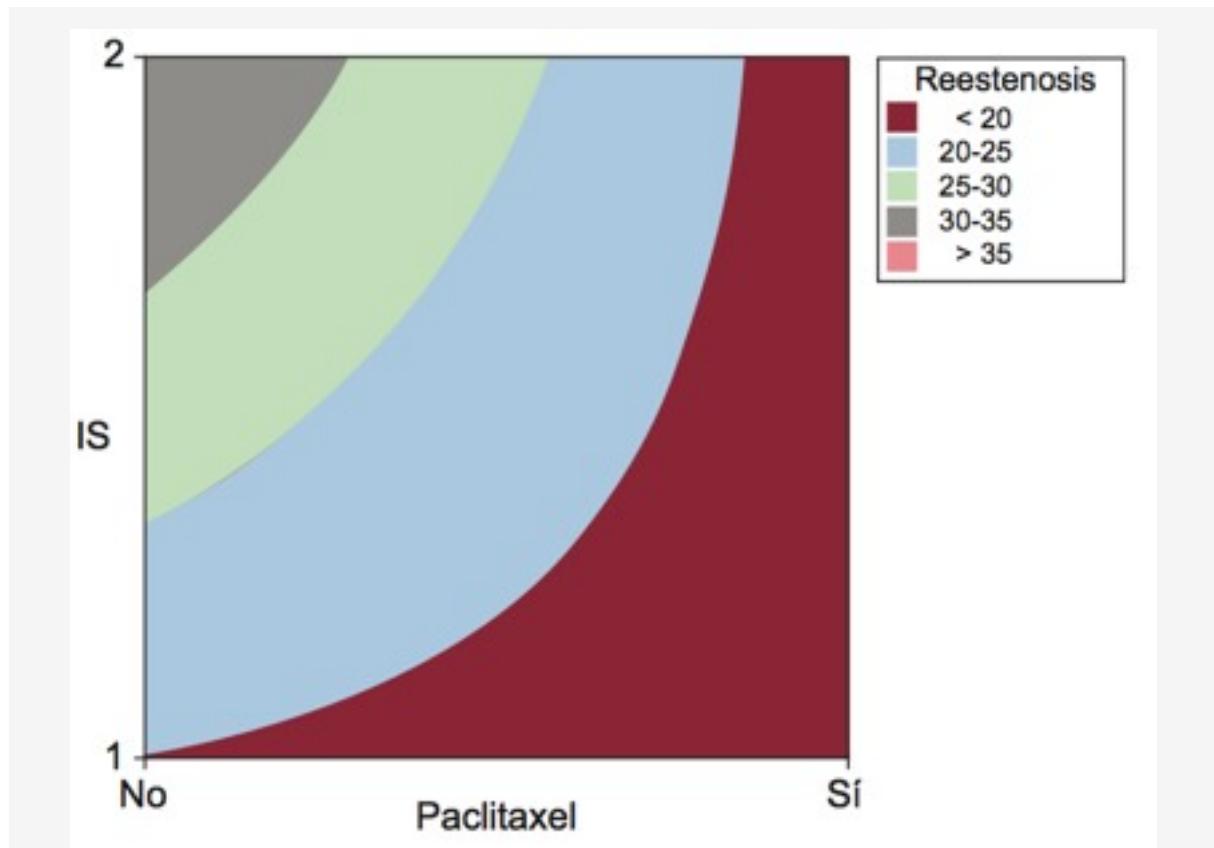
Tabla 6.2– Características histomorfométricas de los segmentos tratados en función del daño vascular y el tipo de *stent* implantado.

		AN (mm <sup>2</sup> )	AL (mm <sup>2</sup> )	Estenosis (%)
<i>Injury score</i> ≤ 1	SFA (n=20)	1.32 [1.1–2.15]	7.91 [7.29–8.35]	13.9 [12.09–20.8]
	SMC (n=4)	2.02 [1.26–2.49]	8.21 [6.51–8.6]	22.2 [14.1–23.3]
	<i>p</i>	<b>0.6</b>	<b>0.99</b>	<b>0.45</b>
<i>Injury score</i> ≥ 2	SFA (n=9)	1.22 [0.8–1.95]	7.26 [5.17–8.15]	16.6 [11.2–23.5]
	SMC (n=11)	2.9 [2.27–3.66]	5.4 [4.93–6.48]	30.4 [26.4–45.7]
	<i>p</i>	<b>0.001</b>	<b>0.054</b>	<b>0.001</b>

#### 6.4.3. Análisis multivariado

Se realizó un modelo de regresión lineal de la variable reestenosis (% estenosis) calculado en función de las variables áreas de LEI, LEE, media, AN, relación AN/LEE, AL y presión de hinchado. Una vez eliminadas las variables que presentaban valor más elevado del coeficiente *p*, se adquirió un modelo óptimo formado por las variables: área de media, AL y AN/LEE, con un R<sup>2</sup> del 98,9% (el mismo valor que el modelo realizado con las siete variables). Al analizar cómo la presencia o ausencia de paclitaxel influía en la variable reestenosis, se

observó que la presencia de paclitaxel, de forma independiente, disminuyó el grado de reestenosis, si bien este efecto era más apreciable a mayor grado de daño vascular (Fig. 6.7).



**Figura 6.7– Gráfico de contorno de las variables *injury Score* y paclitaxel frente a la variable reestenosis.** Relación proporcional del daño vascular y la presencia o ausencia de fármaco en el *stent* sobre el grado de reestenosis. Se observa que los valores más altos de reestenosis pertenecen a los SMC y con  $injury\ score \geq 2$ . Nótese que si bien en los SMC el valor de la reestenosis puede tener cualquier valor dentro del rango, los SFA sólo presentan los valores más bajos de reestenosis. IS: *Injury Score*.

Se efectuó, a su vez, un modelo MARS de la variable reestenosis en función de las áreas de LEE, LEI, AL, media, AN, AN/LEE, presión de hinchado, tipo de *stent*, *injury score* y arteria tratada. Este modelo permite no sólo incluir las variables continuas, sino también las discretas, que puede procesar de forma adecuada. Tras la etapa inicial de descarte de variables, el modelo MARS resultante encontró como relación significativa con las variables: áreas de LEI, AN, media, AN/LEE e *injury score*.

## 6.5. Artículo nº 5

***Time course of reendothelialization of stents in a normal coronary swine model:***

***Characterization and quantification.***

**Perez de Prado A**, Perez–Martinez C, Cuellas–Ramon C, Gonzalo–Orden JM, Regueiro–Purrinos M, Martinez B, Garcia–Iglesias MJ, Ajenjo JM, Altonaga JR, Diego–Nieto A, de Miguel A, Fernandez–Vazquez F.

**Vet Pathol.** 2011;48:1109–1117

**Impact Factor 2011 (JCR) 1.945, (nº17 de 145=Q1). H index 46, (Q1).**

### 6.5.1. Procedimientos

Todos los animales sobrevivieron a la implantación de los *stents* y completaron el seguimiento programado. En total, se colocaron 33 *stents* (n=9 en el grupo de 1 día, n=9 en el grupo de 3 días y n=15 en el grupo de 7 días de seguimiento), alcanzando una relación *stent* / arteria de  $1.16 \pm 0.06$ , sin diferencias entre los distintos dispositivos: *stents* de acero inoxidable (SA)  $1.17 \pm 0.06$ ; *stents* de cromo–cobalto (SCC),  $1.16 \pm 0.07$ ; *stents* liberadores de tacrolimus (SLT),  $1.16 \pm 0.07$ ;  $p=0.87$ . La presión de hinchado también fue similar para todos los grupos: SA,  $9.4 \pm 1.8$ ; SCC,  $9.3 \pm 0.9$ ; y SLT,  $9.4 \pm 1.8$  ( $p=0.97$ ). No hubo episodios de trombosis subaguda del *stent*. Únicamente cabe comentar que un animal desarrolló infección de la herida quirúrgica sin posteriores consecuencias. Todas las muestras fueron adecuadamente analizadas excepto un *stent* (del grupo de 7 días de seguimiento) que mostró un artefacto de secado que impedía la caracterización de los distintos tipos celulares presentes.

### 6.5.2. Resultados globales

Aunque la endotelización de los *struts* en los extremos del *stent*, tanto proximal como distal, parecía ser mejor que en la parte media, no se observaron diferencias significativas. No se

objetivó relación alguna entre la tasa de endotelización y la arteria tratada, presión de hinchado o relación *stent* / arteria.

### 6.5.3. Resultados a 1 día

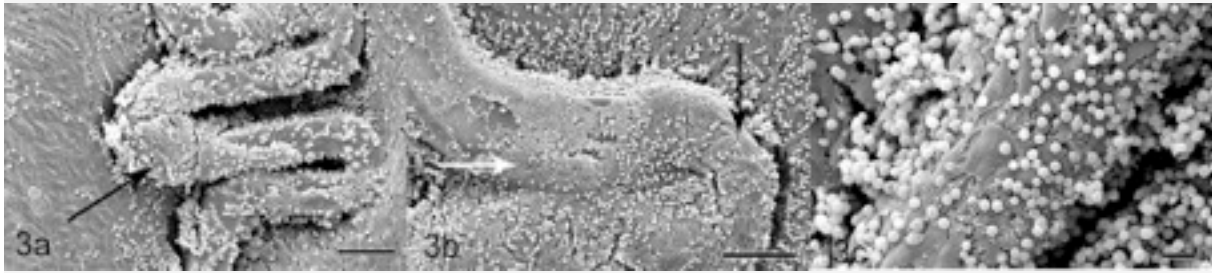
La mayor parte de la estructura del *stent*, independientemente del tipo, aparecía desnuda o cubierta por una fina capa de fibrina, plaquetas y células inflamatorias. Éstas últimas se encontraban en cantidad moderada alrededor de los *struts*, mientras que la superficie del vaso entre ellos mostraba endotelio preservado. La re-endotelización del *stent* mostraba una distribución parcheada: se identificaban células endoteliales aisladas que comenzaban a cubrir los *struts* desde los bordes hacia el centro. No se objetivaron diferencias en la tasa de endotelización entre los *stents*: SA ( $29 \pm 23\%$ ), SCC ( $29 \pm 24\%$ ) y SLT ( $31 \pm 25\%$ );  $p=0.9$  (Figs. 6.8 y 6.9).

### 6.5.4. Resultados a 3 días

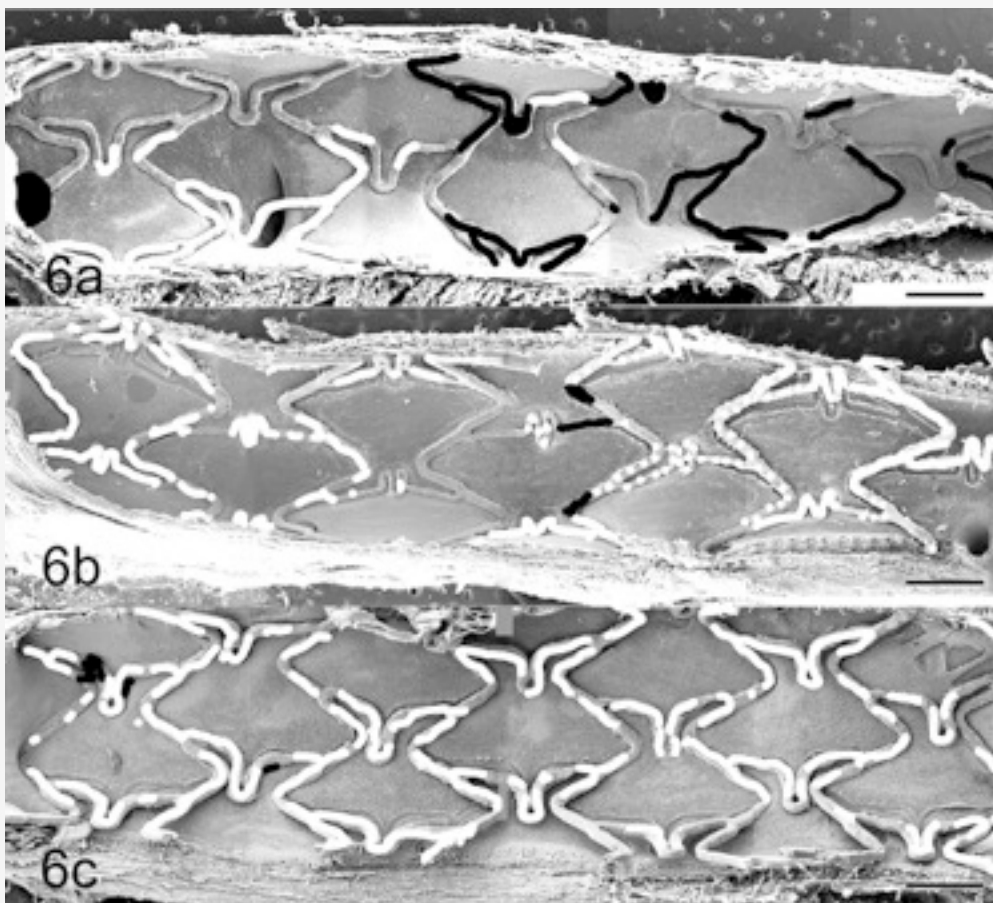
Muchos *struts* estaban cubiertos por células endoteliales, pero con claras características de inmadurez, como uniones intercelulares laxas. En cantidad variable, se apreciaban células gigantes y otras células inflamatorias así como microtrombos. La tasa de endotelización de los SMC (SA,  $79 \pm 14\%$ ; SCC,  $81 \pm 17\%$ ) fue significativamente superior a la de los SLT ( $46 \pm 9\%$ ,  $p=0.007$ ) (Figs. 6.10 y 6.11).

### 6.5.5. Resultados a 7 días

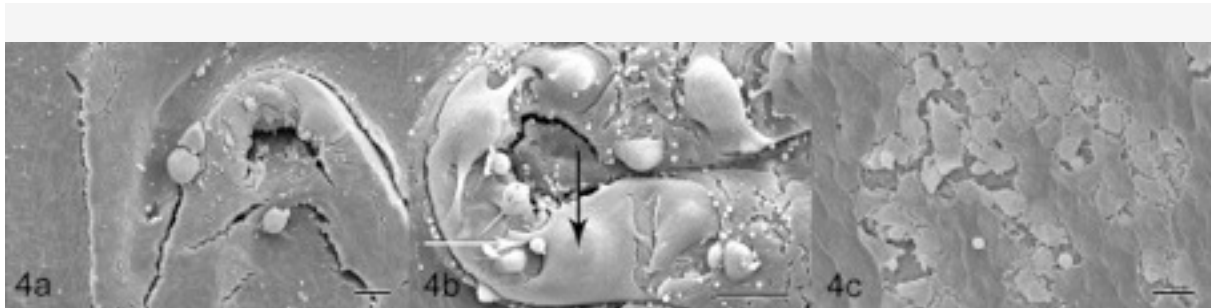
Se comprobaba la presencia de una capa endotelial homogénea, que cubría la mayoría de la estructura metálica de cada dispositivo. Los cúmulos de fibrina o células gigantes se observaron sobre los pocos *struts* aún no recubiertos de células endoteliales. La tasa de endotelización de los SMC fue casi completa en los SA ( $95 \pm 4\%$ ) y SCC ( $98 \pm 4\%$ ), mientras los SLT mostraron una tasa relativamente elevada ( $79 \pm 9\%$ ), pero significativamente menor que los SMC ( $p=0.01$ ) (Figs. 6.12 y 6.13). La Fig. 6.14 resume las tasas de endotelización de los distintos dispositivos analizados en relación con el tiempo.



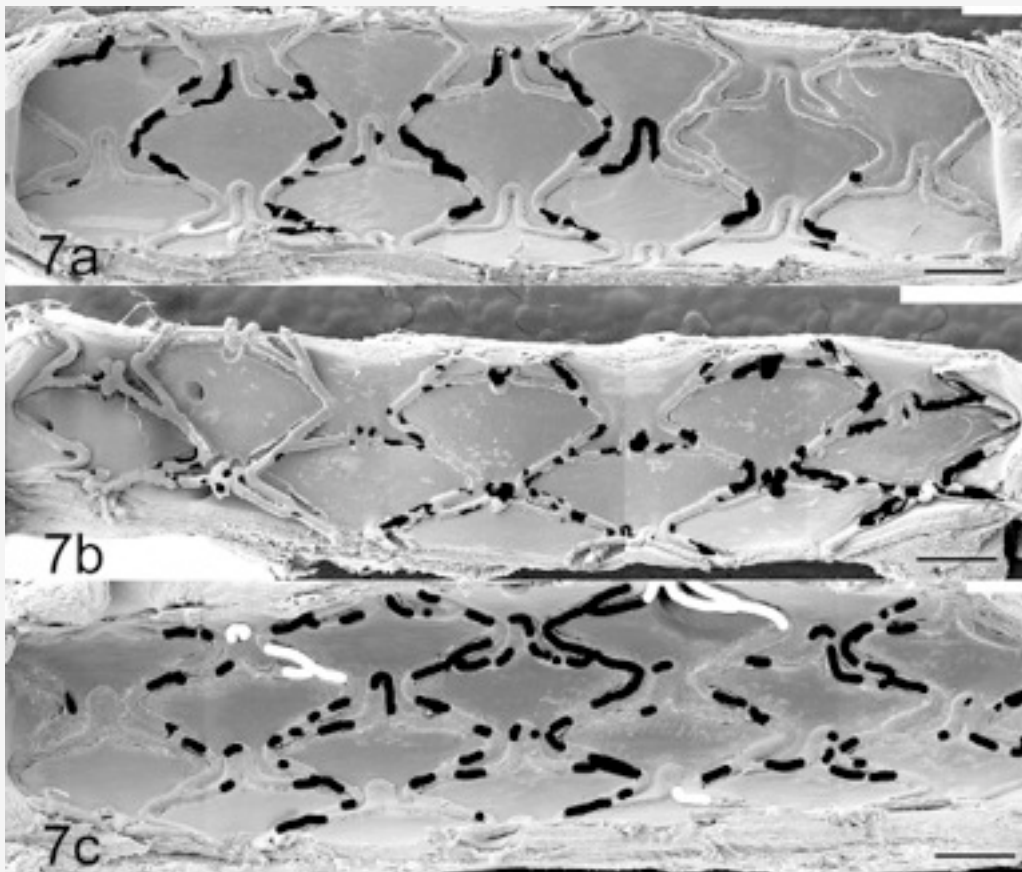
**Figura 6.8– Resultados a 1 día.** En el panel de la izquierda se observan escasas células endoteliales que comienzan a cubrir los *struts* desde los bordes (flecha negra); barra = 100  $\mu\text{m}$ . En el panel central se aprecia la superficie metálica del *stent* prácticamente desnuda, con áreas cubiertas de fibrina (flecha blanca); barra = 100  $\mu\text{m}$ . En el panel derecho se observa un abundante componente de células inflamatorias; barra = 20  $\mu\text{m}$ .



**Figura 6.9– Resultados a 1 día.** Endotelización de SA (panel superior), SCC (panel central) y SLT (panel inferior). Las áreas blancas marcan *struts* descubiertos, las áreas negras representan *struts* recubiertos por fibrina o células gigantes. Barras = 1mm.



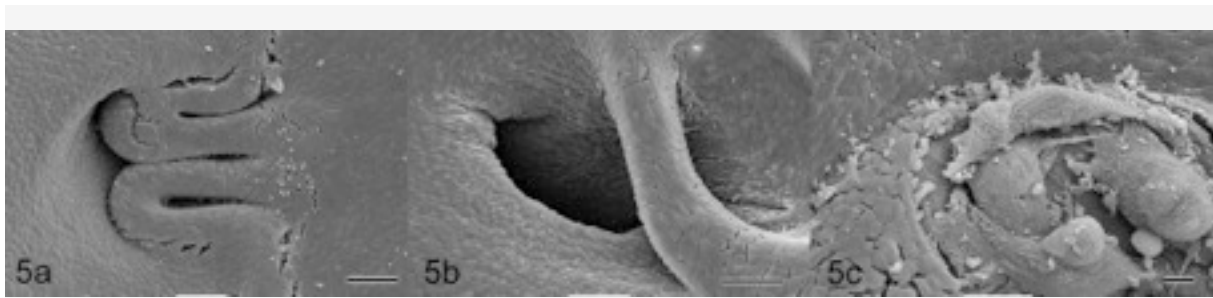
**Figura 6.10– Resultados a 3 días.** En la imagen izquierda, la capa endotelial cubre un área mayor con menor grado de inflamación; barra = 100  $\mu$ m. En la imagen central se observan células gigantes de diferentes formas y tamaños sobre zonas desnudas de células endoteliales (flechas blanca y negra); barra = 100  $\mu$ m. En la imagen



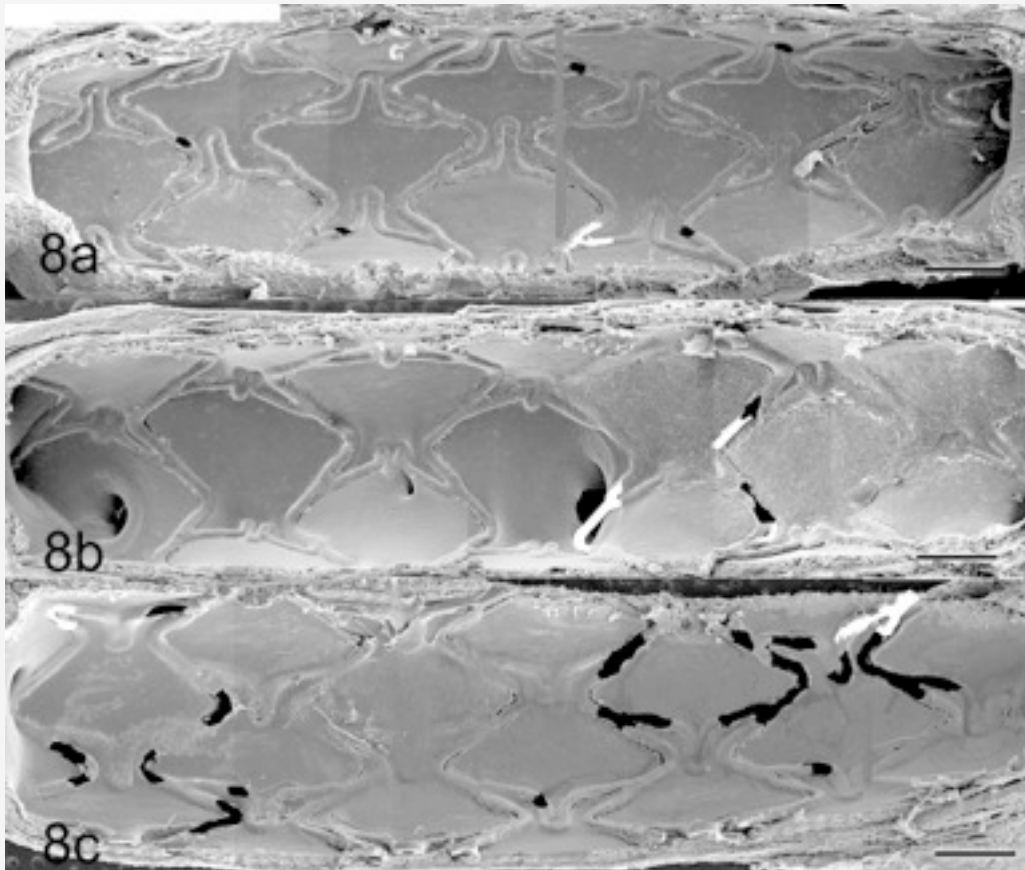
derecha se puede apreciar como no se han establecido uniones intercelulares maduras; barra = 20  $\mu$ m.

**Figura 6.11– Resultados a 3 días.** Endotelización de SA (panel superior), SCC (panel central) y SLT (panel inferior). Las áreas blancas marcan *struts* descubiertos, las áreas negras representan *struts* recubiertos por fibrina o células gigantes. Barras = 1mm.





**Figura 6.12– Resultados a 7 días.** En la imagen izquierda se aprecia capa endotelial prácticamente completa; barra = 100  $\mu\text{m}$ . En la imagen central las células endoteliales están presentes incluso cuando los *struts* no están apuestos a la pared vascular, flotando sobre el origen de una pequeña rama lateral; barra = 100  $\mu\text{m}$ . En la imagen derecha aparecen células gigantes y restos de fibrina en los escasos espacios no recubiertos por células endoteliales; barra = 20  $\mu\text{m}$ .



**Figura 6.13– Resultados a 7 días.** Endotelización de SA (panel superior), SCC (panel central) y SLT (panel inferior). Las áreas blancas marcan *struts* descubiertos, las áreas negras representan *struts* recubiertos por fibrina o células gigantes. Barras = 1mm.

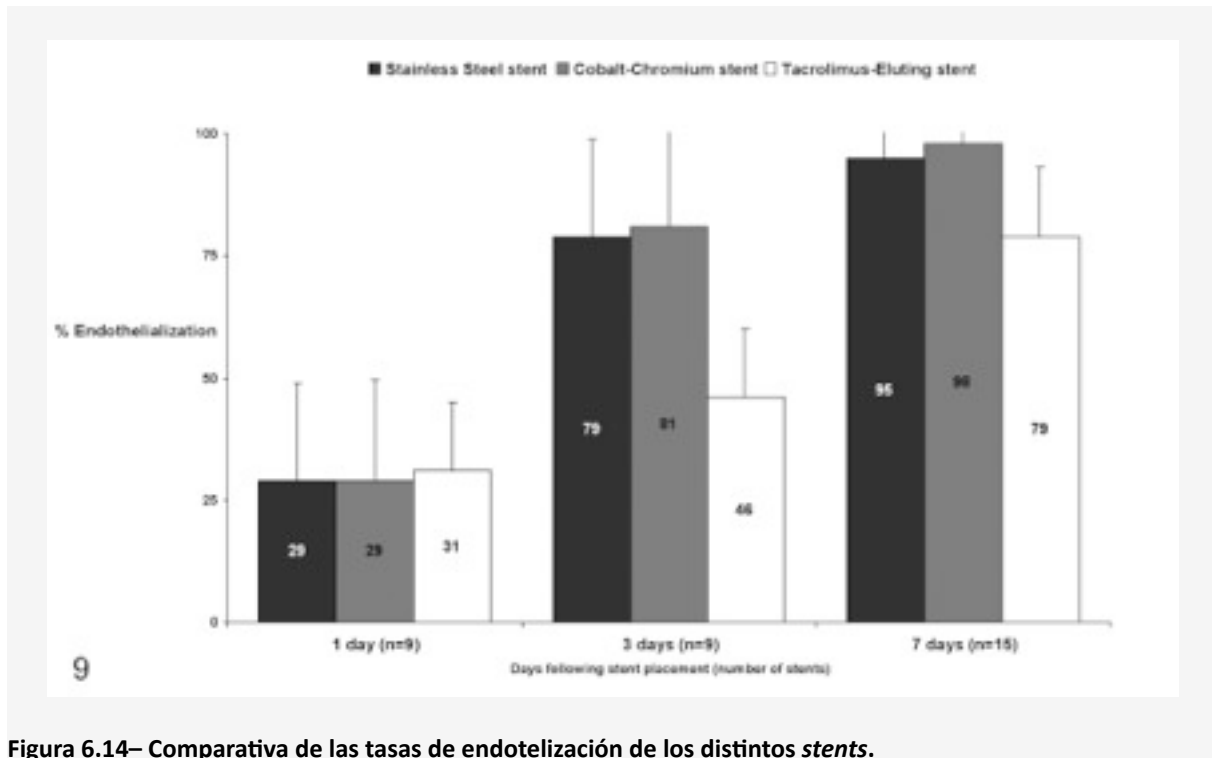


Figura 6.14– Comparativa de las tasas de endotelización de los distintos *stents*.

## 6.6. Artículo nº 6

### ***Endothelialization of nonapposed stent struts located over the origin of a side branch.***

**Perez de Prado A**, Perez Martinez C, Cuellas Ramon C, Gonzalo Orden JM, Altonaga JR, Garcia Iglesias MJ, Regueiro M, Orden MA, Garcia Marin JF, Fernandez–Vazquez F.

*J Interv Cardiol.* 2009;22:222–227

Impact Factor 2010 (JCR) 1.387, (nº75 de 114=Q3). H index 2009 34, (Q1).

### 6.6.1. Procedimientos

Todos los animales sobrevivieron al procedimiento de implante de *stents* y completaron el seguimiento programado. En total, se colocaron 33 *stents* (n=9 en el grupo de 1 día, n=9 en el grupo de 3 días y n=15 en el grupo de 7 días de seguimiento), alcanzando una relación *stent* / arteria de  $1.16 \pm 0.06$ , sin diferencias entre los *stents* (p=0.87). No hubo episodios de trombosis subaguda del *stent*.

De los 33 *stents*, 25 mostraban al menos un *strut* localizado sobre el origen de una rama lateral; 44 ramas (con área media del ostium de  $0.8 \pm 0.6 \text{ mm}^2$ , rango 0–4 ramas por *stent*) aparecieron parcialmente cubiertas por los *struts*. La presencia de ramas cubiertas fue más común entre los *stents* colocados en la arteria descendente anterior (73%) que en las otras arterias (41%, p=0.014), lo que refleja el mayor número de ramas laterales de esta arteria coronaria.

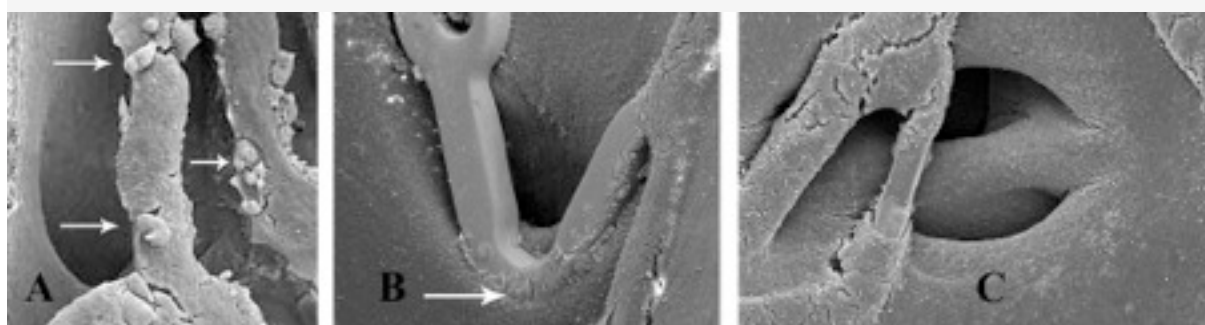
### 6.6.2. Resultados

Se observaron diferentes patrones de endotelización, desde la total ausencia de células endoteliales sobre los *struts* a la completa endotelización de todos ellos. En la mayoría de las muestras se identificó una cobertura parcial por células endoteliales. Ninguno de los *struts* localizados sobre el origen de ramas laterales estaba endotelizado al día de seguimiento; a los 3 días, el  $35 \pm 23\%$  de la superficie de los *struts* localizados sobre ramas laterales estaba endotelizado (Fig. 6.15); a los 7 días, la tasa de endotelización de estos *struts* era de  $73 \pm 41\%$

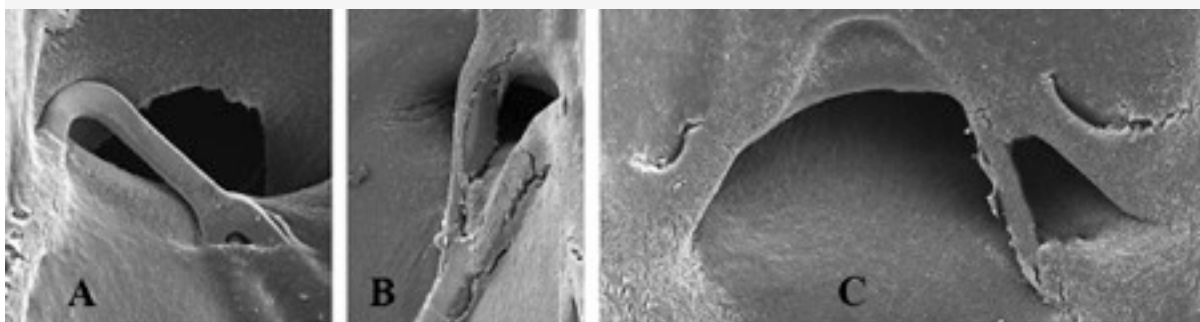
( $p=0.023$ ) (Fig. 6.16). Aunque los SLT mostraban un menor grado de endotelización de los *struts* situados sobre las ramas laterales ( $35 \pm 46\%$ ) que los SMC ( $55 \pm 43\%$ ), la diferencia global no fue significativa ( $p=0.2$ ). La Tabla 6.3 resume las tasas de endotelización en la superficie de los *struts* situados sobre ramas laterales y en la superficie total de los *stent* en relación con el tiempo transcurrido desde la implantación del dispositivo.

**Tabla 6.3– Tasa de endotelización de la superficie de los *struts* colocados sobre el origen de ramas laterales y de la superficie total del *stent*. \*  $p<0.05$ , SLT vs. SA/SCC.**

	Struts sobre ramas	Stent global
<b>1 día</b>		
SA	0	$31 \pm 30\%$
SCC	0	$31 \pm 30\%$
SLT	0	$27 \pm 23\%$
<b>3 días</b>		
SA	$39 \pm 10\%$	$79 \pm 17\%$
SCC	$49 \pm 27\%$	$81 \pm 18\%$
SLT	$9 \pm 13\%$	$46 \pm 10\% *$
<b>7 días</b>		
SA	$88 \pm 30\%$	$95 \pm 5\%$
SCC	$76 \pm 43\%$	$98 \pm 1\%$
SLT	$57 \pm 50\%$	$79 \pm 9\% *$



**Figura 6.15– Ejemplos de endotelización parcial a los 3 días del implante. Panel A, SCC: alto grado de endotelización, presencia de células gigantes (Flecha). Panel B, SLT: la cobertura endotelial comienza en los bordes de los *struts* (Flecha). Panel C, SA: endotelización parcial de los *struts* localizados sobre el ostium de rama lateral.**



**Figura 6.16– Ejemplos de endotelización a los 7 días del implante. Panel A, SCC: ausencia de endotelización. Panel B, SLT: endotelización parcial. Panel C, SA: endotelización completa de los *struts* localizados sobre el ostium de rama lateral.**

No se encontraron asociaciones entre la endotelización y la relación *stent* / arteria o localización coronaria. En cambio, se detectó relación de la tasa de endotelización de los *struts* localizados sobre el origen de las ramas laterales con la relación de área del *strut* / área del ostium ( $r^2$  0.12,  $p = 0.04$ ) y la tasa de endotelización del *stent* global ( $r^2$  0.58,  $p = 0.0002$ ). En el análisis multivariado se demostró que el único predictor de la endotelización de los *struts* localizados sobre el origen de las ramas fue la tasa de endotelización de todo el *stent* ( $p = 0.03$ ) (Tabla 6.4).

**Tabla 6.4– Variables asociadas con la tasa de endotelización de los *struts* localizados sobre el origen de ramas.**

Variable	% endotelización	p (univariado)	p (multivariado)
<b>Arteria coronaria</b>	DA $42 \pm 11\%$	0.7	–
	Cx $57 \pm 14\%$		
	CD $50 \pm 16\%$		
<b>Stent</b>	SA $57 \pm 12\%$	0.44	–
	SCC $53 \pm 14\%$		
	SLT $35 \pm 13\%$		
<b>Ratio <i>stent</i> / arteria</b>	$r^2 = 0.003$	0.7	–
<b>Ratio % endotelización <i>strut</i> / área del ostium</b>	$r^2 = 0.1$	0.06	–
<b>% endotelización del <i>stent</i> global</b>	$r^2 = 0.58$	0.0002	0.03
<b>Ratio metal / área del ostium</b>	$r^2 = 0.12$	0.04	0.52



## 6.7. Artículo nº 7

### **Análisis pre-clínico de la eficacia y seguridad de distintos balones liberadores de paclitaxel.**

*Safety and efficacy of different paclitaxel-eluting balloons in a preclinical model.*

**Pérez de Prado A**, Pérez-Martínez C, Cuellas C, Regueiro M, Diego A, Gonzalo-Orden JM, Molina M, Gómez A, Duocastella L, Fernández-Vázquez F.

**Rev Esp Cardiol** 2013. *Aceptado para su publicación.*

**Impact Factor 2012 (JCR) 3.204, (nº38 de 122=Q2-T1). H index 39, (Q2).**

### 6.7.1. Procedimientos

Todos los *stents* se implantaron y sobredilataron con BLP asignados según el protocolo. Durante los procedimientos se produjeron 4 complicaciones transitorias sin relación con los dispositivos analizados: 1 embolia aérea en coronaria izquierda por insuficiente purgado del catéter que se resolvió con infusión de amins y oxígeno al 100% y 3 casos de trombosis coronarias distales provocadas por retraso en la administración de heparina o dosis insuficiente de ésta que se resolvieron con trombectomía. En ninguno de los casos se observó afectación final del dispositivo implantado y sobredilatado, conservándose permeables con buen flujo. La ratio de sobredilatación *stent* / arteria obtenida en estas fases alcanzó el objetivo programado,  $1.21 \pm 0.14$ , sin diferencias significativas entre arterias o los distintos grupos de tratamiento. En los balones extraídos tras el tratamiento se midieron muy pequeñas cantidades de paclitaxel respecto al cargado inicialmente: BLP1,  $1.04 \pm 1.47\%$ ; BLP2,  $0.46 \pm 0.56\%$ ; y BLP3,  $4.79 \pm 3.40\%$ , sin diferencias significativas entre ellos.

Los animales completaron el seguimiento según lo previsto, realizándose los controles angiográficos y análisis histológicos programados sin incidencias. En el análisis angiográfico final todos los segmentos tratados estaban permeables. En la necropsia se identificaron pequeñas zonas de infarto no transmural en los 4 animales que presentaron complicaciones durante el procedimiento; el resto de las muestras cardiacas no presentó alteraciones relevantes.

### 6.7.2. Análisis de eficacia anti-proliferativa

Se observaron diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ) entre el balón control y los distintos BLP, tanto en la pérdida tardía (*late loss*,  $1.33 \pm 0.5$  vs.  $0.4 \pm 0.42$  mm) como en el porcentaje de estenosis por angiografía ( $33.5 \pm 17.8$  vs.  $9.4 \pm 11.8\%$ ), Figura 6.17. Las diferencias entre los distintos sistemas BLP o según el tiempo de hinchado (1 o 2 minutos) no eran significativas (Tabla 6.5).

Tabla 6.5– Resultados angiográficos iniciales y a los 28 días

	Control (n=10)	BLP 1 (n=15)	BLP 2 (n=16)	BLP 3 (n=10)	BLP vs control	p Entre BLP
<b>Diámetro arteria (mm)</b>	$2.56 \pm 0.33$	$2.55 \pm 0.31$	$2.57 \pm 0.32$	$2.66 \pm 0.43$	0.87	0.75
<b>DLM inicial (mm)</b>	$3.17 \pm 0.35$	$3.05 \pm 0.41$	$3.08 \pm 0.31$	$3.12 \pm 0.40$	0.47	0.88
<b>Presión <i>stent</i> (atm)</b>	$13.7 \pm 3.0$	$13.9 \pm 3.3$	$15.1 \pm 2.3$	$14.8 \pm 2.4$	0.36	0.47
<b>Presión balón (atm)</b>	$12.0 \pm 4.2$	$12.3 \pm 3.3$	$13.0 \pm 3.6$	$14.2 \pm 2.9$	0.40	0.40
<b>Relación balón / arteria</b>	$1.25 \pm 0.16$	$1.20 \pm 0.13$	$1.21 \pm 0.11$	$1.20 \pm 0.20$	0.35	0.98
<b>DLM seguimiento (mm)</b>	$1.84 \pm 0.63$	$2.61 \pm 0.59$	$2.77 \pm 0.48$	$2.66 \pm 0.48$	$<0.0001$	0.70
<b>DRef seguimiento (mm)</b>	$2.75 \pm 0.47$	$2.88 \pm 0.40$	$2.99 \pm 0.42$	$3.05 \pm 0.42$	0.17	0.44
<b>Pérdida tardía (mm)</b>	$1.33 \pm 0.50$	$0.44 \pm 0.53$	$0.31 \pm 0.30$	$0.46 \pm 0.41$	$<0.0001$	0.49
<b>% estenosis angiográfica</b>	$33.5 \pm 17.8$	$9.6 \pm 15.1$	$7.7 \pm 7.8$	$11.9 \pm 12.2$	$<0.0001$	0.69

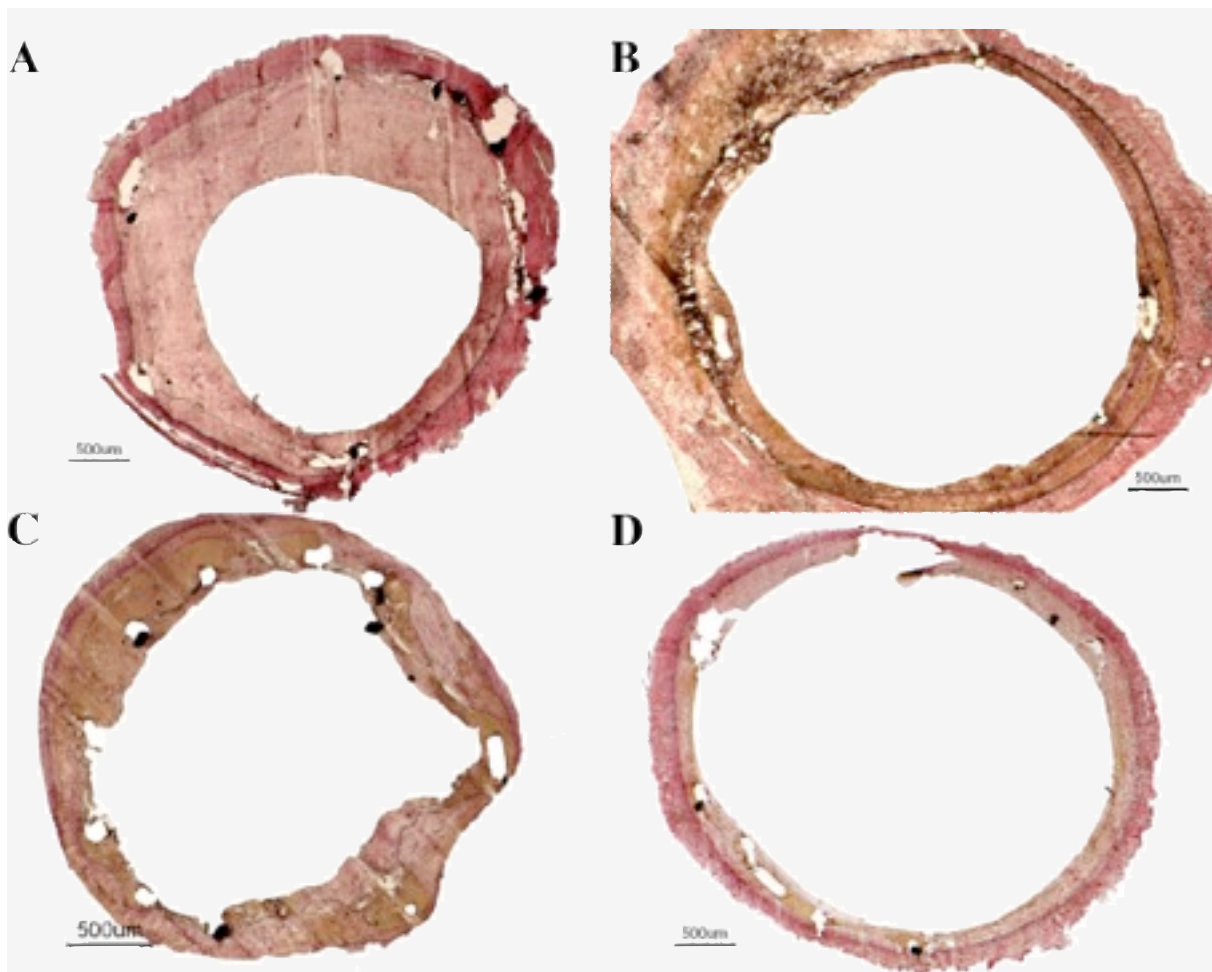
Se analizaron adecuadamente por histomorfometría todos los segmentos arteriales para un total de 153 secciones. De forma concordante con los resultados angiográficos, se apreciaron mejores resultados de reestenosis ( $p < 0.0001$ ) con los distintos BLP que con el control. No se detectan diferencias entre los distintos BLP ni en función del tiempo de hinchado (Tabla 6.6).



Tabla 6.6– Resultados histológicos a los 28 días

	Control	BLP 1	BLP 2	BLP 3	p	
	(n=10)	(n=15)	(n=16)	(n=10)	BLP vs control	Entre BLP
<b>Área neointimal (mm<sup>2</sup>)</b>	3.4 ± 1.2	1.5 ± 0.7	1.7 ± 0.4	1.9 ± 0.8	<0.0001	0.18
<b>% estenosis histológica</b>	51.0 ± 17.9	20.3 ± 8.4	21.3 ± 5.6	25.6 ± 8.6	<0.0001	0.33
<b>Injury score</b>	0.88 ± 0.56	0.64 ± 0.31	0.51 ± 0.52	0.59 ± 0.56	0.076	0.43
<b>Injury score ≥1</b>	50%	7%	25%	20%	0.042	0.24
<b>Grado de Inflamación</b>	0.89 ± 0.16	0.79 ± 0.34	0.75 ± 0.23	0.91 ± 0.37	0.40	0.22
<b>Grado inflamación ≥1</b>	30%	33%	25%	40%	0.92	0.21
<b>Grado de Fibrina</b>	0.43 ± 0.47	2.26 ± 0.84	2.19 ± 0.51	1.70 ± 0.78	<0.0001	0.08
<b>Grado fibrina ≥1</b>	30%	93%	100%	90%	<0.0001	0.42
<b>% endotelización</b>	99 ± 1	86 ± 11	84 ± 11	93 ± 4	0.0007	0.35
<b>Endotelización ≥95%</b>	100%	40%	12.5%	20%	0.0014	0.35

Se repitieron los análisis estadísticos excluyendo las arterias que habían presentado los eventos mencionados previamente, sin variación significativa en los resultados. Se realizaron análisis multivariados para valorar la potencial contribución de distintos factores conocidos en los valores observados. De forma independiente, se observó menor grado de reestenosis en CD que en DA ( $p < 0.02$ ) y, consistentemente en todos los modelos, con cualquier BLP que con el control ( $p < 0.01$ ), sin diferencias entre los distintos BLP.

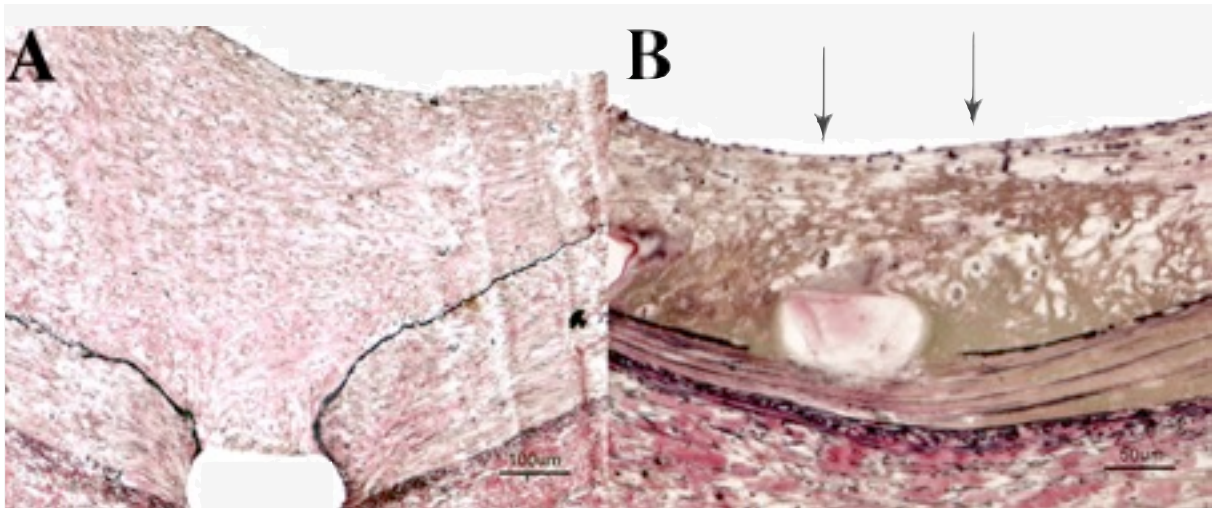


**Figura 6.17– Secciones centrales de distintos *stents* sobredilatados con distintos balones, tinción elastina de Verhoeff–Van Gieson: Balón control (panel A):** Crecimiento neointimal significativo, sin datos de inflamación en profundidad, cobertura endotelial uniforme. **Balones liberadores de paclitaxel, BLP1 – panel B –, BLP2 – panel C – y BLP3 – panel D –:** Escaso crecimiento neointimal, sin datos de inflamación en profundidad, endotelización aceptable.

### 6.7.3. Análisis de la seguridad

El análisis histológico demostró de forma global un grado de daño vascular (*injury score*) bajo, sin diferencias significativas entre los grupos (control  $0.88 \pm 0.56$  vs. todos los BLP  $0.58 \pm 0.46$ ;  $p=0.07$ ). El mismo fenómeno se observa en el grado de inflamación, globalmente muy bajo (control  $0.89 \pm 0.16$  vs. todos los BLP  $0.80 \pm 0.31$ ;  $p=0.4$ ). No se identificó ningún caso de necrosis de la túnica media. Sin embargo, se detectaron 2 diferencias significativas, características de la liberación de paclitaxel (Fig. 6.18):

- la acumulación persistente de fibrina era significativamente mayor en los BLP ( $2.09 \pm 0.73$ , sin diferencias entre ellos) que en el control ( $0.43 \pm 0.47$ ),  $p=0.0001$ .
- el porcentaje de superficie luminal endotelizada era significativamente inferior en los BLP ( $87 \pm 10\%$ , sin diferencias significativas entre ellos) que en el control ( $99 \pm 1\%$ ),  $p=0.0007$ . Se observó re-endotelización TOTAL (cobertura endotelial  $\geq 95\%$ ) en el 100% de los balones control frente a un 40% de los BLP1, un 12.5% de los BLP2 y un 20% de los BLP3.



**Figura 6.18– Detalle de la respuesta arterial, tinción elastina de Verhoeff–Van Gieson: balón control (panel A), muestra un crecimiento neointimal significativo, con endotelización completa de la superficie luminal, sin datos de inflamación y sin restos de fibrina. Balón liberador de paclitaxel, BLP1 (panel B), menor crecimiento neointimal, con aceptable endotelización luminal pero no completa (flechas) y acumulación importante de fibrina alrededor del *stent* en profundidad (color parduzco).**

#### 6.7.4. Protocolo farmacocinético

Las cantidades de paclitaxel detectadas en las arterias tratadas en este grupo de animales muestran un descenso progresivo de las concentraciones desde las primeras determinaciones a los 15–30 minutos con  $212 \pm 32 \mu\text{g/g}$  de tejido hasta las observadas a las 24 horas en las que aún se detecta,  $78 \pm 9 \mu\text{g/g}$  de tejido (Fig. 6.19). No se observaron niveles detectables de paclitaxel en sangre periférica en ningún punto.

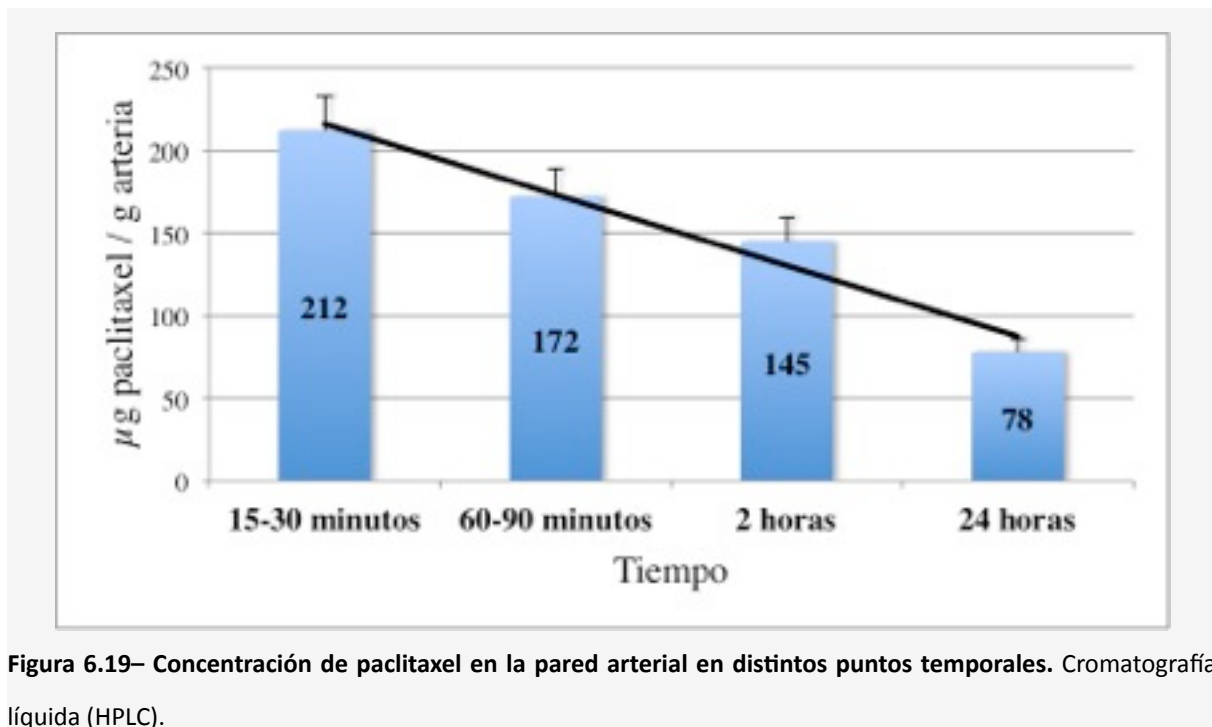


Figura 6.19– Concentración de paclitaxel en la pared arterial en distintos puntos temporales. Cromatografía líquida (HPLC).

## ***DISCUSIÓN***



## 7. DISCUSIÓN

### 7.1. Aspectos generales

El proceso de reparación vascular consecuencia del uso de dispositivos de tratamiento de la enfermedad coronaria engloba distintos aspectos. Partiendo de un mecanismo fisiológico como es la respuesta al daño inducido (inmediato –provocado por el estímulo físico que supone la distensión de la pared vascular o la rotura de la placa aterosclerótica–, persistente –condicionado por el *stent* que continúa sobredistendiendo el vaso– o tardío –consecuencia de la presencia de materiales extraños que pueden estimular la respuesta inflamatoria–), pretende restaurar la normal estructura y función vascular, pero frecuentemente conduce a respuestas “hiper–correctoras” como la excesiva proliferación miointimal. En el intento de abolir ésta, la adición de fármacos antiproliferativos (potentes, pero inespecíficos) es una medida muy efectiva, pero que acarrea un retraso y empeoramiento de la respuesta fisiológica de reparación vascular con consecuencias potencialmente letales a medio y largo plazo. La clásica dicotomía entre eficacia y seguridad de un tratamiento tienen en este caso una particularidad: la conexión entre ambas es muy estrecha, puesto que el desarrollo de ambas viene dado por mecanismos reparadores comunes. Así pues, no existen un modelo experimental de análisis de la eficacia y otro de la seguridad, sino un único modelo que debe analizar los dos aspectos.

La re–endotelización de la superficie luminal tras la denudación provocada por la simple dilatación con balón o por la noxa permanente del *stent* se considera uno de los parámetros más relevantes en el análisis de la reparación vascular. El papel central del endotelio en la homeostasis vascular es clave en este sentido. Y así lo confirman los estudios<sup>127,128</sup> del grupo de Renu Virmani sobre muestras humanas de trombosis de los *stents* que identifican la ausencia de cobertura endotelial como el más potente predictor histológico de la citada complicación. Además, la existencia de *struts* no recubiertos por endotelio se asocia a otras características distintivas de la reparación deficiente, como la persistencia de depósitos de fibrina y de inflamación<sup>70</sup>. La presencia de estructuras no endoteliales sobre los *struts* implica, pues, importantes consideraciones prácticas. Son varios los estudios que han empleado técnicas de imagen, como la OCT<sup>288,290</sup> o la angioscopia<sup>132</sup>, para analizar la endotelización de los *stents* en vivo. Todas ellas centran el análisis en la detección de los

*struts* descubiertos. A la vista de los resultados de algunos de los estudios aquí presentados y otros datos similares<sup>321,322</sup>, es evidente que la presencia de *struts* recubiertos no implica una adecuada endotelización morfológica. Algunos estudios con el análisis de la señal de la OCT en el dominio de la frecuencia ofrecen datos prometedores sobre su capacidad para discriminar las características de la cobertura sobre los *struts*<sup>325,326</sup>.

Además, aún en presencia de una cobertura adecuada de células endoteliales, la madurez funcional de esta capa puede ser deficiente con pérdida de su normal funcionalidad. Ciertos aspectos morfológicos, como la existencia de uniones intercelulares laxas que se evidencia en alguno de nuestros estudios mediante SEM o se manifiesta por la menor expresión de PECAM-1/CD31 en estas conexiones<sup>47,134,372</sup> o tinción de azul de Evans<sup>101,141,300</sup>, son claras manifestaciones de la pérdida de una función endotelial clave, la impermeabilidad. Aunque no se ha demostrado todavía el significado pronóstico de la alteración de la respuesta vasomotora normal, la presencia de una vasoconstricción paradójica a estímulos dependientes del endotelio señala la disfunción endotelial, incluso en territorios en los que el endotelio está morfológicamente preservado (en el vaso proximal y distal a la zona tratada con *stent*). Los nuevos dispositivos, como las endoprótesis reabsorbibles, ya han demostrado una recuperación de la normal función vasomotora cuando la prótesis se reabsorbe, señalando esta respuesta como una de las potenciales ventajas de estos sistemas<sup>373,374</sup>.

La limitación más notable común a todos los estudios es la difícil extrapolación de los datos del modelo animal, joven y sano, al humano, viejo y enfermo; sin embargo, es el recomendado por el documento de consenso<sup>33</sup>. Hay que tener en cuenta también que ningún modelo animal reproduce todas las complejas características de la enfermedad humana y de la respuesta que se obtiene tras el empleo de dispositivos de tratamiento endovascular. Los modelos de animal enfermo (diabéticos, hiperlipémicos por deficiencia genética o inducida, ...) podrían reflejar algunas de las particularidades de la enfermedad aterosclerótica, como la aparición espontánea de zonas de fragmentación de la LEI como parte del proceso global de inflamación de la placa, especialmente en caso de placa vulnerable<sup>375</sup>. Estos modelos también manejan la reproducibilidad de otros factores moleculares o genéticos de los pacientes con aterosclerosis como la mayor presencia de lipoproteínas de baja densidad oxidadas, la hiperglucemia o la hipertensión arterial<sup>26</sup>. Como se detalla en la introducción de esta tesis, asistimos a una plétora de modelos de animal con enfermedad aterosclerótica, de aparición espontánea o provocada, en distintas especies y



con diferentes grados de intervención, hasta las últimas propuestas que describen la creación de un modelo de cerdo miniatura aterosclerótico mediante manipulación genética<sup>376</sup>. Muy probablemente estos modelos acortaran la brecha existente entre los actuales modelos animales y la enfermedad clínica humana, permitiendo así una traslación de los resultados más precisa<sup>39,41,44,377</sup>. No obstante, su validación aún está pendiente por lo que su empleo no está generalizado.

## **7.2. Respuesta vasomotora a distintos vasodilatadores endotelio-dependientes**

Los principales hallazgos del estudio nº 2 son: (1) diferentes agentes vasodilatadores dependientes del endotelio inducen grados ampliamente variables de vasoconstricción paradójica en segmentos arteriales con endotelio parcialmente denudado; (2) dosis elevadas de ACh inducen frecuentemente vasoespasmo severo; (3) los cambios hemodinámicos no presentan relación con los cambios en el calibre del vaso.

### **7.2.1. Disfunción vasomotora y SFA**

La respuesta vasomotora anormal a distintos estímulos vasodilatadores dependientes del endotelio en los modelos animales se ha confirmado después del implante de SLS<sup>133,139,153</sup> y SLP<sup>133,136,139,161,162</sup>. Los SLZ<sup>159,160</sup> y SLB<sup>158,159</sup> podrían demostrar mejores resultados en términos de función vasomotora dependiente del endotelio que los SFA de 1ª generación. Se ha comprobado que las arterias coronarias previamente tratadas con SFA muestran tanto respuestas vasomotoras anormales como características morfológicas de disfunción endotelial, así como una expresión reducida de la sintetasa endotelial de óxido nítrico (eNOS)<sup>133</sup> y marcadores de estrés oxidativo<sup>162</sup>. Sin embargo, la conexión entre los marcadores morfológicos de madurez endotelial, como la expresión de eNOS, y la respuesta vasomotora a la ACh es discutible<sup>378</sup>.

### **7.2.2. Vasodilatadores endotelio-dependientes**

Para analizar la respuesta vasomotora dependiente del endotelio se han empleado diferentes metodologías. La ACh es uno de los agonistas más empleados en la investigación

clínica humana<sup>154-157</sup>; si bien la utilidad de este fármaco en el modelo de arterias porcinas es motivo de debate, puesto que la presencia de receptores muscarínicos en estos vasos es limitada por lo que la ACh no induciría una vasodilatación suficiente<sup>133,304,305</sup>. Sin embargo, otros autores han demostrado diferencias significativas en la respuesta vasomotora empleando ACh tras el implante de distintos SFA<sup>161,306</sup>. Los resultados presentados en este trabajo junto a datos previos de nuestro grupo<sup>378</sup> apoyan el valor de la ACh como inductor de vasoconstricción paradójica relacionada con la disfunción endotelial. Y aunque la dosis más elevada de ACh utilizada (40 µg) es más baja que la usada en protocolos humanos<sup>156,157</sup>, se ha relacionado con una elevada incidencia de vasoespasmo oclusivo, sugiriendo sobredosificación en este modelo animal. Otra potencial interpretación de estos resultados es la de una respuesta espástica inespecífica. La extrapolación al escenario clínico humano debe ser realizada con precaución, puesto que algunos autores han empleado este fármaco para inducir espasmo en arterias coronarias “sin lesiones significativas”<sup>379,380</sup>.

La serotonina es otra de las sustancias que ha sido empleada como vasodilatador dependiente del endotelio<sup>58,151</sup> o en modelos de vasoespasmo<sup>303,379,381,382</sup>. Sin embargo, algunos resultados obtenidos tras su empleo han resultado ser conflictivos puesto que apuntan a una acción preferente de la serotonina sobre las CML causando su hipercontracción por encima de su efecto vasodilatador dependiente del endotelio<sup>302</sup>. Nuestros datos no ofrecen resultados concluyentes a este respecto, con calibres arteriales similares a los valores basales y sólo ligeramente inferiores a los observados tras máxima vasodilatación. En este caso, el empleo de una dosis subóptima podría ser la explicación de estos hallazgos.

El ejercicio es un estímulo fisiológico vasodilatador dependiente del endotelio y así se ha usado en ensayos clínicos<sup>150,163</sup>. La estimulación auricular rápida también se ha usado por otros autores para reproducir algunos de los cambios hemodinámicos inducidos por ejercicio, en concreto la taquicardia<sup>158,159</sup>. Con estos antecedentes, decidimos emplear isoproterenol, un agente β-mimético, en nuestro estudio, puesto que induce rápida aceleración de la frecuencia cardíaca y vasodilatación endotelio-dependiente<sup>383,384</sup>. Los resultados observados en nuestra serie son similares a los obtenidos tras la administración de serotonina, con mínimos cambios del calibre arterial.

### 7.2.3. Limitaciones del estudio

Aunque se han empleado métodos validados, los fármacos y las dosis empleadas en este ensayo no cubren el espectro completo de posibilidades presente en la literatura publicada. No podemos descartar la sobredosificación o infradosificación o el haber excluido el mejor agente vasodilatador (como sustancia-P, bradiquinina, endotelina-1) en nuestro diseño. La implantación directa de *stent* en el modelo porcino de coronarias sanas es uno de los métodos más empleados para analizar la respuesta vasomotora a los SFA. Como se describe en la metodología del estudio nº 2, hemos observado que sólo induce una denudación endotelial focal y parcial. Aunque este hecho puede percibirse como una limitación, esta situación también reproduce el estado de la reparación vascular tras el implante de SFA a largo plazo con re-endotelización incompleta.

### 7.3. Análisis cuantitativo de la inflamación luminal inducida por distintos *stents*

El novedoso método de análisis cuantitativo descrito en el original nº 3 muestra escasa variabilidad y ofrece resultados en una escala cuantitativa, lo que permitiría comparar la respuesta a distintos dispositivos de forma más detallada que el simple método semicuantitativo recomendado en los documentos metodológicos de consenso<sup>32,33</sup>.

Algunos autores<sup>67</sup> han comunicado la diferente respuesta a largo plazo que observaron entre dos SFA de 1ª generación (Cypher® y Taxus®) en el modelo porcino: la respuesta inflamatoria en profundidad y la deposición de fibrina distingue a ambos *stents*. El análisis de la inflamación luminal proporciona la posibilidad de completar el estudio de la respuesta a los SFA con los fenómenos que tienen lugar en la interfase *stent*-luz arterial, esencial para la posterior endotelización<sup>47</sup>. De hecho, en este estudio se observa una significativa correlación inversa entre la intensidad de la respuesta inflamatoria y el porcentaje de superficie del *stent* endotelizada.

Un hallazgo reseñable es el patrón temporal de inflamación, decreciente en los SMC y creciente en los SFA. En nuestros resultados, la liberación del fármaco puede jugar un papel relevante, al tratarse de análisis a muy corto plazo. Sin embargo, la persistencia de estos fenómenos a muy largo plazo en otros estudios<sup>33,47,67</sup> parecen apoyar el papel causal de los

polímeros empleados. El papel que pudiera desempeñar el polímero P5® en un potencial aumento de la respuesta inflamatoria no puede determinarse con los datos aquí presentados, pero hallazgos previos<sup>263</sup> no sustentan esa relación.

La falta de correlación de los hallazgos con otras técnicas de análisis (histopatología) puede ser percibida como una limitación. Sin embargo, creemos que el método descrito, más que sustituir, complementa la información obtenida por otros medios. Queda por definir el papel que otros fármacos antiproliferativos pueden desempeñar en la respuesta inflamatoria descrita.

## 7.4. Validez de los modelos experimentales de reestenosis: los resultados de eficacia dependen del daño vascular

### 7.4.1. Modelo experimental

A pesar de que el daño vascular provocado en los modelos experimentales de arterias sanas difiere del provocado en las arterias ateroscleróticas humanas, los estudios experimentales señalan una importante relación entre inflamación, daño vascular y crecimiento neointimal, al igual que sucede en las arterias coronarias humanas<sup>29,286</sup>. Los resultados histológicos del estudio nº 4 confirman que la respuesta proliferativa observada es proporcional al daño vascular provocado por la sobreexpansión del *stent*.

### 7.4.2. Daño vascular

El hallazgo más interesante de este estudio es la relación encontrada entre la profundidad del daño vascular provocado por el *stent* y la reacción proliferativa de la íntima o, lo que es lo mismo, entre el *injury score* y la reestenosis. El daño arterial se gradúa en este protocolo como *injury score*  $\leq 1$  en un 55% de los casos y como *injury score*  $\geq 2$  en un 45%. En esta línea, nuestros datos están de acuerdo con los publicados por Gunn *et al.*<sup>285</sup> que mostraron, en modelo porcino, que la compresión de la capa media con integridad de la LEI era más frecuente que daños vasculares más profundos. Según esta teoría, esta compresión de la túnica media debe considerarse como el estímulo global más importante tras el daño vascular de grado moderado y, lo que es más trascendente, tiene una correlación positiva con la intensidad de la respuesta de formación de neoíntima. Nuestros resultados confirman,

pues, que la variabilidad de la respuesta proliferativa es proporcional al grado de daño vascular, a pesar de que en el grupo de SFA esta respuesta se encuentre atenuada.

La explicación de los posibles mecanismos por los que la compresión de la túnica media induciría proliferación neointimal se centra en que el impacto del *stent* sobre la pared comprime las células musculares lisas alrededor de cada *strut*, pudiendo llegar a causar atrofia de la media y, como consecuencia, muerte celular, por necrosis o por apoptosis, lo que puede desencadenar los procesos biológicos de cicatrización que conducen a la formación de neointima. Otra posibilidad es que la presión ejercida por los *struts* sobre la pared vascular sea transmitida célula a célula por moléculas de adhesión o integrinas intracitoplasmáticas que pueden activar quinasas o metaloproteasas que conducen a la proliferación neointimal y/o a la formación de tejido conectivo<sup>201,385,386</sup>.

#### **7.4.3. Eficacia de los *stents* farmacoactivos**

El grupo de SFA tuvo una respuesta proliferativa significativamente menor que el grupo de SMC, referido a un incremento de la luz del vaso y una reducción en el área neointimal y de la reestenosis. No obstante, al comparar los *stents* con o sin fármaco en función del grado de daño vascular, las diferencias significativas en las variables de proliferación sólo aparecen en el subgrupo de mayor daño vascular. Así, al analizar independientemente cada grupo, el de SMC mostró diferencias significativas en las variables de proliferación en función del daño vascular, pero no así el grupo con fármaco. Un estudio recientemente publicado<sup>387</sup>, realizado en humanos tras el tratamiento con SFA, mostró ausencia de relación entre el grado de daño arterial analizado mediante IVUS y la respuesta proliferativa. Esto refuerza la conclusión de que la presencia de fármaco en el dispositivo implantado inhibe eficazmente la respuesta proliferativa desencadenada por la agresión vascular, de manera que tras el implante de SFA no se encuentran diferencias en cuanto a reestenosis entre los grupos con o sin rotura de la LEI. Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, en nuestro estudio podemos afirmar que el SLP analizado es significativamente superior al SMC en términos globales de eficacia antiproliferativa, con una reducción del 55% de la hiperplasia neointimal y del 52% de la estenosis; sin embargo, cuando existe integridad de la LEI, no se aprecia un beneficio significativo con respecto al SMC.

Al aplicar los modelos de análisis multivariable a los datos obtenidos en este modelo, comprobamos que la respuesta proliferativa de los SFA en función del daño vascular no guarda el mismo grado de proporcionalidad que los SMC, pues a partir de un punto de corte definido por la rotura de la LEI, la respuesta proliferativa está marcada no por el grado de daño vascular, sino por la eficacia antiproliferativa del fármaco. Esta observación, aparentemente obvia, conlleva implicaciones clínicas y de eficiencia considerables, pues aunque en la práctica clínica no es una situación frecuente, cuando existe integridad de la LEI no existiría un beneficio adicional significativo con el uso de SFA.

Si se consideran estos datos a la hora de diseñar los estudios experimentales preclínicos, el grado de daño vascular durante el implante debe ser minuciosamente evaluado para tener en cuenta su posible modificación de la reacción proliferativa de la íntima. Algunos autores señalan que la integridad de la LEI ejerce de barrera y previene la migración de las CML o sus progenitoras y que con su rotura se perdería esta función<sup>388,389</sup>. Hasta hace poco se admitía que la reestenosis condicionaba un cambio fenotípico de las CML, desde células contráctiles hacia células con capacidad de síntesis. Sin embargo, día a día se incrementa la evidencia de que los componentes celulares de la neoíntima se originan desde los miofibroblastos adventiciales<sup>389-392</sup> o de células madre derivadas de la médula ósea que migran a través de la adventicia a las capas media e íntima<sup>391,393</sup>, por lo que parece lógico suponer que, a mayor proximidad de la agresión vascular a esta zona, mayor sea el estímulo proliferativo. Es posible que en el futuro estas observaciones lleven la investigación sobre SFA hacia la búsqueda de distintos mecanismos de liberación del fármaco que puedan hacerlo más efectivo.

### **7.5. Cronología y caracterización celular de la re–endotelización de distintos *stents***

Los resultados del estudio nº 5 demuestran que el modelo empleado es útil para detallar la cronología de re–endotelización tras el implante de distintos *stents* y caracterizar la respuesta celular inducida. Los hallazgos más importantes son la completa endotelización de los SMC a los 7 días (sin diferencias entre los *stents* de acero inoxidable y de cromo–cobalto, aunque el espesor de los *struts* es notablemente superior en los primeros), la aceptable pero

significativamente menor grado de endotelización de los SLT y la progresiva disminución de la respuesta inflamatoria.

### 7.5.1. Cronología de la endotelización en SMC y SFA

En nuestro modelo, los SMC muestran endotelización completa a los 7 días; mientras que Finn *et al.*<sup>69</sup> demostraron un grado similar de endotelización 14 días después del implante de distintos *stents* de cromo-cobalto en el modelo porcino. En el modelo de arterias ilíacas de conejo, la endotelización completa de estos dispositivos no se observa hasta los 28 días tras su colocación<sup>47,69</sup>. Estas diferencias entre los resultados obtenidos en cerdos y conejos pueden explicarse por la distinta susceptibilidad y reacción al daño vascular de las especies animales, así como por las diferencias estructurales de las arterias empleadas<sup>32,33,44</sup>. Las discrepancias entre nuestros resultados y los previamente comunicados en el modelo porcino<sup>47,69,130</sup> pueden deberse a diferencias metodológicas como la mayor denudación endotelial causada por la dilatación previa con balón realizada en los modelos anteriormente comunicados y por el potencial papel favorecedor de la reparación del recubrimiento con Carbofilm<sup>®239,245,246</sup> de los dispositivos empleados en nuestro estudio. La relación *stent* / arteria obtenida en los distintos análisis también podría desempeñar un importante papel: Finn *et al.*<sup>69</sup> no detallan esta relación. Es bien conocido que mayores grados de sobredilatación causan mayor daño vascular y, consecuentemente, más reestenosis<sup>29,285</sup>; sin embargo, no está tan claro que un mayor daño vascular también se correlacione con re-endotelización más rápida<sup>32,33</sup>. Por ello, para evitar respuestas potencialmente hiperproliferativas, en nuestro ensayo sólo se ha empleado una sobredimensión de los dispositivos de ligera a moderada.

El grado de endotelización de los SLT (Janus<sup>®</sup> Carbostent) a los 7 días ( $79 \pm 9\%$ ) es notablemente superior a la obtenida previamente, aunque las diferencias metodológicas descritas hacen difícil comparar estos resultados con otros publicados anteriormente<sup>46</sup>. Joner *et al.*<sup>47</sup> detallan los grados de endotelización de distintos SFA a los 14 días en un modelo de ilíacas de conejo:  $64 \pm 27.5\%$  (SLE),  $30.2 \pm 14.2\%$  (SLZ),  $26.8 \pm 15.8\%$  (SLP) y  $6.4 \pm 4.2\%$  (SLS). Hubo que esperar a los 28 días para observar tasas de endotelización superiores al 60% con SLS, SLP o SLZ. Sin embargo, otros autores han demostrado endotelización completa en el modelo de coronarias porcinas con SLP a los 20 días, con un grado de endotelización elevado

a los 10 días<sup>394</sup>. Por lo tanto, los distintos modelos animales y metodologías empleadas en los ensayos hacen difícil establecer comparaciones directas entre los resultados.

### 7.5.2. Caracterización de la respuesta celular

Uno de los objetivos principales del estudio nº 5 fue la caracterización de la respuesta celular a la implantación de *stents*. Un día tras la implantación del *stent*, el dispositivo se encuentra desnudo o recubierto por una fina capa de fibrina y plaquetas, con una reacción inflamatoria moderada. A los 3 días, el tipo celular predominante es inflamatorio, incluyendo linfocitos, macrófagos y escasas células gigantes multinucleadas. La presencia de células gigantes se ha descrito previamente<sup>394</sup>, si bien su papel en el proceso de endotelización aún no ha sido aclarado. Su presencia bien podría ser un fenómeno temporal, fruto de la unión de macrófagos incapaces de llevar a cabo la digestión completa de ciertas sustancias como se evidencia en otras situaciones. La presencia de células gigantes es similar en los tres grupos analizados. A los 7 días, las áreas no endotelizadas del *stent* están cubiertas por células gigantes con escasos linfocitos, monocitos y neutrófilos. Podemos analizar 2 fenómenos relevantes de estos hallazgos: (1) la evolución de la respuesta inflamatoria y (2) la contribución de las distintas estructuras celulares y no celulares (por ejemplo, fibrina) a la cobertura de los *struts* del *stent*.

La respuesta inflamatoria desarrollada frente al *stent* se ha descrito habitualmente mediante la técnica histológica, la cual permite analizar su presencia en profundidad alrededor de los *struts*<sup>67,73</sup>, pero no caracteriza adecuadamente la que se produce en la superficie luminal. Para realizar este análisis con mayor precisión es más conveniente utilizar SEM: los SMC muestran una reacción inflamatoria que disminuye con el tiempo, mientras los SFA muestra una reacción persistente, incluso en aumento, como se objetiva en los resultados del estudio nº 3<sup>272</sup>. Sin embargo, los SFA analizados en este estudio (Janus® Carbostent), muestran una cronología de la respuesta inflamatoria similar a la de los SMC. La ausencia de polímero como vehículo del fármaco y la alta biocompatibilidad del recubrimiento Carbofilm® podrían explicar este hallazgo.



### 7.5.3. Limitaciones del estudio

Las recomendaciones consensuadas<sup>32,33</sup> sugieren emplear periodos de tiempo inferiores a 14 días para evaluar la endotelización en el modelo porcino. Sin embargo, también se detalla que “la presencia de endotelio confluyente en los primeros 28 días tras el implante de *stent*, no necesariamente asegura una respuesta similar en humanos. Sin embargo, si el modelo porcino muestra datos de toxicidad endotelial significativa o a largo plazo, manifestada por endotelización incompleta del *stent*, esta observación sugiere pero no prueba potenciales problemas con la compatibilidad vascular”. Otra potencial limitación de nuestro estudio es la ausencia de valoración funcional del endotelio. Algunas características observadas, como la presencia de uniones intercelulares laxas, sugieren inmadurez endotelial, por lo que la valoración funcional comienza a considerarse relevante en el análisis de la seguridad de los SFA. No obstante, el significado de estos resultados y su correlación con los sucesos clínicos aún no han sido establecidos.

## 7.6. Endotelización de los *struts* no apuestos, sobre el origen de ramas laterales

Los resultados del estudio nº 6 confirman la progresivamente creciente endotelización de los *struts* de los *stents* recubiertos de Carbofilm® localizados sobre el origen de ramas laterales, como sucede con el resto del *stent*. De hecho, el mejor predictor de la endotelización de estos *struts* es el recubrimiento endotelial del resto del *stent*.

### 7.6.1. Problemas relacionados con la cobertura del origen de ramas laterales por *struts* del *stent*

Estudios previos han demostrado que el porvenir de las ramas laterales cubiertas en su origen por SFA es similar a aquellas cubiertas por SMC, con una elevada tasa de recanalización espontánea<sup>395</sup>. Sin embargo, el significado clínico del daño inicial a estas pequeñas ramas no protegidas podría traducirse en la mayor incidencia de infarto de miocardio a los 30 días (8.3% vs. 3.3%,  $p=0.047$ ) observado en el estudio TAXUS V<sup>396</sup> en los pacientes que requerían múltiples *stents* en su tratamiento. El análisis angiográfico en la cohorte de múltiples *stents* demostró la mayor aparición de estenosis progresiva ( $\geq 70\%$ ) u

oclusión total de las ramas laterales en el grupo de SLP frente al SMC (42.6% vs. 30.6%;  $p=0.03$ ). En la literatura existente, sólo el *stent* Taxus® se ha relacionado con esta complicación; en su génesis podrían estar las reacciones de hipersensibilidad al fármaco o al polímero<sup>71,72</sup> y un mayor espesor de la capa de polímero que recubre el *stent*<sup>39</sup>. Los *stents* recubiertos de Carbofilm® (lámina de carbono turbostrático) han demostrado un excelente perfil de seguridad en las intervenciones coronarias, sin aparición de trombosis del *stent* incluso en pacientes bajo tratamiento antiagregante sólo con aspirina tras el implante de *stent*<sup>397</sup>. La ausencia de recubrimiento polimérico permite conseguir *struts* más finos y evitar reacciones de hipersensibilidad. El grado de endotelización de los SFA Janus® observado en este análisis podría ofrecer una ventaja en términos de reducción de eventos trombóticos relacionados con la cobertura del origen de las ramas laterales.

### 7.6.2. Malaposición y endotelización

El papel de la aposición incompleta del *stent* en la génesis de la trombosis tardía es un tema controvertido: algunos datos publicados sugieren una conexión entre ellos<sup>398-400</sup>, mientras otros autores descartan una clara relación<sup>401,402</sup>. Existen diferencias significativas entre la aposición incompleta de los *stents* inicial y tardía, que se han asociado en el primer caso con aspectos técnicos del procedimiento<sup>403</sup> y en el segundo con remodelado positivo o reabsorción del trombo o placa<sup>70,402</sup>. De cualquier manera, los *struts* localizados sobre el origen de ramas laterales se consideran no apuestos a la pared vascular y permanecen indefinidamente así, sin requerir posterior tratamiento. Previamente a la publicación de nuestro estudio, existía poco conocimiento del proceso de reparación vascular de estas estructuras, puesto que los estudios realizados en vivo con tecnologías de imagen como la OCT excluían sistemáticamente estos *struts* del análisis, considerándoles a priori no endotelizados. Además de los datos obtenidos de autopsias humanas, que conectaban la malaposición con la aparición de trombosis tardía<sup>127</sup>, sólo un estudio experimental ofrecía algunos datos sobre la endotelización de los *struts* no apuestos. Morton *et al.*<sup>404</sup> analizaron el tabique metálico libre que puede observarse después del implante de 2 *stents* simultáneos (*kissing stents*) en el tronco coronario izquierdo de 4 animales (2 muestras se analizaron con SEM y otras 2 mediante análisis histológico de las secciones). A los 28 días, los *struts* libres en la luz mostraban algunas áreas desnudas con plaquetas adheridas, mientras a los 90 días el tabique metálico estaba recubierto de una capa fina y lisa de neointima. Estos resultados

apoyan nuestros resultados de que los *struts* no apuestos a la pared vascular pueden experimentar un proceso de reparación vascular similar al resto del *stent*.

Posteriormente, estudios realizados con OCT han confirmado la endotelización en distintos grados de los *struts* no apuestos a la pared vascular<sup>405</sup>: hasta el 78% de estos *struts* aparecen recubiertos a los 9–13 meses tras el implante de SFA. Los autores de este estudio reconocen que la cobertura de los *struts* determinada por OCT no implica necesariamente endotelización, pero en cualquier caso descarta la presencia de *struts* desnudos.

### **7.6.3. Limitaciones del estudio**

Aunque el cálculo del tamaño muestral apoya el poder estadístico adecuado del estudio, las comparaciones entre distintos *stents* deben interpretarse con precaución. El papel específico del recubrimiento con Carbofilm® en el proceso de endotelización no puede determinarse de los resultados de este estudio, puesto que no se empleó *stent* metálico no recubierto como control en esta ocasión.

## **7.7. Eficacia antiproliferativa y seguridad de los balones liberadores de paclitaxel**

Los principales resultados de este ensayo son: 1) los BLP empleados en este modelo preclínico reducen de forma equivalente y significativa la reestenosis provocada por el implante de *stent*, tanto desde el punto de vista angiográfico como histológico; 2) no se observa una reacción inflamatoria persistente ni un mayor grado de daño vascular en comparación con los balones control; y 3) la liberación efectiva de paclitaxel desde estos dispositivos se caracteriza por causar un retraso en la reparación vascular respecto al control, objetivable en forma de menor grado de re-endotelización y mayor persistencia de fibrina en profundidad alrededor del *stent*.

### **7.7.1. Eficacia antiproliferativa**

Todos los parámetros de eficacia anti-reestenótica analizados en este estudio demuestran de forma consistente la superioridad de los distintos BLP frente al control sin fármaco.

Investigaciones previas ya han comprobado la eficacia superior de distintos BLP comerciales sobre el balón control<sup>366,367</sup>, aunque en algunos casos las diferencias no eran evidentes en todos los parámetros analizados<sup>370,406</sup>. El modelo empleado es muy similar a otros anteriores con valores de sobredimensión (ratio *stent* / arteria  $1.21 \pm 0.14$ ) y valores de estenosis porcentual por angiografía ( $33.5 \pm 17.8\%$ ) y por histología ( $51 \pm 17.9\%$ ) en el grupo control similares a los citados previamente<sup>366,367,370,407</sup>. En nuestra serie no hay diferencias entre los distintos BLP empleados ni tampoco en función de los tiempos de hinchado, que fue igual o superior al recomendado por los fabricantes. Estos resultados se corroboran en los análisis multivariados que limitan la influencia de posibles factores de confusión.

### 7.7.2. Reparación vascular

A pesar de la importante sobredimensión, el grado de daño vascular inducido no es muy elevado, con un valor medio de  $0.64 \pm 0.49$  (12 de los 51 *stents* presentaban *injury score* medio superior a 1, pero ninguno alcanzó el valor de 2). Y aunque no hay diferencias entre los grupos de los distintos BLP, sí se aprecia una tendencia a mayor daño vascular en el grupo control. Esta relación no se confirma en el análisis multivariado en el que sólo se identifica una relación entre el *injury score* y la ratio *stent* / arteria, ligeramente mayor en los controles ( $1.25 \pm 0.16$ ) que en los BLP ( $1.20 \pm 0.14$ ). Tampoco se observan diferencias en el grado de inflamación persistente entre ninguno de los grupos, con valores bajos en todos los casos (media de  $0.82 \pm 0.29$ ). Este hallazgo descarta fenómenos de toxicidad, en consonancia con la ausencia de necrosis significativa de la media, o de hipersensibilidad / alergia. La ausencia de los polímeros que se emplean en muchos de los SFA y que pueden perpetuar estos fenómenos anormales de reparación vascular<sup>71,73,78,127,128</sup> explicaría esta respuesta.

Sin embargo, sí se observan 2 fenómenos asociados con retraso en la reparación vascular, muy directamente relacionados con el efecto antiproliferativo del paclitaxel: la re-endotelización es ligera pero significativamente menor con los BLP que con el control; la presencia de fibrina alrededor del *stent* también es significativamente mayor con los BLP que con el control. Esta observación coincide plenamente con lo descrito previamente: Jone et al.<sup>370</sup> demuestran que sólo los BLP eficaces en la reducción de reestenosis muestran menor grado de re-endotelización y mayor grado de fibrina. Estos resultados deben interpretarse como prueba de concepto de la transferencia efectiva de paclitaxel a la arteria. Algunos estudios previos refieren en forma descriptiva una adecuada endotelización de los *stents*

sobredilatados con BLP a los 28 días<sup>366,367</sup>, si bien es cierto que la valoración de la re-  
endotelización de la arteria tras estos tratamientos es compleja como refleja la ausencia de  
una única clasificación para su evaluación<sup>408</sup>. En cualquier caso, la superficie endotelizada de  
los *stents* sobredilatados con BLP oscila entre  $84 \pm 3$  y  $95 \pm 4\%$ , muy similar a la descrita  
previamente con los BLP con eficacia anti-reestenótica<sup>370,406</sup>.

### 7.7.3. Estudio farmacocinético

La transferencia del fármaco desde los BLP es muy elevada, permaneciendo menos del 10%  
del cargado inicialmente en el balón tras el procedimiento. Las concentraciones de paclitaxel  
medidas demuestran su persistencia en la pared arterial hasta 24 horas tras su  
administración, lo que explica que un mínimo periodo de tiempo en la aplicación del fármaco  
puede traducirse en efectos a más largo plazo. Los valores medidos son prácticamente  
superponibles a los observados en otros estudios<sup>409</sup> en los que se aprecia una reducción  
lineal de las concentraciones desde la aplicación del balón hasta las 24 horas, con posterior  
persistencia de los niveles sin grandes cambios hasta los 28 días.

### 7.7.4. Limitaciones del estudio

El modelo concreto de implante de *stent* coronario y posterior sobredilatación con balones  
no refleja exactamente todas de las condiciones clínicas en las que se usan estos dispositivos,  
pero si constituye el mejor modelo experimental en términos de inducción de reestenosis  
como lo demuestra su uso en las series previamente publicadas<sup>366,367,370,406,409</sup>. Este modelo  
comparte características de las lesiones de novo y de la reestenosis; la discutida menor  
eficacia de los BLP en la primera situación podría influir en la ausencia de diferencias entre  
los BLP. Si bien los resultados observados no permiten señalar diferencias entre los BLP  
analizados, no es descartable que existan entre otros diseños no incluidos en este  
estudio<sup>370,410</sup>. La evaluación histológica con valoraciones semicuantitativas también supone  
una limitación en la precisión; sin embargo, se emplean las escalas consensuadas<sup>32,33</sup>. El  
modelo empleado para el estudio farmacocinético también puede ser discutible al no tener  
en cuenta el importante papel que la presencia de placa aterosclerótica puede tener en la  
captación del fármaco.



***CONCLUSIONES***

***CONCLUSIONS***





## 8. CONCLUSIONES

1. **Aunque la metodología de estudio está bastante estandarizada, algunos aspectos técnicos y características de la respuesta vascular a los dispositivos de tratamiento de la enfermedad coronaria requieren aún ser aclarados.**
2. **Respuesta vasomotora a distintos vasodilatadores endotelio–dependientes**
  - 2.1. En la valoración de la respuesta vasomotora tras el implante de un *stent* utilizando el modelo de arterias coronarias porcinas, se debe considerar como factor condicionante el agente vasodilatador dependiente de endotelio empleado en el estudio, puesto que la respuesta a los distintos fármacos es muy variable.
  - 2.2. Los cambios hemodinámicos provocados no muestran correlación con el grado de vasoconstricción.
3. **Análisis cuantitativo de la inflamación luminal inducida por distintos *stents***
  - 3.1. El análisis cuantitativo de la inflamación luminal mediante microscopía electrónica de barrido descrito representa un método eficaz para establecer la evolución temporal de la respuesta vascular al implante de un *stent*.
  - 3.2. El grado de endotelización de los *stents* coronarios guarda relación con la respuesta inflamatoria desencadenada.
4. **Relación entre la reestenosis en el *stent* y el daño vascular inducido**
  - 4.1. Los *stents* coronarios liberadores de paclitaxel disminuyen de forma significativa la reestenosis con respecto a los *stents* convencionales en un modelo experimental porcino.
  - 4.2. Esta diferencia en la respuesta proliferativa sólo se demuestra en los casos en los que se observa rotura de la lámina elástica interna.
5. **Cronología y caracterización celular de la re–endotelización de distintos *stents***
  - 5.1. El modelo porcino de arterias coronarias normales descrito es útil para medir y comparar el grado de endotelización de los *stents* coronarios, analizando su evolución y caracterizando los tipos celulares involucrados.
6. **Endotelización de los *struts* no apuestos, colocados sobre el origen de ramas**

- 6.1. Los *struts* de *stents* recubiertos de Carbofilm® situados sobre el origen de ramas laterales muestran un aceptable grado de endotelización, paralelo en evolución temporal al presente en el resto del *stent*.
- 6.2. El tacrolimus liberado desde el *stent* Janus® no impide una endotelización moderada de los *struts* situados sobre el origen de ramas laterales.

## **7. Eficacia antiproliferativa y seguridad de los balones liberadores de paclitaxel**

- 7.1. En el modelo preclínico de coronarias normales porcinas con implante de *stent* y sobredilatación con balón, los balones liberadores de paclitaxel analizados muestran una reducción significativa de la reestenosis en comparación con el control.
- 7.2. Los efectos farmacológicos derivados de la liberación de paclitaxel se ponen de manifiesto en forma de endotelización retrasada y acumulación de fibrina en profundidad; si bien no se observan datos de daño vascular o inflamación persistentes.

## 9. CONCLUSIONS

1. ***Although the methodology in the preclinical evaluation of coronary devices is standardized, some technical issues and features of the vascular healing process are still unknown.***
2. ***Vasomotor Response to Different Endothelium–Dependent Vasodilators***
  - 2.1. *The choice of endothelium-dependent agent must be weighed in the vasomotor response assessment after direct stent implantation in a coronary swine model, as the response to different vasodilators is highly variable.*
  - 2.2. *The hemodynamic changes do not correlate with the constriction rate.*
3. ***Analysis of Luminal Inflammation Induced by Different Stents***
  - 3.1. *Quantitative analysis of luminal inflammation with scanning electron microscopy allows a precise determination of the evolution of vascular healing.*
  - 3.2. *There was a significant correlation between observed inflammatory response and coronary stent endothelialization.*
4. ***Instant Restenosis Related to Vessel Injury Score Degree***
  - 4.1. *Paclitaxel–eluting coronary stents significantly reduce restenosis compared to bare metal stents in a swine model.*
  - 4.2. *This difference in proliferative response intensity only appears in cases of deep vessel injury with rupture of the internal elastic lamina.*
5. ***Time Course of Reendothelialization of Stents in a Normal Coronary Swine Model: Characterization and Quantification***
  - 5.1. *The described swine model with normal coronary arteries is useful to measure and compare the endothelialization of coronary stents, assessing their evolution and characterizing the involved cellular types*
6. ***Endothelialization of Nonapposed Stent Struts at the Origin of a Side Branch***

- 6.1. *The struts of different Carbofilm®-coated stents placed over the origin of side branches, showed an acceptable rate of endothelialization that mimics the healing of the rest of the stent.*
- 6.2. *Despite the elution of tacrolimus, Janus® stent showed fairly well endothelialized struts over the origin of side branches.*

## **7. Safety and efficacy of different paclitaxel-eluting balloons**

- 7.1. *In this preclinical model, the analyzed drug-eluting balloons showed a significant reduction in restenosis as compared with control balloons after stent implantation.*
- 7.2. *No data of increased injury score or persistent inflammation was observed, but the delayed endothelialization and fibrin accumulation suggest a response to the drug deposition.*

***RESUMEN***  
***SUMMARY***



## 10. RESUMEN

### 10.1. Introducción

El desarrollo de los *stents* farmacoactivos (SFA) ha abolido virtualmente la aparición de reestenosis al precio de una reparación vascular retrasada y/o defectuosa, que puede traducirse clínicamente en complicaciones como la trombosis tardía del *stent*. La investigación preclínica, clásicamente dirigida al análisis de la eficacia de los nuevos dispositivos, debe ahora reenfocarse en aspectos de seguridad para evitar complicaciones clínicas imprevistas. Los modelos animales más usados para la evaluación de los *stents* son el de arterias coronarias porcinas y arterias ilíacas en conejos, aunque los modelos de animal enfermo – conejos o cerdos arterioscleróticos – pueden ganar terreno al reproducir más fielmente las características del escenario clínico humano. Los procesos y etapas de reparación vascular en estos modelos animales y en los humanos son muy similares, aunque las ventanas temporales son distintas. Los períodos de seguimiento prolongado, hasta 1 año, en la investigación preclínica pueden ayudar a detectar la presencia de complicaciones como la trombosis tardía del *stent*, neoaterosclerosis y reestenosis tardía. Se ha demostrado un claro retraso en el proceso de re-endotelización de los vasos tratados con SFA y se ha correlacionado con la aparición de complicaciones clínicas. La recuperación no sólo de la cobertura endotelial sino de su función normal es crítica para una reparación vascular óptima. Los 3 componentes de los SFA, estructura metálica, vehículo y fármaco, tienen un impacto significativo en el rendimiento final, tanto en términos de proliferación neointimal como de reparación vascular. El análisis histopatológico de las arterias tratadas con *stent* debe ser realizado sistemáticamente, midiendo y caracterizando el daño arterial, la inflamación, endotelización, depósito de fibrina y otras variables que pueden ser indicativas de reparación vascular retrasada. Aunque el procedimiento histológico sigue siendo el método de referencia en el análisis de la respuesta vascular, son varias las técnicas de imagen que pueden ofrecer información valiosa en el estudio del proceso reparativo en puntos intermedios. Los avances más recientes en el campo incluyen *stents* combinados, balones liberadores de fármacos o endoprótesis totalmente reabsorbibles, cuyos resultados se están analizando actualmente.

Parafraseando el último documento de consenso en el campo<sup>33</sup>, “una reparación vascular adecuada en los modelos animales no implica necesariamente una respuesta similar en

humanos; por el contrario, una respuesta anormal en el modelo animal sugiere (pero no prueba) potenciales problemas en el uso clínico". Es crítico encontrar puntos de acuerdo en la metodología y presentación de los resultados de la investigación preclínica no solo entre los distintos grupos de investigación sino también con las agencias reguladoras internacionales (FDA, EMA) y nacionales.

## 10.2. Respuesta vasomotora a distintos vasodilatadores endotelio-dependientes

**Introducción y objetivos.** La re-endotelización incompleta de los *stents* puede manifestarse en forma de vasoconstricción paradójica a la infusión de vasodilatadores endotelio-dependientes. Puesto que no hay consenso sobre el mejor método o agente, nuestro objetivo es analizar la respuesta a distintos fármacos en un modelo de coronarias porcino.

**Métodos.** 27 *stents* fueron implantados en 9 cerdos domésticos. El diámetro del vaso proximal y distal a los segmentos tratados se analizó inmediatamente después del implante. Se emplearon distintos vasodilatadores endotelio-dependientes: acetilcolina intracoronaria, 20  $\mu\text{g}$  (A2) y 40  $\mu\text{g}$  (A4), serotonina intracoronaria (S), 100  $\mu\text{g}$ , e isoproterenol (I), en perfusión IV. Los resultados se presentan como constricción (%) comparada con la máxima vasodilatación con nitroglicerina intracoronaria (N, 200  $\mu\text{g}$ ).

**Resultados.** En 10 vasos (37%), A4 provocó un espasmo oclusivo. La acetilcolina indujo mayor grado de vasoconstricción (A4,  $42 \pm 39\%$ ; A2,  $16 \pm 14\%$ ) que el resto de agonistas (S,  $6 \pm 12\%$ ; I,  $6 \pm 11\%$ ),  $p < 0.01$ . El grado de constricción no se relacionó con los cambios hemodinámicos observados.

**Conclusiones.** Tras la denudación endotelial focal provocada por el implante directo de *stent* en un modelo de coronarias porcinas, la vasoconstricción inducida por distintos vasodilatadores dependientes del endotelio es altamente variable. El mayor grado de vasoconstricción se obtiene tras la infusión intracoronaria de acetilcolina, especialmente con dosis de 40  $\mu\text{g}$ . Los cambios hemodinámicos provocados no muestran correlación con el grado de vasoconstricción.



### 10.3. Análisis cuantitativo de la inflamación luminal inducida por distintos stents

Los SFA se asocian con retraso en la endotelización y fenómenos inflamatorios persistentes demostrados histológicamente. En la superficie luminal, mediante microscopía electrónica de barrido, se observan también cúmulos de células inflamatorias. Para cuantificar esta respuesta inflamatoria se implantaron 1 *stent* de acero (SMC) y 2 SFA con distintas dosis de vinblastina y el mismo polímero en las coronarias de 12 cerdos domésticos. Se analizó a los 3 y 7 días la densidad de células inflamatorias por área representativa (100x100  $\mu\text{m}$ ). La endotelización de SMC fue más completa que en SFA a los 3 días ( $p=0.016$ ) y 7 días ( $p=0.0001$ ). Los SFA indujeron un grado de inflamación mayor que los SMC a 3 días ( $4.5\pm 2$  vs.  $11.8\pm 3.5\%$ ,  $p=0.001$ ) y a 7 días ( $1.2\pm 1.5$  vs.  $26.3\pm 4.4\%$ ,  $p=0.0001$ ), con un patrón opuesto: la respuesta inflamatoria aumentaba con el tiempo en los SFA, al contrario de lo que sucedía con los SMC.

### 10.4. La reestenosis en el *stent* depende del daño vascular inducido

**Introducción y objetivos.** Los *stents* farmacoactivos son una herramienta útil para prevenir la reestenosis, pero los mecanismos involucrados en la respuesta proliferativa tras su implante aún no son conocidos en su totalidad. El objetivo de este estudio es comparar la histomorfometría vascular coronaria tras el implante de SMC o SFA en un modelo porcino.

**Métodos.** En 20 hembras de cerdos de la raza Large White de 2 meses de edad se implantaron de forma aleatoria un total de 60 *stents* distribuidos en dos grupos: SMC ( $n=20$ ) y SFA (paclitaxel) ( $n=40$ ). A los 28 días se procedió a eutanasia y análisis histomorfométrico. Se clasificó el grado de daño vascular en función de integridad o rotura de la lámina elástica interna.

**Resultados.** En el grupo de integridad de lámina elástica interna no se encontraron diferencias significativas entre SFA y SMC para las variables área de neointima y porcentaje de reestenosis ( $1.3$  [ $1.1$ – $2.2$ ] vs a  $2$  [ $1.3$ – $2.5$ ]  $\text{mm}^2$ ;  $p=0.6$ ; y  $14$  [ $12.1$ – $20.8$ ] vs a  $22.2$  [ $14.1$ – $23.3$ ] %;  $p=0.5$ ). En cambio, en el grupo de rotura de la lámina elástica interna sí se encontraron diferencias significativas (área de neointima,  $1.2$  [ $0.8$ – $2$ ] vs a  $2.9$  [ $2.3$ – $3.7$ ]  $\text{mm}^2$ ;  $p=0.001$  y porcentaje de reestenosis,  $16.63$  [ $11.2$ – $23.5$ ] vs a  $30.4$  [ $26.4$ – $45.7$ ] %;  $p=0.001$ ).

**Conclusiones.** En el modelo porcino de coronarias sanas, la integridad de la lámina elástica interna no permite apreciar diferencias en la respuesta proliferativa entre *stent* farmacoactivo y convencional; la diferencia se establece sólo cuando el daño vascular es más profundo.

### 10.5. Cronología y caracterización celular de la re–endotelización de distintos *stents*

La trombosis tardía de los SFA coronarios es una complicación infrecuente pero potencialmente letal. El mejor predictor de esta complicación es la ausencia de endotelización de los *struts* de los *stents*. Los objetivos de este estudio son determinar la cronología de la re–endotelización y caracterizar la respuesta celular involucrada en el modelo de arterias coronarias porcinas sanas. 33 *stents* recubiertos de Carbofilm® se implantaron en 11 cerdos domésticos anestesiados (peso  $25 \pm 3$  kg, 2 meses de edad). En cada animal se implantó un *stent* de acero inoxidable (SA), un *stent* de cromo–cobalto (SCC) y un *stent* liberador de tacrolimus (SLT) en cada una de las ramas coronarias mayores. Se programaron seguimientos de 1 día (n=9), 3 días (n=9) y 7 días (n=15). Se analizaron los segmentos tratados mediante microscopía electrónica de barrido tras bisecar longitudinalmente las arterias extraídas.

A 1 día se observaron escasas áreas parcheadas de endotelización sobre amplias zonas de cubierta de fibrina; el grado de endotelización fue similar en todos los *stents* (SA  $29 \pm 23\%$ , SCC  $29 \pm 24\%$  y SLT  $31 \pm 25\%$ ;  $p=0.9$ ). A los 3 días, se observaron más células endoteliales, pero con signos de inmadurez, y células inflamatorias gigantes sobre la fibrina; el grado de endotelización era mayor en SA y SCC que en SLT (SA  $79 \pm 14\%$ , SCC  $81 \pm 17\%$  vs. SLT  $46 \pm 9\%$ ;  $p=0.007$ ). A los 7 días, las arterias mostraron mejor endotelización con escasas células gigantes; el grado de endotelización era mayor en SA y SCC que en SLT (SA  $95 \pm 4\%$ , SCC  $98 \pm 4\%$  vs. SLT  $79 \pm 9\%$ ,  $p=0.01$ ). En conclusión, el modelo porcino de arterias coronarias normales es útil para medir y comparar el grado de endotelización de los *stents* coronarios, analizando su evolución y caracterizando los tipos celulares involucrados.

## 10.6. Endotelización de los *struts* no apuestos, colocados sobre el origen de ramas

**Introducción.** La endotelización de los *stents* coronarios es un fenómeno de gran relevancia por su relación con la trombosis tardía de éstos. La malaposición de los *struts* y la situación en bifurcaciones son dos de los factores asociados con esta complicación.

**Objetivo.** Evaluar el grado de endotelización de los *struts* no apuestos, localizados en el origen de ramas laterales.

**Métodos.** En 11 cerdos domésticos ( $25 \pm 3$  kg) se implantó un *stent* por rama coronaria mayor: 1 *stent* de acero inoxidable (Tecníc®), 1 de cromo-cobalto (Chrono®) y 1 *stent* liberador de tacrolimus (Janus®), todos recubiertos de Carbofilm®. Tras seguimientos programados de 1, 3 y 7 días, las muestras arteriales fueron extraídas, bisecadas longitudinalmente y se examinaron mediante microscopía electrónica de barrido para cuantificar el grado de endotelización de todo el *stent* y de los *struts* colocados sobre el origen de ramas laterales.

**Resultados.** Se observaron 44 ramas laterales (25 *stents*) que presentaban *struts* sobre su origen. Los patrones de endotelización variaban desde la total ausencia de cobertura hasta la completa endotelización, que no mostraban relación con el tipo de *stent* o arteria tratada. Los predictores de mejor endotelización fueron la relación de metal / diámetro de la rama ( $p=0.04$ ) y la endotelización el resto del *stent* ( $p=0.0002$ ); éste fue el único predictor independiente en el análisis multivariado ( $p=0.03$ ).

**Conclusiones.** Los resultados de este protocolo experimental demuestran que los *struts* de diferentes *stents* recubiertos de Carbofilm® colocados sobre el origen de ramas laterales muestran un aceptable grado de endotelización, paralelo en evolución temporal al presente en el resto del *stent*. A pesar de la liberación de tacrolimus, el *stent* Janus® muestra *struts* moderadamente endotelizados sobre el origen de ramas laterales.

## 10.7. Eficacia antiproliferativa y seguridad de los balones liberadores de paclitaxel

**Introducción y objetivos.** Los balones liberadores de paclitaxel han demostrado su eficacia en el tratamiento y prevención de la reestenosis. Sin embargo, no todos los dispositivos comercializados son igualmente efectivos; por ello es importante comparar los resultados en un modelo preclínico. Nuestro objetivo es analizar la seguridad y eficacia preclínica de distintos dispositivos.

**Métodos.** En 17 cerdos domésticos ( $25\pm 3$  kg) se implantaron 51 *stents* metálicos (Architect®, iVascular), uno en cada rama coronaria principal, sobredilatándose con distintos balones de control (n=10) o liberadores de paclitaxel: BLP1, iVascular (n=15); BLP2, iVascular (n=16); In.Pact Falcon®, Medtronic (n=10). Tras 28 días se analizan los resultados de reestenosis (angiografía e histomorfometría) y de reparación vascular: daño vascular, endotelización, persistencia de fibrina e inflamación.

**Resultados.** Los distintos balones liberadores de paclitaxel mostraron valores de estenosis al seguimiento similares, significativamente menores que los controles: angiografía,  $9\pm 12$  vs  $34\pm 18\%$  ( $p<0.0001$ ); histomorfometría,  $22\pm 8$  vs  $51\pm 18\%$  ( $p<0.0001$ ). Los grados de daño vascular ( $0.6\pm 0.5$ ) e inflamación ( $0.8\pm 0.3$ ) fueron bajos, sin diferencias entre los grupos. Los marcadores del efecto farmacológico fueron significativamente distintos en los dispositivos liberadores de paclitaxel (sin diferencias entre ellos) que en los controles: superficie endotelizada,  $87\pm 10$  vs  $99\pm 2\%$  ( $p=0.0007$ ); grado de fibrina,  $2.1\pm 0.7$  vs  $0.4\pm 0.5$  ( $p<0.0001$ ).

**Conclusiones.** En este modelo preclínico, los balones liberadores de paclitaxel analizados muestran una reducción significativa de la reestenosis. Aunque no se observan datos de daño vascular o inflamación persistentes, sí se aprecian los efectos de acción farmacológica en forma de endotelización retrasada y acumulación de fibrina.

## 11. SUMMARY

### 11.1. Background

*The development of drug-eluting stents (DES) has virtually abolished the incidence of restenosis but some worrying signs of delayed vascular healing may appear, as late stent thrombosis. Preclinical research, previously intended to test the efficacy of these new devices, should now focus on the safety aspects to avoid unforeseen clinical complications. The preferred animal models of stent implantation are swine coronary arteries and rabbit iliac arteries, although diseased animal (especially hyperlipidemic rabbits) models could better mimic the human clinical scenario. The vascular healing processes and stages in these animal models and in humans are quite similar, although the time courses are different. Prolonged (up to 1 year) follow-up periods in the preclinical experiments can help in evaluating the appearance of late complications, as late stent thrombosis, new-onset atherosclerosis or late catch-up phenomenon. Delayed re-endothelialization of the stented vessel is a common finding in DES and has been related to adverse clinical outcomes. The recovery not only of the endothelial lining but also of its normal function is relevant for adequate healing. The 3 components of DES, metallic backbone, carrier and drug, have significant impact on the final performance, both in terms of neointimal proliferation and vascular healing. Histopathology analysis of the stented arteries should be systemically performed, measuring and characterizing arterial injury, inflammation, endothelialization, fibrin deposition and other variables that can be clues of delayed healing. Although histopathology remains the gold standard in the assessment of the vessel response to the stent, different imaging techniques may offer valuable information on the healing process at intermediate time points. Many developments as dual stents, paclitaxel eluting balloons or fully bioresorbable scaffoldings are being tested and results are expected in the near future.*

*Rewording one of the statements published in the last expert consensus document<sup>33</sup> we can conclude that if vascular healing appears to be adequate within 28 days of stent placement in animal models, this finding does not necessarily entail the same favorable human behavior. However, if the animal model suggests abnormal or delayed healing response, this observation suggests but does not prove potential problems in the human setting. It is important to reach a consensus about the preclinical research models not only between*

different groups of investigators, but also with the regulatory agencies such as FDA, EMA or national agencies.

### **11.2. Vasomotor Response to Different Endothelium–Dependent Vasodilators**

**Background and Objectives.** Incomplete re–endothelialization of stents can be revealed as paradoxical vasoconstriction with endothelium–dependent vasodilators. As no consensus exists about the best method or agent, our objective is to analyze the response to different drugs in a coronary swine model.

**Methods.** Twenty–seven stents were implanted in 9 domestic swine. The vessel diameter of proximal and distal segments ( $\geq 5$  mm) was assessed immediately post–implantation. Different endothelium–dependent vasodilators were used: IC acetylcholine, 20  $\mu$ g (A2) and 40  $\mu$ g (A4), IC serotonin (S), 100  $\mu$ g, and isoproterenol (I), IV infusion. The results are presented as constriction (%) compared with maximal vasodilation with IC nitroglycerin (N, 200  $\mu$ g).

**Results.** In 10 vessels (37%), A4 provoked an occlusive spasm. Acetylcholine induced a higher degree of vasoconstriction (A4,  $42 \pm 39\%$ ; A2,  $16 \pm 14\%$ ) than the rest of agonists (S,  $6 \pm 12\%$ ; I,  $6 \pm 11\%$ ),  $p < 0.01$ . The constriction rate was not related to the induced hemodynamic changes.

**Conclusions.** After focal endothelial denudation in a coronary swine model, the constriction rate induced by different endothelium–dependent vasodilators is highly variable. The highest value is observed after IC acetylcholine bolus. The constriction rate does not correlate with the observed hemodynamic changes.

### **11.3. Analysis of Luminal Inflammation Induced by Different Stents**

There is histological evidence that DES are associated with delayed endothelialization and a persistent inflammatory state. Moreover, clusters of inflammatory cells have been observed on luminal surfaces by scanning electron microscopy. With the aim of quantifying this inflammatory response, we implanted one bare–metal stent (BMS) and two drug–eluting stents containing different doses of vinblastine embedded in the same polymer into the coronary arteries of 12 domestic pigs. The density of inflammatory cells in a representative

area (100 x 100 mm) was quantified at 3 and 7 days. Endothelialization was more complete in BMS than in DES both at 3 days ( $P = .016$ ) and 7 days ( $P = .0001$ ). The degree of inflammation induced by the DES was higher than that induced by the BMS both at 3 days ( $11.8 \pm 3.5\%$  vs.  $4.5 \pm 2\%$ ;  $P = .001$ ) and 7 days ( $26.3 \pm 4.4\%$  vs.  $1.2 \pm 1.5\%$ ;  $P = .0001$ ). In addition, the time sequence was inverted: the inflammatory response increased over time with the DES, while the opposite occurred with the BMS.

#### 11.4. Instant Restenosis Related to Vessel Injury Score Degree

**Introduction and objectives.** DES are useful for preventing restenosis, but the pathophysiological processes involved in the proliferative response after implantation are still not known in detail. The aim of this study is to compare the coronary vascular histomorphometry after implanting DES and BMS in a swine model.

**Methods.** Sixty stents were randomly implanted in 20 Large White female pigs with a ratio of BMS / DES of 1:2. After 28 days, euthanasia and histomorphometry were performed. We defined the vascular injury score in accordance to whether the internal elastic lamina was intact or ruptured.

**Results.** There were no differences between DES and BMS in the intact internal elastic lamina group regarding neointimal area or % restenosis ( $1.3 [1.1-2.2]$  vs  $2.0 [1.3-2.5]$  mm<sup>2</sup>;  $P=.6$ ; and  $14.0 [12.1-20.8]$  vs  $22.2 [14.1-23.3]$  %;  $P=.5$ ). We detected statistically significant differences for the ruptured internal elastic lamina group, (neointimal area  $1.2 [0.8-2.0]$  vs  $2.9 [2.3-3.7]$  mm<sup>2</sup>;  $P=.001$  and % restenosis  $16.63 [11.2-23.5]$  vs  $30.4 [26.4-45.7]$  %;  $P=.001$ ).

**Conclusions.** In our swine model, we did not find any differences between proliferative response of DES and BMS when the internal elastic lamina is intact; differences only appear when vascular injury is deeper.

#### 11.5. Time Course of Reendothelialization of Stents in a Normal Coronary Swine Model: Characterization and Quantification

Late thrombosis of coronary DES is an infrequent but serious complication of percutaneous transluminal coronary angioplasty. The best predictor of this event is the lack of

endothelialization of stent struts. The objective of this study is to characterize and quantify the time course of endothelialization of different stents implanted in non-atherosclerotic swine coronary arteries. Thirty-three Carbofilm®-coated stents (CID, Italy) were implanted percutaneously in 11 anesthetized domestic, crossbred pigs (weight  $25\pm 3$  kg, 2 months-old). Each animal received 1 stainless-steel stent (SS), 1 cobalt-chromium stent (CCS) and 1 tacrolimus eluting stent (TES) in each coronary artery. Follow-up periods were 1 day ( $n=9$  stents), 3 days ( $n=9$  stents), and 7 days ( $n=15$  stents). Longitudinal sections of the stented vessels were examined using scanning electron microscopy.

At 1 day, there was scarce, patchy, endothelialization with areas of fibrin; the endothelialization rate was similar for all the stents (SS  $29\pm 23\%$ , CCS  $29\pm 24\%$  and TES  $31\pm 25\%$ ;  $p=0.9$ ). At 3 days, there were more endothelial cells but with immature features and giant cells over fibrin; the endothelialization was greater in SS and CCS than in TES (SS  $79\pm 14\%$ , CCS  $81\pm 17\%$  vs. TES  $46\pm 9\%$ ;  $p=0.007$ ). At 7 days, arteries showed better endothelialization with few giant cells; the endothelialization was greater in SS and CCS than in TES (SS  $95\pm 4\%$ , CCS  $98\pm 4\%$  vs. TES  $79\pm 9\%$ ,  $p=0.01$ ). In conclusion, the described model is useful for the analysis of endothelialization of coronary stents and facilitates measurement of its rate of formation and characterization of the involved cell types.

### 11.6. Endothelialization of Nonapposed Stent Struts at the Origin of a Side Branch

**Objectives.** To evaluate the degree of endothelialization of the non-apposed struts located on the ostia of side branches.

**Background.** Endothelialization of coronary stents has got considerable relevance because of the phenomenon of late thrombosis. Bifurcation location and incomplete stent apposition have been linked to this complication.

**Methods.** Domestic pigs ( $n=11$ ; weight:  $25\pm 3$  kg) were anesthetized and had one stent per coronary artery implanted: one stainless-steel (Tecnica®), one cobalt-chromium (Chrono®) and one tacrolimus-eluting-stent (Janus®), all of them being Carbofilm®-coated (Sorin). One, three or seven days post-procedure, the pigs were sacrificed, the hearts explanted and longitudinal sections examined by scanning electron microscopy to quantify the percentage of the strut endothelialized over the branches and in the total surface.



**Results.** 44 side branches (25 stents) that had stent struts over their origin were evaluated. Different patterns of endothelialization were observed, from the total absence to the complete endothelialization. There were no significant differences in relation to type of stent or to the artery treated. The predictors of higher percentage of endothelialization were the ratio of metal to branch diameter ( $p=0.04$ ) and better endothelialization in the rest of the stent ( $p=0.0002$ ); only this parameter maintaining significant correlation ( $p=0.03$ ) in multivariate analysis.

**Conclusions.** Carbofilm<sup>®</sup>-coated stent struts located over the origin of side branches follow the pattern of endothelialization for the rest of the stent, even in the case of tacrolimus-eluting stent.

### 11.7. Safety and efficacy of different paclitaxel-eluting balloons

**Introduction and objectives.** The drug-eluting balloons have demonstrated a high antiproliferative efficacy in the treatment and prevention of restenosis. Nevertheless, not all the available devices are equally effective; so, the comparison of the results in a preclinical model is relevant. Our objective is to assess the preclinical efficacy and safety of different devices.

**Methods.** In 17 domestic swine ( $25\pm 3$  kg), we implanted 51 metallic stents (Architect<sup>®</sup>, iVascular), one stent per major coronary artery. Stent post-dilatation was performed with different control balloons ( $n=10$ ) or drug-eluting balloons: BLP1, iVascular ( $n=15$ ); BLP2, iVascular ( $n=16$ ); In.Pact Falcon<sup>®</sup>, Medtronic ( $n=10$ ). Restenosis rate (by angiography and histomorphometry) and vascular healing parameters (injury score, endothelialization rate, fibrin and inflammation scores) were analyzed at 28 days.

**Results.** All the drug-eluting balloons showed similar stenosis values at follow-up, significantly lower than control: angiographic,  $9\pm 12$  vs  $34\pm 18\%$  ( $p<0.0001$ ); histomorphometric,  $22\pm 8$  vs  $51\pm 18\%$  ( $p<0.0001$ ). The injury ( $0.6\pm 0.5$ ) and inflammation scores ( $0.8\pm 0.3$ ) were uniformly low in all the groups. As a marker of the pharmacologic effect, we observed lower values of endothelialization rate ( $87\pm 10$  vs  $99\pm 2\%$ ,  $p=0.0007$ ) and higher fibrin scores ( $2.1\pm 0.7$  vs  $0.4\pm 0.5$ ,  $p<0.0001$ ) in all the drug-eluting balloon groups than in controls.

**Conclusions.** *In this preclinical model, the analyzed drug-eluting balloons showed a significant reduction in restenosis as compared with control balloons after stent implantation. No data of increased injury score or persistent inflammation was observed, but the delayed endothelialization and fibrin accumulation suggest a response to the drug deposition.*

## ***BIBLIOGRAFÍA***



## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Allender S, Scarborough P, Peto V, Rayner M, Leal J, Luengo-Fernandez R, Gray A. European cardiovascular disease statistics [Online]. 2008;2011
2. Rayner M, Allender S, Scarborough P. Cardiovascular disease in Europe. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2009;16 Suppl 2:S43-47
3. Ryan J, Linde-Zwirble W, Engelhart L, Cooper L, Cohen DJ. Temporal Changes in Coronary Revascularization Procedures, Outcomes, and Costs in the Bare-Metal Stent and Drug-Eluting Stent Eras: Results From the US Medicare Program. *Circulation*. 2009;119:952-961
4. Epstein AJ, Polsky D, Yang F, Yang L, Groeneveld PW. Coronary revascularization trends in the United States, 2001-2008. *JAMA*. 2011;305:1769-1776
5. Soriano J, Alfonso F, Cequier A, Moris C. [The Registry of the Activities of the Hemodynamics and Interventional Cardiology Section in 1998]. *Rev Esp Cardiol*. 1999;52:1105-1120
6. Dotter CT, Judkins MP. Transluminal Treatment of Arteriosclerotic Obstruction. Description of a New Technic and a Preliminary Report of Its Application. *Circulation*. 1964;30:654-670
7. Gruntzig A. Transluminal dilatation of coronary-artery stenosis. *Lancet*. 1978;1:263
8. Sigwart U, Puel J, Mirkovitch V, Joffre F, Kappenberger L. Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty. *The New England journal of medicine*. 1987;316:701-706
9. Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F, Macaya C, Rutsch W, Heyndrickx G, Emanuelsson H, Marco J, Legrand V, Materne P, et al. A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group. *The New England journal of medicine*. 1994;331:489-495
10. Fischman DL, Leon MB, Baim DS, Schatz RA, Savage MP, Penn I, Detre K, Veltri L, Ricci D, Nobuyoshi M, et al. A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators. *The New England journal of medicine*. 1994;331:496-501
11. Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, Fajadet J, Ban Hayashi E, Perin M, Colombo A, Schuler G, Barragan P, Guagliumi G, Molnar F, Falotico R. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *The New England journal of medicine*. 2002;346:1773-1780
12. Nordmann AJ, Briel M, Bucher HC. Mortality in randomized controlled trials comparing drug-eluting vs. bare metal stents in coronary artery disease: a meta-analysis. *Eur Heart J*. 2006;27:2784-2814
13. Pfisterer M, Brunner-La Rocca HP, Buser PT, Rickenbacher P, Hunziker P, Mueller C, Jeger R, Bader F, Osswald S, Kaiser C. Late clinical events after clopidogrel discontinuation may limit the benefit of drug-eluting stents: an observational study of drug-eluting versus bare-metal stents. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48:2584-2591
14. Camenzind E, Steg PG, Wijns W. Stent thrombosis late after implantation of first-generation drug-eluting stents: a cause for concern. *Circulation*. 2007;115:1440-1455
15. Lagerqvist B, James SK, Stenestrand U, Lindback J, Nilsson T, Wallentin L. Long-term outcomes with drug-eluting stents versus bare-metal stents in Sweden. *The New England journal of medicine*. 2007;356:1009-1019
16. Serruys PW, Strauss BH, Beatt KJ, Bertrand ME, Puel J, Rickards AF, Meier B, Goy JJ, Vogt P, Kappenberger L, et al. Angiographic follow-up after placement of a self-expanding coronary-artery stent. *The New England journal of medicine*. 1991;324:13-17

17. Colombo A, Hall P, Nakamura S, Almagor Y, Maiello L, Martini G, Gaglione A, Goldberg SL, Tobis JM. Intracoronary stenting without anticoagulation accomplished with intravascular ultrasound guidance. *Circulation*. 1995;91:1676-1688
18. Perez de Prado A, Garcia EJ, Abeytua M, Botas J, Elizaga J, Soriano J, Bermejo J, Velasquez EG, Delcan JL. [Coronary endoprosthesis (stents) implanted without coumadin administration: one year's experience]. *Rev Esp Cardiol*. 1996;49:439-443
19. Cutlip DE, Windecker S, Mehran R, Boam A, Cohen DJ, van Es GA, Steg PG, Morel MA, Mauri L, Vranckx P, McFadden E, Lansky A, Hamon M, Krucoff MW, Serruys PW. Clinical end points in coronary stent trials: a case for standardized definitions. *Circulation*. 2007;115:2344-2351
20. Kastrati A, Mehilli J, Pache J, Kaiser C, Valgimigli M, Kelbaek H, Menichelli M, Sabate M, Suttorp MJ, Baumgart D, Seyfarth M, Pfisterer ME, Schomig A. Analysis of 14 trials comparing sirolimus-eluting stents with bare-metal stents. *The New England journal of medicine*. 2007;356:1030-1039
21. Mauri L, Hsieh WH, Massaro JM, Ho KK, D'Agostino R, Cutlip DE. Stent thrombosis in randomized clinical trials of drug-eluting stents. *The New England journal of medicine*. 2007;356:1020-1029
22. Spaulding C, Daemen J, Boersma E, Cutlip DE, Serruys PW. A pooled analysis of data comparing sirolimus-eluting stents with bare-metal stents. *The New England journal of medicine*. 2007;356:989-997
23. Stone GW, Moses JW, Ellis SG, Schofer J, Dawkins KD, Morice MC, Colombo A, Schampaert E, Grube E, Kirtane AJ, Cutlip DE, Fahy M, Pocock SJ, Mehran R, Leon MB. Safety and efficacy of sirolimus- and paclitaxel-eluting coronary stents. *The New England journal of medicine*. 2007;356:998-1008
24. Draft Guidance for Industry: Coronary Drug-Eluting Stents—Nonclinical and Clinical Studies [Online]. 2008;2011
25. Guideline on the development of medicinal substances contained in drug-eluting (medicinal substance-eluting) coronary stents [Online]. 2008
26. Jeremy JY, Thomas AC. Animal models for studying neointima formation. *Curr Vasc Pharmacol*. 2010;8:198-219
27. Perkins LE. Preclinical models of restenosis and their application in the evaluation of drug-eluting stent systems. *Vet Pathol*. 2010;47:58-76
28. Schwartz RS, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vlietstra RE, Holmes DR. Restenosis after balloon angioplasty. A practical proliferative model in porcine coronary arteries. *Circulation*. 1990;82:2190-2200
29. Schwartz RS, Huber KC, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vlietstra RE, Holmes DR. Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model. *J Am Coll Cardiol*. 1992;19:267-274
30. Hehrlein C, Zimmermann M, Pill J, Metz J, Kubler W, von Hodenberg E. The role of elastic recoil after balloon angioplasty of rabbit arteries and its prevention by stent implantation. *Eur Heart J*. 1994;15:277-280
31. Rogers C, Edelman ER. Endovascular stent design dictates experimental restenosis and thrombosis. *Circulation*. 1995;91:2995-3001
32. Schwartz RS, Edelman ER, Carter A, Chronos N, Rogers C, Robinson KA, Waksman R, Weinberger J, Wilensky RL, Jensen DN, Zuckerman BD, Virmani R. Drug-eluting stents in preclinical studies: recommended evaluation from a consensus group. *Circulation*. 2002;106:1867-1873
33. Schwartz RS, Edelman E, Virmani R, Carter A, Granada JF, Kaluza GL, Chronos NAF, Robinson KA, Waksman R, Weinberger J, Wilson GJ, Wilensky RL. Drug-Eluting Stents in Preclinical Studies: Updated Consensus Recommendations for Preclinical Evaluation. *Circ Cardiovasc Interv*. 2008;1:143-153

34. Indolfi C, Esposito G, Stabile E, Cavuto L, Pisani A, Coppola C, Torella D, Perrino C, Di Lorenzo E, Curcio A, Palombini L, Chiariello M. A new rat model of small vessel stenting. *Basic research in cardiology*. 2000;95:179-185
35. Finn AV, Gold HK, Tang A, Weber DK, Wight TN, Clermont A, Virmani R, Kolodgie FD. A novel rat model of carotid artery stenting for the understanding of restenosis in metabolic diseases. *J Vasc Res*. 2002;39:414-425
36. Roks AJ, Henning RH, van Boven AJ, Tio RA, van Gilst WH. Rat abdominal aortic stenting: a simple model displaying in-stent restenosis. *Am J Cardiol*. 2002;89:1149-1150
37. Langeveld B, Roks AJ, Tio RA, van Boven AJ, van der Want JJ, Henning RH, van Beusekom HM, van der Giessen WJ, Zijlstra F, van Gilst WH. Rat abdominal aorta stenting: a new and reliable small animal model for in-stent restenosis. *J Vasc Res*. 2004;41:377-386
38. Hermans WR, Rensing BJ, Foley DP, Deckers JW, Rutsch W, Emanuelsson H, Danchin N, Wijns W, Chappuis F, Serruys PW. Therapeutic dissection after successful coronary balloon angioplasty: no influence on restenosis or on clinical outcome in 693 patients. The MERCATOR Study Group (Multicenter European Research Trial with Cilazapril after Angioplasty to prevent Transluminal Coronary Obstruction and Restenosis). *J Am Coll Cardiol*. 1992;20:767-780
39. Lafont A, Faxon D. Why do animal models of post-angioplasty restenosis sometimes poorly predict the outcome of clinical trials? *Cardiovasc Res*. 1998;39:50-59
40. Jackson CL. Animal models of restenosis. *Trends Cardiovasc Med*. 1994;4:122-130
41. Narayanaswamy M, Wright KC, Kandarpa K. Animal models for atherosclerosis, restenosis, and endovascular graft research. *J Vasc Interv Radiol*. 2000;11:5-17
42. Muller DW, Ellis SG, Topol EJ. Experimental models of coronary artery restenosis. *J Am Coll Cardiol*. 1992;19:418-432
43. Van Belle E, Tio FO, Couffinhal T, Maillard L, Passeri J, Isner JM. Stent endothelialization. Time course, impact of local catheter delivery, feasibility of recombinant protein administration, and response to cytokine expedition. *Circulation*. 1997;95:438-448
44. Virmani R, Kolodgie FD, Farb A, Lafont A. Drug eluting stents: are human and animal studies comparable? *Heart*. 2003;89:133-138
45. Bayes-Genis A, Kantor B, Keelan PC, Altman JD, Lubbe DF, Kang JH, Schwartz RS. Restenosis and Hyperplasia: Animal Models. *Curr Interv Cardiol Rep*. 2000;2:303-308
46. Perkins L, Quee S, Coleman L, Lui M, Joner M, Virmani R, Acampado E, Kolodgie F. Three In Vivo Preclinical Models to Assess Re-Endothelialization Following Coronary Stent Implantation. *Am J Cardiol*. 2007;100:S176
47. Joner M, Nakazawa G, Finn AV, Quee SC, Coleman L, Acampado E, Wilson PS, Skoriya K, Cheng Q, Xu X, Gold HK, Kolodgie FD, Virmani R. Endothelial cell recovery between comparator polymer-based drug-eluting stents. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52:333-342
48. Nakazawa G, Finn AV, Ladich E, Ribichini F, Coleman L, Kolodgie FD, Virmani R. Drug-eluting stent safety: findings from preclinical studies. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2008;6:1379-1391
49. Hehrlein C, Gollan C, Donges K, Metz J, Riessen R, Fehsenfeld P, von Hodenberg E, Kubler W. Low-dose radioactive endovascular stents prevent smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia in rabbits. *Circulation*. 1995;92:1570-1575
50. Verin V, Popowski Y, Urban P, Belenger J, Redard M, Costa M, Widmer MC, Rouzaud M, Nouet P, Grob E, et al. Intra-arterial beta irradiation prevents neointimal hyperplasia in a hypercholesterolemic rabbit restenosis model. *Circulation*. 1995;92:2284-2290

51. Kolodgie FD, Katocs AS, Jr., Largis EE, Wrenn SM, Cornhill JF, Herderick EE, Lee SJ, Virmani R. Hypercholesterolemia in the rabbit induced by feeding graded amounts of low-level cholesterol. Methodological considerations regarding individual variability in response to dietary cholesterol and development of lesion type. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:1454-1464
52. Rogers C, Edelman ER, Simon DI. A mAb to the beta2-leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) reduces intimal thickening after angioplasty or stent implantation in rabbits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:10134-10139
53. Drachman DE, Edelman ER, Seifert P, Groothuis AR, Bornstein DA, Kamath KR, Palasis M, Yang D, Nott SH, Rogers C. Neointimal thickening after stent delivery of paclitaxel: change in composition and arrest of growth over six months. *J Am Coll Cardiol.* 2000;36:2325-2332
54. Danenberg HD, Welt FG, Walker M, 3rd, Seifert P, Toegel GS, Edelman ER. Systemic inflammation induced by lipopolysaccharide increases neointimal formation after balloon and stent injury in rabbits. *Circulation.* 2002;105:2917-2922
55. John MC, Wessely R, Kastrati A, Schömig A, Joner M, Uchihashi M, Crimins J, Lajoie S, Kolodgie FD, Gold HK. Differential Healing Responses in Polymer- and Nonpolymer-Based Sirolimus-Eluting Stents. *JACC Cardiovasc Interv.* 2008;1:535-544
56. Finn AV, John M, Nakazawa G, Polavarapu R, Karmali V, Xu X, Cheng Q, Davis T, Raghunathan C, Acampado E, Ezell T, Lajoie S, Eppihimer M, Kolodgie FD, Virmani R, Gold HK. Differential healing after sirolimus, paclitaxel, and bare metal stent placement in combination with peroxisome proliferator-activator receptor gamma agonists: requirement for mTOR/Akt2 in PPARgamma activation. *Circ Res.* 2009;105:1003-1012
57. Gardner TJ, Johnson DL. Cardiovascular system. In: Swindle MM, Adams RJ, eds. *Experimental Surgery and Physiology: Induced Animal Models of Human Disease.* Baltimore, MD: William & Wilkins; 1988:74-124.
58. Shimokawa H, Vanhoutte PM. Impaired endothelium-dependent relaxation to aggregating platelets and related vasoactive substances in porcine coronary arteries in hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Circ Res.* 1989;64:900-914
59. Goodman SL. Sheep, pig, and human platelet-material interactions with model cardiovascular biomaterials. *J Biomed Mater Res.* 1999;45:240-250
60. Cromeens DM, Rodgers GP, Minor ST. Warfarin sodium for anticoagulation of atherosclerotic miniature swine. *J Invest Surg.* 1990;3:141-145
61. van Beusekom HMM, van der Giessen WJ, Wagenvoort CA, van Ingen Schenau DS, Huijts RA, Serruys PW. Histological features of a polymer endovascular prosthesis after transcatheter implantation in porcine arteries. *Cardiovasc Pathol.* 1993;2:41-51
62. Kornowski R, Hong MK, Virmani R, Jones R, Vodovotz Y, Leon MB. Granulomatous 'foreign body reactions' contribute to exaggerated in-stent restenosis. *Coron Artery Dis.* 1999;10:9-14
63. van der Giessen WJ, Lincoff AM, Schwartz RS, van Beusekom HM, Serruys PW, Holmes DR, Jr., Ellis SG, Topol EJ. Marked inflammatory sequelae to implantation of biodegradable and nonbiodegradable polymers in porcine coronary arteries. *Circulation.* 1996;94:1690-1697
64. Yorozuya M, Suzuki H, Iso Y, Shibata M, Nakatani M, Koba S, Murakami M, Katagiri T, Takeyama Y. Comparison of the morphological changes of restenosis after the implantation of various types of stents in a swine model. *Coron Artery Dis.* 2002;13:305-312
65. Virmani R, Kolodgie FD, Farb A. Drug-eluting stents: are they really safe? *Am Heart Hosp J.* 2004;2:85-88
66. Nakazawa G, Ladich E, Finn AV, Virmani R. Pathophysiology of vascular healing and stent mediated arterial injury. *EuroIntervention.* 2008;4 Suppl C:C7-10
67. Wilson GJ, Nakazawa G, Schwartz RS, Huibregtse B, Poff B, Herbst TJ, Baim DS, Virmani R. Comparison of Inflammatory Response After Implantation of Sirolimus- and Paclitaxel-Eluting Stents in Porcine Coronary Arteries. *Circulation.* 2009;120:141-149



68. Grewe PH, Deneke T, Machraoui A, Barmeyer J, Muller KM. Acute and chronic tissue response to coronary stent implantation: pathologic findings in human specimen. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35:157-163
69. Finn AV, Nakazawa G, Joner M, Kolodgie FD, Mont EK, Gold HK, Virmani R. Vascular responses to drug eluting stents: importance of delayed healing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:1500-1510
70. Nakazawa G, Finn AV, Joner M, Ladich E, Kutys R, Mont EK, Gold HK, Burke AP, Kolodgie FD, Virmani R. Delayed Arterial Healing and Increased Late Stent Thrombosis at Culprit Sites After Drug-Eluting Stent Placement for Acute Myocardial Infarction Patients: An Autopsy Study. *Circulation*. 2008;118:1138-1145
71. Virmani R, Guagliumi G, Farb A, Musumeci G, Grieco N, Motta T, Mihalcsik L, Tespili M, Valsecchi O, Kolodgie FD. Localized hypersensitivity and late coronary thrombosis secondary to a sirolimus-eluting stent: should we be cautious? *Circulation*. 2004;109:701-705
72. Nebeker JR, Virmani R, Bennett CL, Hoffman JM, Samore MH, Alvarez J, Davidson CJ, McKoy JM, Raisch DW, Whisenant BK, Yarnold PR, Belknap SM, West DP, Gage JE, Morse RE, Gligoric G, Davidson L, Feldman MD. Hypersensitivity cases associated with drug-eluting coronary stents: a review of available cases from the Research on Adverse Drug Events and Reports (RADAR) project. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47:175-181
73. Finn AV, Kolodgie FD, Harnek J, Guerrero LJ, Acampado E, Tefera K, Skorija K, Weber DK, Gold HK, Virmani R. Differential response of delayed healing and persistent inflammation at sites of overlapping sirolimus- or paclitaxel-eluting stents. *Circulation*. 2005;112:270-278
74. Karges HE, Funk KA, Ronneberger H. Activity of coagulation and fibrinolysis parameters in animals. *Arzneimittelforschung*. 1994;44:793-797
75. Carter AJ, Laird JR, Farb A, Kufs W, Wortham DC, Virmani R. Morphologic characteristics of lesion formation and time course of smooth muscle cell proliferation in a porcine proliferative restenosis model. *J Am Coll Cardiol*. 1994;24:1398-1405
76. Farb A, Sangiorgi G, Carter AJ, Walley VM, Edwards WD, Schwartz RS, Virmani R. Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans. *Circulation*. 1999;99:44-52
77. Taylor AJ, Gorman PD, Kenwood B, Hudak C, Tashko G, Virmani R. A comparison of four stent designs on arterial injury, cellular proliferation, neointima formation, and arterial dimensions in an experimental porcine model. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2001;53:420-425
78. Schwartz RS, Chronos NA, Virmani R. Preclinical restenosis models and drug-eluting stents: still important, still much to learn. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44:1373-1385
79. Swindle MM, Horneffer PJ, Gardner TJ, Gott VL, Hall TS, Stuart RS, Baumgartner WA, Borkon AM, Galloway E, Reitz BA. Anatomic and anesthetic considerations in experimental cardiopulmonary surgery in swine. *Laboratory animal science*. 1986;36:357-361
80. Yao F, Visovatti S, Johnson CS, Chen M, Slama J, Wenger A, Eriksson E. Age and growth factors in porcine full-thickness wound healing. *Wound Repair Regen*. 2001;9:371-377
81. Luscher TF, Steffel J, Eberli FR, Joner M, Nakazawa G, Tanner FC, Virmani R. Drug-eluting stent and coronary thrombosis: biological mechanisms and clinical implications. *Circulation*. 2007;115:1051-1058
82. van Beusekom HM, van der Giessen WJ, van Suylen R, Bos E, Bosman FT, Serruys PW. Histology after stenting of human saphenous vein bypass grafts: observations from surgically excised grafts 3 to 320 days after stent implantation. *J Am Coll Cardiol*. 1993;21:45-54
83. van der Giessen WJ, Serruys PW, van Beusekom HM, van Woerkens LJ, van Loon H, Soei LK, Strauss BH, Beatt KJ, Verdouw PD. Coronary stenting with a new, radiopaque, balloon-expandable endoprosthesis in pigs. *Circulation*. 1991;83:1788-1798
84. Sangiorgi G, Arbustini E, Lanzarini P, del Bello B, Maestri M, Gaspari A, Solcia M, Virmani R, Inglese L. Nonbiodegradable expanded polytetrafluoroethylene-covered stent implantation in porcine peripheral arteries: histologic evaluation of vascular wall response compared with uncoated stents. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2001;24:260-270

85. Farb A, Heller PF, Shroff S, Cheng L, Kolodgie FD, Carter AJ, Scott DS, Froehlich J, Virmani R. Pathological analysis of local delivery of paclitaxel via a polymer-coated stent. *Circulation*. 2001;104:473-479
86. Farb A, Kolodgie FD, Hwang JY, Burke AP, Tefera K, Weber DK, Wight TN, Virmani R. Extracellular matrix changes in stented human coronary arteries. *Circulation*. 2004;110:940-947
87. Wiedermann JG, Marboe C, Amols H, Schwartz A, Weinberger J. Intracoronary irradiation markedly reduces restenosis after balloon angioplasty in a porcine model. *J Am Coll Cardiol*. 1994;23:1491-1498
88. Waksman R, Robinson KA, Crocker IR, Gravanis MB, Cipolla GD, King SB, 3rd. Endovascular low-dose irradiation inhibits neointima formation after coronary artery balloon injury in swine. A possible role for radiation therapy in restenosis prevention. *Circulation*. 1995;91:1533-1539
89. Waksman R, Robinson KA, Crocker IR, Gravanis MB, Palmer SJ, Wang C, Cipolla GD, King SB, 3rd. Intracoronary radiation before stent implantation inhibits neointima formation in stented porcine coronary arteries. *Circulation*. 1995;92:1383-1386
90. Waksman R, Robinson KA, Crocker IR, Wang C, Gravanis MB, Cipolla GD, Hillstead RA, King SB, 3rd. Intracoronary low-dose beta-irradiation inhibits neointima formation after coronary artery balloon injury in the swine restenosis model. *Circulation*. 1995;92:3025-3031
91. Wiedermann JG, Marboe C, Amols H, Schwartz A, Weinberger J. Intracoronary irradiation markedly reduces neointimal proliferation after balloon angioplasty in swine: persistent benefit at 6-month follow-up. *J Am Coll Cardiol*. 1995;25:1451-1456
92. Carter AJ, Laird JR. Experimental results with endovascular irradiation via a radioactive stent. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1996;36:797-803
93. Fischell TA, Carter AJ, Laird JR. The beta-particle-emitting radioisotope stent (isostent): animal studies and planned clinical trials. *Am J Cardiol*. 1996;78:45-50
94. Carter AJ, Scott D, Bailey L, Hoopes T, Jones R, Virmani R. Dose-response effects of <sup>32</sup>P radioactive stents in an atherosclerotic porcine coronary model. *Circulation*. 1999;100:1548-1554
95. Farb A, Shroff S, John M, Sweet W, Virmani R. Late arterial responses (6 and 12 months) after (<sup>32</sup>P) beta-emitting stent placement: sustained intimal suppression with incomplete healing. *Circulation*. 2001;103:1912-1919
96. Cheneau E. Absence of full-stent endothelialization 3 months after gamma radiation. *Cardiovasc Radiat Med*. 2001;2:263
97. Coussement PK, Stella P, Vanbilloen H, Verbruggen A, van Rijk P, Hoekstra A, Van Limbergen E, de Jaegere P, De Scheerder I. Intracoronary beta-radiation of de novo coronary lesions using a (<sup>186</sup>Re) liquid-filled balloon system: six-month results from a clinical feasibility study. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2002;55:28-36
98. Cheneau E, John MC, Fournadjiev J, Chan RC, Kim HS, Leborgne L, Pakala R, Yazdi H, Ajani AE, Virmani R, Waksman R. Time course of stent endothelialization after intravascular radiation therapy in rabbit iliac arteries. *Circulation*. 2003;107:2153-2158
99. Kay IP, Wardeh AJ, Kozuma K, Foley DP, Knook AH, Thury A, Sianos G, van der Giessen WJ, Levendag PC, Serruys PW. Radioactive stents delay but do not prevent in-stent neointimal hyperplasia. *Circulation*. 2001;103:14-17
100. Carter AJ, Laird JR, Bailey LR, Hoopes TG, Farb A, Fischell DR, Fischell RE, Fischell TA, Virmani R. Effects of endovascular radiation from a beta-particle-emitting stent in a porcine coronary restenosis model. A dose-response study. *Circulation*. 1996;94:2364-2368
101. Farb A, Tang AL, Shroff S, Sweet W, Virmani R. Neointimal responses 3 months after (<sup>32</sup>P) beta-emitting stent placement. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2000;48:889-898

102. Kaluza GL, Raizner AE, Mazur W, Schulz DG, Buegler JM, Fajardo LF, Tio FO, Ali NM. Long-term effects of intracoronary beta-radiation in balloon- and stent-injured porcine coronary arteries. *Circulation*. 2001;103:2108-2113
103. Leon MB, Teirstein PS, Moses JW, Tripuraneni P, Lansky AJ, Jani S, Wong SC, Fish D, Ellis S, Holmes DR, Kerieakes D, Kuntz RE. Localized intracoronary gamma-radiation therapy to inhibit the recurrence of restenosis after stenting. *The New England journal of medicine*. 2001;344:250-256
104. Gallo R, Padurean A, Jayaraman T, Marx S, Roque M, Adelman S, Chesebro J, Fallon J, Fuster V, Marks A, Badimon JJ. Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by targeting regulators of the cell cycle. *Circulation*. 1999;99:2164-2170
105. Suzuki T, Kopia G, Hayashi S, Bailey LR, Llanos G, Wilensky R, Klugherz BD, Papandreou G, Narayan P, Leon MB, Yeung AC, Tio F, Tsao PS, Falotico R, Carter AJ. Stent-based delivery of sirolimus reduces neointimal formation in a porcine coronary model. *Circulation*. 2001;104:1188-1193
106. Klugherz BD, Llanos G, Lieuallen W, Kopia GA, Papandreou G, Narayan P, Sasseen B, Adelman SJ, Falotico R, Wilensky RL. Twenty-eight-day efficacy and pharmacokinetics of the sirolimus-eluting stent. *Coron Artery Dis*. 2002;13:183-188
107. Carter AJ, Aggarwal M, Kopia GA, Tio F, Tsao PS, Kolata R, Yeung AC, Llanos G, Dooley J, Falotico R. Long-term effects of polymer-based, slow-release, sirolimus-eluting stents in a porcine coronary model. *Cardiovasc Res*. 2004;63:617-624
108. Kerner A, Gruberg L, Kapeliovich M, Grenadier E. Late stent thrombosis after implantation of a sirolimus-eluting stent. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2003;60:505-508
109. McFadden EP, Stabile E, Regar E, Cheneau E, Ong AT, Kinnaird T, Suddath WO, Weissman NJ, Torguson R, Kent KM, Pichard AD, Satler LF, Waksman R, Serruys PW. Late thrombosis in drug-eluting coronary stents after discontinuation of antiplatelet therapy. *Lancet*. 2004;364:1519-1521
110. Grube E, Silber S, Hauptmann KE, Mueller R, Buellfeld L, Gerckens U, Russell ME. TAXUS I: six- and twelve-month results from a randomized, double-blind trial on a slow-release paclitaxel-eluting stent for de novo coronary lesions. *Circulation*. 2003;107:38-42
111. Cilingiroglu M, Elliott J, Patel D, Tio F, Matthews H, McCasland M, Trauthen B, Elicker J, Bailey SR. Long-term effects of novel biolimus eluting DEVAX AXCESS plus nitinol self-expanding stent in a porcine coronary model. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2006;68:271-279
112. Virmani R, Liistro F, Stankovic G, Di Mario C, Montorfano M, Farb A, Kolodgie FD, Colombo A. Mechanism of late in-stent restenosis after implantation of a paclitaxel derivate-eluting polymer stent system in humans. *Circulation*. 2002;106:2649-2651
113. Cosgrave J, Qasim A, Latib A, Aranzulla TC, Colombo A. Very late restenosis after paclitaxel-eluting stent implantation. *Ann Intern Med*. 2007;147:885-887
114. Lopez-Palop R, Carrillo P, Frutos A, Cordero A. Very late restenosis of a paclitaxel-eluting stent implanted to treat previous in-stent restenosis of a bare metal stent. *Rev Esp Cardiol*. 2010;63:1101-1103
115. Wessely R, Kastrati A, Schomig A. Late restenosis in patients receiving a polymer-coated sirolimus-eluting stent. *Ann Intern Med*. 2005;143:392-394
116. Cosgrave J, Corbett SJ, Melzi G, Babic R, Biondi-Zoccai GG, Airoidi F, Chieffo A, Sangiorgi GM, Montorfano M, Michev I, Carlino M, Colombo A. Late restenosis following sirolimus-eluting stent implantation. *Am J Cardiol*. 2007;100:41-44
117. Kuriyama N, Kobayashi Y, Nakama T, Mine D, Nishihira K, Shimomura M, Nomura K, Ashikaga K, Matsuyama A, Shibata Y. Late restenosis following sirolimus-eluting stent implantation. *JACC Cardiovasc Interv*. 2011;4:123-128
118. Aoki J, Colombo A, Dudek D, Banning AP, Drzewiecki J, Zmudka K, Schiele F, Russell ME, Koglin J, Serruys PW. Persistent remodeling and neointimal suppression 2 years after polymer-based, paclitaxel-eluting stent

- implantation: insights from serial intravascular ultrasound analysis in the TAXUS II study. *Circulation*. 2005;112:3876-3883
119. Park DW, Hong MK, Mintz GS, Lee CW, Song JM, Han KH, Kang DH, Cheong SS, Song JK, Kim JJ, Weissman NJ, Park SW, Park SJ. Two-year follow-up of the quantitative angiographic and volumetric intravascular ultrasound analysis after nonpolymeric paclitaxel-eluting stent implantation: late "catch-up" phenomenon from ASPECT Study. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48:2432-2439
  120. Byrne RA, Iijima R, Mehilli J, Piniček S, Bruskina O, Schomig A, Kastrati A. Durability of antirestenotic efficacy in drug-eluting stents with and without permanent polymer. *JACC Cardiovasc Interv*. 2009;2:291-299
  121. Ramcharitar S, Garcia-Garcia HM, Nakazawa G, Kukreja N, Ligthart J, Virmani R, Serruys PW. Ultrasonic and pathological evidence of a neo-intimal plaque rupture in patients with bare metal stents. *EuroIntervention*. 2007;3:290-291
  122. Takano M, Yamamoto M, Inami S, Murakami D, Ohba T, Seino Y, Mizuno K. Appearance of Lipid-Laden Intima and Neovascularization After Implantation of Bare-Metal Stents. *J Am Coll Cardiol*. 2009;55:26-32
  123. Kang SJ, Mintz GS, Akasaka T, Park DW, Lee JY, Kim WJ, Lee SW, Kim YH, Lee CW, Park SW, Park SJ. Optical Coherence Tomographic Analysis of In-Stent Neointimal Proliferation After Drug-Eluting Stent Implantation. *Circulation*. 2011
  124. Nakazawa G, Otsuka F, Nakano M, Vorpahl M, Yazdani SK, Ladich E, Kolodgie FD, Finn AV, Virmani R. The pathology of neointimal proliferation in human coronary implants bare-metal and drug-eluting stents. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57:1314-1322
  125. Chen JP, Hou D, Pendyala L, Goudevenos JA, Kounis NG. Drug-Eluting Stent Thrombosis: The Kounis Hypersensitivity-Associated Acute Coronary Syndrome Revisited. *JACC Cardiovasc Interv*. 2009;2:583-593
  126. Farb A, Burke AP, Kolodgie FD, Virmani R. Pathological mechanisms of fatal late coronary stent thrombosis in humans. *Circulation*. 2003;108:1701-1706
  127. Joner M, Finn AV, Farb A, Mont EK, Kolodgie FD, Ladich E, Kutys R, Skorija K, Gold HK, Virmani R. Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48:193-202
  128. Finn AV, Joner M, Nakazawa G, Kolodgie F, Newell J, John MC, Gold HK, Virmani R. Pathological correlates of late drug-eluting stent thrombosis: strut coverage as a marker of endothelialization. *Circulation*. 2007;115:2435-2441
  129. Nakazawa G, Finn AV, Vorpahl M, Ladich E, Kutys R, Balazs I, Kolodgie FD, Virmani R. Incidence and Predictors of Drug-Eluting Stent Fracture in Human Coronary Artery. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:1924-1931
  130. Nakazawa G, Finn AV, John MC, Kolodgie FD, Virmani R. The significance of preclinical evaluation of sirolimus-, paclitaxel-, and zotarolimus-eluting stents. *Am J Cardiol*. 2007;100:36M-44M
  131. Wilson G, Polovick J, Huibregtse B, Poff B. Overlapping paclitaxel-eluting stents: Long-term effects in a porcine coronary artery model. *Cardiovascular Research*. 2007;76:361-372
  132. Shinke T, Li J, Chen JP, Pendyala L, Goodchild T, Jabara R, Geva S, Ueno T, Chronos N, Robinson K, Hou D. High Incidence of Intramural Thrombus After Overlapping Paclitaxel-Eluting Stent Implantation: Angioscopic and Histopathologic Analysis in Porcine Coronary Arteries. *Circ Cardiovasc Interv*. 2008;1:28-35
  133. van Beusekom HM, Sorop O, van den Heuvel M, Onuma Y, Duncker DJ, Danser AH, van der Giessen WJ. Endothelial function rather than endothelial restoration is altered in paclitaxel- as compared to bare metal-, sirolimus- and tacrolimus-eluting stents. *EuroIntervention*. 2010;6:117-125
  134. Nakazawa G, Nakano M, Otsuka F, Wilcox JN, Melder R, Pruitt S, Kolodgie FD, Virmani R. Evaluation of polymer-based comparator drug-eluting stents using a rabbit model of iliac artery atherosclerosis. *Circ Cardiovasc Interv*. 2011;4:38-46

135. Lerman A, Eeckhout E. Coronary endothelial dysfunction following sirolimus-eluting stent placement: should we worry about it? *Eur Heart J*. 2006;27:125-126
136. van Beusekom HMM, Sorop O, van den Heuvel M, Onuma Y, Duncker D, Danser J, van der Giessen WJ. Early endothelialization in paclitaxel eluting stents is similar to other drug eluting stents but shows transient endothelial dysfunction (Abst). *EuroIntervention*. 2009;5:E65
137. Pendyala LK, Yin X, Li J, Chen JP, Chronos N, Hou D. The First-Generation Drug-Eluting Stents and Coronary Endothelial Dysfunction. *JACC Cardiovasc Interv*. 2009;2:1169-1177
138. Muhlestein JB. Endothelial Dysfunction Associated With Drug-Eluting Stents. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51:2139-2140
139. van den Heuvel M, Sorop O, Batenburg WW, Bakker CL, de Vries R, Koopmans SJ, van Beusekom HM, Duncker DJ, Danser AH, van der Giessen WJ. Specific coronary drug-eluting stents interfere with distal microvascular function after single stent implantation in pigs. *JACC Cardiovasc Interv*. 2010;3:723-730
140. van Beusekom HM, Serruys PW. Drug-eluting stent endothelium: presence or dysfunction. *JACC Cardiovasc Interv*. 2010;3:76-77
141. van Beusekom HM, Whelan DM, Hofma SH, Krabbendam SC, van Hinsbergh VW, Verdouw PD, van der Giessen WJ. Long-term endothelial dysfunction is more pronounced after stenting than after balloon angioplasty in porcine coronary arteries. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32:1109-1117
142. Mehta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev*. 2006;86:279-367
143. Falati S, Patil S, Gross PL, Stapleton M, Merrill-Skoloff G, Barrett NE, Pixton KL, Weiler H, Cooley B, Newman DK, Newman PJ, Furie BC, Furie B, Gibbins JM. Platelet PECAM-1 inhibits thrombus formation in vivo. *Blood*. 2006;107:535-541
144. Binette TM, Taylor FB, Jr., Peer G, Bajzar L. Thrombin-thrombomodulin connects coagulation and fibrinolysis: more than an in vitro phenomenon. *Blood*. 2007;110:3168-3175
145. Isermann B, Hendrickson SB, Zogg M, Wing M, Cumiskey M, Kisanuki YY, Yanagisawa M, Weiler H. Endothelium-specific loss of murine thrombomodulin disrupts the protein C anticoagulant pathway and causes juvenile-onset thrombosis. *J Clin Invest*. 2001;108:537-546
146. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*. 1997;18:4-25
147. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288:373-376
148. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988;332:411-415
149. Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J*. 1989;3:2007-2018
150. Togni M, Windecker S, Cocchia R, Wenaweser P, Cook S, Billinger M, Meier B, Hess OM. Sirolimus-Eluting Stents Associated With Paradoxical Coronary Vasoconstriction. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:231-236
151. Jeanmart H, Malo O, Carrier M, Nickner C, Desjardins N, Perrault LP. Comparative study of cyclosporine and tacrolimus vs newer immunosuppressants mycophenolate mofetil and rapamycin on coronary endothelial function. *J Heart Lung Transplant*. 2002;21:990-998
152. Kipshidze N, Leon MB. Endothelial dysfunction after drug-eluting stent was never predicted in preclinical studies. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47:1911; author reply 1912-1913
153. Li J, Jabara R, Pendyala L, Otsuka Y, Shinke T, Hou D, Robinson K, Chronos N. Abnormal Vasomotor Function of Porcine Coronary Arteries Distal to Sirolimus-Eluting Stents. *JACC Cardiovasc Interv*. 2008;1:279-285

154. Hofma SH, van der Giessen WJ, van Dalen BM, Lemos PA, McFadden EP, Sianos G, Ligthart JM, van Essen D, de Feyter PJ, Serruys PW. Indication of long-term endothelial dysfunction after sirolimus-eluting stent implantation. *Eur Heart J*. 2006;27:166-170
155. Shin DI, Kim PJ, Seung KB, Kim DB, Kim MJ, Chang K, Lim SM, Jeon DS, Chung WS, Baek SH, Lee MY. Drug-eluting stent implantation could be associated with long-term coronary endothelial dysfunction. *Int Heart J*. 2007;48:553-567
156. Obata JE, Kitta Y, Takano H, Kodama Y, Nakamura T, Mende A, Kawabata K, Saitoh Y, Fujioka D, Kobayashi T, Yano T, Kugiyama K. Sirolimus-eluting stent implantation aggravates endothelial vasomotor dysfunction in the infarct-related coronary artery in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50:1305-1309
157. Kim JW, Suh SY, Choi CU, Na JO, Kim EJ, Rha S-W, Park CG, Seo HS, Oh DJ. Six-Month Comparison of Coronary Endothelial Dysfunction Associated With Sirolimus-Eluting Stent Versus Paclitaxel-Eluting Stent. *JACC Cardiovasc Interv*. 2008;1:65-71
158. Hamilos MI, Ostojic M, Beleslin B, Sagic D, Mangovski L, Stojkovic S, Nedeljkovic M, Orlic D, Milosavljevic B, Topic D, Karanovic N, Wijns W. Differential effects of drug-eluting stents on local endothelium-dependent coronary vasomotion. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51:2123-2129
159. Hamilos M, Sarma J, Ostojic M, Cuisset T, Sarno G, Melikian N, Ntalianis A, Muller O, Barbato E, Beleslin B, Sagic D, De Bruyne B, Bartunek J, Wijns W. Interference of Drug-Eluting Stents With Endothelium-Dependent Coronary Vasomotion: Evidence for Device-Specific Responses. *Circ Cardiovasc Interv*. 2008;1:193-200
160. Kim JW, Seo HS, Park JH, Na JO, Choi CU, Lim HE, Kim EJ, Rha S-W, Park CG, Oh DJ. A Prospective, Randomized, 6-Month Comparison of the Coronary Vasomotor Response Associated With a Zotarolimus-Versus a Sirolimus-Eluting Stent. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53:1653-1659
161. Farhan S, Hemetsberger R, Matiasek J, Strehblow C, Pavo N, Khorsand A, Petnehazy O, Petrasi Z, Kaider A, Glogar D, Huber K, Gyongyosi M. Implantation of paclitaxel-eluting stent impairs the vascular compliance of arteries in porcine coronary stenting model. *Atherosclerosis*. 2009;202:144-151
162. Pendyala LK, Li J, Shinke T, Geva S, Yin X, Chen JP, King SB, III, Robinson KA, Chronos NAF, Hou D. Endothelium-Dependent Vasomotor Dysfunction in Pig Coronary Arteries With Paclitaxel-Eluting Stents Is Associated With Inflammation and Oxidative Stress. *JACC Cardiovasc Interv*. 2009;2:253-262
163. Togni M, Raber L, Cocchia R, Wenaweser P, Cook S, Windecker S, Meier B, Hess OM. Local vascular dysfunction after coronary paclitaxel-eluting stent implantation. *Int J Cardiol*. 2007;120:212-220
164. Pendyala LK, Matsumoto D, Shinke T, Iwasaki T, Sugimoto R, Hou D, Chen JP, Singh J, King SB, 3rd, Chronos N, Li J. Nobori stent shows less vascular inflammation and early recovery of endothelial function compared with cypher stent. *JACC Cardiovasc Interv*. 2012;5:436-444
165. Gossli M, Rosol M, Malyar NM, Fitzpatrick LA, Beighley PE, Zamir M, Ritman EL. Functional anatomy and hemodynamic characteristics of vasa vasorum in the walls of porcine coronary arteries. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2003;272:526-537
166. Sahler LG, Davis D, Saad WE, Patel NC, Lee DE, Waldman DL. Comparison of vasa vasorum after intravascular stent placement with sirolimus drug-eluting and bare metal stents. *J Med Imaging Radiat Oncol*. 2008;52:570-575
167. Kitta Y, Nakamura T, Kodama Y, Takano H, Umetani K, Fujioka D, Saito Y, Kawabata K, Obata JE, Ichigi Y, Mende A, Kugiyama K. Endothelial vasomotor dysfunction in the brachial artery is associated with late in-stent coronary restenosis. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:648-655
168. Chia S, Megson IL, Ludlam CA, Fox KA, Newby DE. Preserved endothelial vasomotion and fibrinolytic function in patients with acute stent thrombosis or in-stent restenosis. *Thromb Res*. 2003;111:343-349

169. Pelliccia F, Cianfrocca C, Rosano G, Mercurio G, Speciale G, Pasceri V. Role of Endothelial Progenitor Cells in Restenosis and Progression of Coronary Atherosclerosis After Percutaneous Coronary Intervention A Prospective Study. *JACC Cardiovasc Interv.* 2010;3:78-86
170. Kipshidze N, Dangas G, Tsapenko M, Moses J, Leon MB, Kutryk M, Serruys P. Role of the endothelium in modulating neointimal formation. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44:733-739
171. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1989;83:1774-1777
172. Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis. *Circ J.* 2009;73:595-601
173. Bjorkerud S, Bondjers G. Arterial repair and atherosclerosis after mechanical injury. 5. Tissue response after induction of a large superficial transverse injury. *Atherosclerosis.* 1973;18:235-255
174. Shirotani M, Yui Y, Kawai C. Restenosis after Coronary Angioplasty: Pathogenesis of Neointimal Thickening Initiated by Endothelial Loss. *Endothelium.* 1993;1:5-22
175. Haudenschild CC, Schwartz SM. Endothelial regeneration. II. Restitution of endothelial continuity. *Lab Invest.* 1979;41:407-418
176. Stump MM, Jordan GL, Jr., Debakey ME, Halpert B. Endothelium Grown from Circulating Blood on Isolated Intravascular Dacron Hub. *Am J Pathol.* 1963;43:361-367
177. Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation.* 2003;107:1164-1169
178. Van Belle E, Maillard L, Tio FO, Isner JM. Accelerated endothelialization by local delivery of recombinant human vascular endothelial growth factor reduces in-stent intimal formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;235:311-316
179. Shibata M, Suzuki H, Nakatani M, Koba S, Geshi E, Katagiri T, Takeyama Y. The involvement of vascular endothelial growth factor and flt-1 in the process of neointimal proliferation in pig coronary arteries following stent implantation. *Histochem Cell Biol.* 2001;116:471-481
180. Werner N, Junk S, Laufs U, Link A, Walenta K, Bohm M, Nickenig G. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circ Res.* 2003;93:e17-24
181. Gomma AH, Elrayess MA, Knight CJ, Hawe E, Fox KM, Humphries SE. The endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp and -786T>C) gene polymorphisms are associated with coronary in-stent restenosis. *Eur Heart J.* 2002;23:1955-1962
182. Suzuki T, Okumura K, Sone T, Kosokabe T, Tsuboi H, Kondo J, Mukawa H, Kamiya H, Tomida T, Imai H, Matsui H, Hayakawa T. The Glu298Asp polymorphism in endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary in-stent restenosis. *Int J Cardiol.* 2002;86:71-76
183. George J, Herz I, Goldstein E, Abashidze S, Deutch V, Finkelstein A, Michowitz Y, Miller H, Keren G. Number and adhesive properties of circulating endothelial progenitor cells in patients with in-stent restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:e57-60
184. Shiota T, Yasui H, Matsuda T. Intraluminal tissue-engineered therapeutic stent using endothelial progenitor cell-inoculated hybrid tissue and in vitro performance. *Tissue Eng.* 2003;9:473-485
185. Shiota T, Yasui H, Shimokawa H, Matsuda T. Fabrication of endothelial progenitor cell (EPC)-seeded intravascular stent devices and in vitro endothelialization on hybrid vascular tissue. *Biomaterials.* 2003;24:2295-2302
186. Kutryk MJ, Kuliszewski MA. In vivo endothelial progenitor cell seeding for the accelerated endothelialization of endovascular devices. *Am J Cardiol.* 2003;92:94L-95L

187. Aoki J, Serruys PW, van Beusekom H, Ong AT, McFadden EP, Sianos G, van der Giessen WJ, Regar E, de Feyter PJ, Davis HR, Rowland S, Kutryk MJ. Endothelial progenitor cell capture by stents coated with antibody against CD34: the HEALING-FIM (Healthy Endothelial Accelerated Lining Inhibits Neointimal Growth-First In Man) Registry. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45:1574-1579
188. Duckers HJ, Silber S, de Winter R, den Heijer P, Rensing B, Rau M, Mudra H, Benit E, Verheye S, Wijns W, Serruys PW. Circulating endothelial progenitor cells predict angiographic and intravascular ultrasound outcome following percutaneous coronary interventions in the HEALING-II trial: evaluation of an endothelial progenitor cell capturing stent. *EuroIntervention*. 2007;3:67-75
189. Duckers HJ, Soullie T, den Heijer P, Rensing B, de Winter RJ, Rau M, Mudra H, Silber S, Benit E, Verheye S, Wijns W, Serruys PW. Accelerated vascular repair following percutaneous coronary intervention by capture of endothelial progenitor cells promotes regression of neointimal growth at long term follow-up: final results of the Healing II trial using an endothelial progenitor cell capturing stent (Genous R stent). *EuroIntervention*. 2007;3:350-358
190. Rotmans JI. In Vivo Cell Seeding With Anti-CD34 Antibodies Successfully Accelerates Endothelialization but Stimulates Intimal Hyperplasia in Porcine Arteriovenous Expanded Polytetrafluoroethylene Grafts. *Circulation*. 2005;112:12-18
191. Schober A, Hoffmann R, Oprea N, Knarren S, Iofina E, Hutschenreuter G, Hanrath P, Weber C. Peripheral CD34+ cells and the risk of in-stent restenosis in patients with coronary heart disease. *Am J Cardiol*. 2005;96:1116-1122
192. Inoue T, Sata M, Hikichi Y, Sohma R, Fukuda D, Uchida T, Shimizu M, Komoda H, Node K. Mobilization of CD34-positive bone marrow-derived cells after coronary stent implantation: impact on restenosis. *Circulation*. 2007;115:553-561
193. Blindt R, Vogt F, Astafieva I, Fach C, Hristov M, Krott N, Seitz B, Kapurniotu A, Kwok C, Dewor M, Bosserhoff AK, Bernhagen J, Hanrath P, Hoffmann R, Weber C. A novel drug-eluting stent coated with an integrin-binding cyclic Arg-Gly-Asp peptide inhibits neointimal hyperplasia by recruiting endothelial progenitor cells. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47:1786-1795
194. Joner M, Cheng Q, Schonhofer-Merl S, Lopez M, Neubauer S, Mas-Moruno C, Laufer B, Kolodgie FD, Kessler H, Virmani R. Polymer-free immobilization of a cyclic RGD peptide on a nitinol stent promotes integrin-dependent endothelial coverage of strut surfaces. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2012;100:637-645
195. Koster R, Vieluf D, Kiehn M, Sommerauer M, Kahler J, Baldus S, Meinertz T, Hamm CW. Nickel and molybdenum contact allergies in patients with coronary in-stent restenosis. *Lancet*. 2000;356:1895-1897
196. Messer RL, Wataha JC, Lewis JB, Lockwood PE, Caughman GB, Tseng WY. Effect of vascular stent alloys on expression of cellular adhesion molecules by endothelial cells. *J Long Term Eff Med Implants*. 2005;15:39-47
197. Norgaz T, Hobikoglu G, Serdar ZA, Aksu H, Alper AT, Ozer O, Narin A. Is there a link between nickel allergy and coronary stent restenosis? *Tohoku J Exp Med*. 2005;206:243-246
198. Kastrati A, Mehilli J, Dirschinger J, Dotzer F, Schuhlen H, Neumann FJ, Fleckenstein M, Pfafferott C, Seyfarth M, Schomig A. Intracoronary stenting and angiographic results: strut thickness effect on restenosis outcome (ISAR-STEREO) trial. *Circulation*. 2001;103:2816-2821
199. Pache J, Kastrati A, Mehilli J, Schuhlen H, Dotzer F, Hausleiter J, Fleckenstein M, Neumann FJ, Sattelberger U, Schmitt C, Muller M, Dirschinger J, Schomig A. Intracoronary stenting and angiographic results: strut thickness effect on restenosis outcome (ISAR-STEREO-2) trial. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:1283-1288
200. Briguori C, Sarais C, Pagnotta P, Liistro F, Montorfano M, Chieffo A, Sgura F, Corvaja N, Albiero R, Stankovic G, Toutoutzas C, Bonizzoni E, Di Mario C, Colombo A. In-stent restenosis in small coronary arteries: impact of strut thickness. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40:403-409



201. Garasic JM, Edelman ER, Squire JC, Seifert P, Williams MS, Rogers C. Stent and artery geometry determine intimal thickening independent of arterial injury. *Circulation*. 2000;101:812-818
202. Soucy NV, Feygin JM, Tunstall R, Casey MA, Pennington DE, Huibregtse BA, Barry JJ. Strut tissue coverage and endothelial cell coverage: a comparison between bare metal stent platforms and platinum chromium stents with and without everolimus-eluting coating. *EuroIntervention*. 2010;6:630-637
203. Simon C, Palmaz JC, Sprague EA. Influence of topography on endothelialization of stents: clues for new designs. *J Long Term Eff Med Implants*. 2000;10:143-151
204. Ormiston JA, Webster MW, Ruygrok PN. Stent strut thickness and restenosis. *Circulation*. 2002;105:E12
205. Hofma SH, Whelan DM, van Beusekom HM, Verdouw PD, van der Giessen WJ. Increasing arterial wall injury after long-term implantation of two types of stent in a porcine coronary model. *Eur Heart J*. 1998;19:601-609
206. Hong MK, Beyar R, Kornowski R, Tio FO, Bramwell O, Leon MB. Acute and chronic effects of self-expanding nitinol stents in porcine coronary arteries. *Coron Artery Dis*. 1997;8:45-48
207. Sprague EA, Luo J, Palmaz JC. Endothelial cell migration onto metal stent surfaces under static and flow conditions. *J Long Term Eff Med Implants*. 2000;10:97-110
208. Hamuro M, Palmaz JC, Sprague EA, Fuss C, Luo J. Influence of stent edge angle on endothelialization in an in vitro model. *J Vasc Interv Radiol*. 2001;12:607-611
209. Meng S, Liu Z, Shen L, Guo Z, Chou LL, Zhong W, Du Q, Ge J. The effect of a layer-by-layer chitosan-heparin coating on the endothelialization and coagulation properties of a coronary stent system. *Biomaterials*. 2009;30:2276-2283
210. Lin Q, Yan J, Qiu F, Song X, Fu G, Ji J. Heparin/collagen multilayer as a thromboresistant and endothelial favorable coating for intravascular stent. *J Biomed Mater Res A*. 2011;96:132-141
211. Tomai F, Ghini AS, Ferri C, Desideri G, Versaci F, Gaspardone A, Altamura L, Magliano G, Crea F, Chiariello L. Effects of carbon-coated coronary stents on the markers of inflammation, thrombin generation and platelet and endothelial activation. *Ital Heart J*. 2003;4:23-28
212. Bhargava B, Reddy NK, Karthikeyan G, Raju R, Mishra S, Singh S, Waksman R, Virmani R, Somaraju B. A novel paclitaxel-eluting porous carbon-carbon nanoparticle coated, nonpolymeric cobalt-chromium stent: evaluation in a porcine model. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2006;67:698-702
213. Windecker S, Mayer I, De Pasquale G, Maier W, Dirsch O, De Groot P, Wu YP, Noll G, Leskosek B, Meier B, Hess OM. Stent coating with titanium-nitride-oxide for reduction of neointimal hyperplasia. *Circulation*. 2001;104:928-933
214. Pilgrim T, Raber L, Limacher A, Loffel L, Wenaweser P, Cook S, Stauffer JC, Togni M, Vogel R, Garachemani A, Moschovitis A, Khattab AA, Seiler C, Meier B, Juni P, Windecker S. Comparison of titanium-nitride-oxide-coated stents with zotarolimus-eluting stents for coronary revascularization a randomized controlled trial. *JACC Cardiovasc Interv*. 2011;4:672-682
215. Hansi C, Arab A, Rzany A, Ahrens I, Bode C, Hehrlein C. Differences of platelet adhesion and thrombus activation on amorphous silicon carbide, magnesium alloy, stainless steel, and cobalt chromium stent surfaces. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2009;73:488-496
216. Rzany A, Schaldach M. Smart Material Silicon Carbide: Reduced Activation of Cells and Proteins on a-SiC:H-coated Stainless Steel. *Prog Biomed Res*. 2001;4:182-194
217. Dahm JB, Willems T, Wolpers HG, Nordbeck H, Becker J, Ruppert J. Clinical investigation into the observation that silicon carbide coating on cobalt chromium stents leads to early differentiating functional endothelial layer, increased safety and DES-like recurrent stenosis rates: results of the PRO-Heal Registry (PRO-Kinetic enhancing rapid in-stent endothelialisation). *EuroIntervention*. 2009;4:502-508

218. Tamai H, Igaki K, Tsuji T, Kyo E, Kosuga K, Kawashima A, Matsui S, Komori H, Motohara S, Uehata H, Takeuchi E. A Biodegradable Poly-L-lactic Acid Coronary Stent in the Porcine Coronary Artery. *Journal of Interventional Cardiology*. 1999;12:443-450
219. Tamai H, Igaki K, Kyo E, Kosuga K, Kawashima A, Matsui S, Komori H, Tsuji T, Motohara S, Uehata H. Initial and 6-month results of biodegradable poly-L-lactic acid coronary stents in humans. *Circulation*. 2000;102:399-404
220. Pollman M. Engineering a bioabsorbable stent: REVA programme update. *EuroIntervention*. 2009;5:F54-F57
221. Jabara R, Pendyala L, Geva S, Chen J, Chronos N, Robinson K. Novel fully bioabsorbable salicylate-based sirolimus-eluting stent. *EuroIntervention*. 2009;5 Suppl F:F58-64
222. Waksman R, Erbel R, Di Mario C, Bartunek J, de Bruyne B, Eberli FR, Erne P, Haude M, Horrigan M, Ilesley C, Bose D, Bonnier H, Koolen J, Luscher TF, Weissman NJ. Early- and long-term intravascular ultrasound and angiographic findings after bioabsorbable magnesium stent implantation in human coronary arteries. *JACC Cardiovasc Interv*. 2009;2:312-320
223. Peuster M, Wohlsein P, Bruggmann M, Ehlerding M, Seidler K, Fink C, Brauer H, Fischer A, Hausdorf G. A novel approach to temporary stenting: degradable cardiovascular stents produced from corrodible metal-results 6-18 months after implantation into New Zealand white rabbits. *Heart*. 2001;86:563-569
224. Waksman R, Pakala R, Baffour R, Seabron R, Hellinga D, Tio FO. Short-term effects of biocorrosible iron stents in porcine coronary arteries. *J Interv Cardiol*. 2008;21:15-20
225. Cook S, Ladich E, Nakazawa G, Eshtehardi P, Neidhart M, Vogel R, Togni M, Wenaweser P, Billinger M, Seiler C, Gay S, Meier B, Pichler WJ, Juni P, Virmani R, Windecker S. Correlation of intravascular ultrasound findings with histopathological analysis of thrombus aspirates in patients with very late drug-eluting stent thrombosis. *Circulation*. 2009;120:391-399
226. Lewis AL, Tolhurst LA, Stratford PW. Analysis of a phosphorylcholine-based polymer coating on a coronary stent pre- and post-implantation. *Biomaterials*. 2002;23:1697-1706
227. Chin-Quee SL, Hsu SH, Nguyen-Ehrenreich KL, Tai JT, Abraham GM, Pacetti SD, Chan YF, Nakazawa G, Kolodgie FD, Virmani R, Ding NN, Coleman LA. Endothelial cell recovery, acute thrombogenicity, and monocyte adhesion and activation on fluorinated copolymer and phosphorylcholine polymer stent coatings. *Biomaterials*. 2010;31:648-657
228. Garg S, Serruys PW. Coronary stents: current status. *J Am Coll Cardiol*. 2010;56:S1-42
229. Udipi K, Melder RJ, Chen M, Cheng P, Hezi-Yamit A, Sullivan C, Wong J, Wilcox J. The next generation Endeavor Resolute Stent: role of the BiLinX Polymer System. *EuroIntervention*. 2007;3:137-139
230. Stone GW, Midei M, Newman W, Sanz M, Hermiller JB, Williams J, Farhat N, Caputo R, Xenopoulos N, Applegate R, Gordon P, White RM, Sudhir K, Cutlip DE, Petersen JL. Randomized comparison of everolimus-eluting and paclitaxel-eluting stents: two-year clinical follow-up from the Clinical Evaluation of the Xience V Everolimus Eluting Coronary Stent System in the Treatment of Patients with de novo Native Coronary Artery Lesions (SPIRIT) III trial. *Circulation*. 2009;119:680-686
231. Onuma Y, Serruys PW, Kukreja N, Veldhof S, Doostzadeh J, Cao S, Stone GW. Randomized comparison of everolimus- and paclitaxel-eluting stents: pooled analysis of the 2-year clinical follow-up from the SPIRIT II and III trials. *Eur Heart J*. 2010;31:1071-1078
232. Sehgal SN. Rapamune (Sirolimus, rapamycin): an overview and mechanism of action. *Therapeutic drug monitoring*. 1995;17:660-665
233. Fukuda D, Sata M, Tanaka K, Nagai R. Potent inhibitory effect of sirolimus on circulating vascular progenitor cells. *Circulation*. 2005;111:926-931
234. Farb A, John M, Acampado E, Kolodgie FD, Prescott MF, Virmani R. Oral everolimus inhibits in-stent neointimal growth. *Circulation*. 2002;106:2379-2384

235. Waksman R, Pakala R, Baffour R, Hellings D, Seabron R, Kolodgie F, Virmani R. Optimal dosing and duration of oral everolimus to inhibit in-stent neointimal growth in rabbit iliac arteries. *Cardiovasc Revasc Med*. 2006;7:179-184
236. Kandzari DE, Leon MB. Overview of pharmacology and clinical trials program with the zotarolimus-eluting endeavor stent. *J Interv Cardiol*. 2006;19:405-413
237. Tada N, Virmani R, Grant G, Bartlett L, Black A, Clavijo C, Christians U, Betts R, Savage D, Su SH, Shulze J, Kar S. Polymer-free biolimus a9-coated stent demonstrates more sustained intimal inhibition, improved healing, and reduced inflammation compared with a polymer-coated sirolimus-eluting cypher stent in a porcine model. *Circ Cardiovasc Interv*. 2010;3:174-183
238. Garg S, Serruys PW. Coronary stents: looking forward. *J Am Coll Cardiol*. 2010;56:S43-78
239. Bartorelli AL, Trabattoni D, Fabbiochi F, Montorsi P, de Martini S, Calligaris G, Teruzzi G, Galli S, Ravagnani P. Synergy of passive coating and targeted drug delivery: the tacrolimus-eluting Janus CarboStent. *J Interv Cardiol*. 2003;16:499-505
240. Wieneke H, Dirsch O, Sawitowski T, Gu YL, Brauer H, Dahmen U, Fischer A, Wnendt S, Erbel R. Synergistic effects of a novel nanoporous stent coating and tacrolimus on intima proliferation in rabbits. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2003;60:399-407
241. Huang Y, Salu K, Wang L, Liu X, Li S, Lorenz G, Wnendt S, Verbeken E, Bosmans J, Van de Werf F, De Scheerder I. Use of a tacrolimus-eluting stent to inhibit neointimal hyperplasia in a porcine coronary model. *J Invasive Cardiol*. 2005;17:142-148
242. Scheller B, Grandt A, Wnendt S, Lorenz G, Bohm M, Nickenig G. Comparative study of tacrolimus and paclitaxel stent coating in the porcine coronary model. *Z Kardiol*. 2005;94:445-452
243. Morice MC, Bestehorn HP, Carrié D, Macaya C, Aengevaere W, Wijns W, Dubois C, de Winter R, Verheye S, Hoffmann S, Pachinger O, Di Mario C. Direct stenting of de novo coronary stenoses with tacrolimus-eluting versus carbon-coated carbostents. The randomized JUPITER II trial. *EuroIntervention*. 2006;2:45-52
244. van Beusekom H, Sorop O, Weymaere M, Duncker D, van der Giessen WJ. The neointimal response to stents eluting Tacrolimus from a degradable coating depends on the balance between polymer degradation and drug release. *EuroIntervention*. 2008;4:139-147
245. Perez de Prado A, Perez Martinez C, Cuellas Ramon C, Gonzalo Orden JM, Altonaga JR, Garcia Iglesias MJ, Regueiro M, Orden MA, Garcia Marin JF, Fernandez-Vazquez F. Endothelialization of Nonapposed Stent Struts Located over the Origin of a Side Branch. *J Interv Cardiol*. 2009;22:222-227
246. Prunotto M, Vignolini C, Lolli V, Black A, Gaggianesi S, Santarelli A, Galloni M. Short-, mid-, and long-term effects of a polymer-free tacrolimus-eluting stent in a porcine coronary model. *J Biomed Mater Res A*. 2009;88:872-879
247. Perez de Prado A, Perez-Martinez C, Cuellas-Ramon C, Gonzalo-Orden JM, Regueiro-Purrinos M, Martinez B, Garcia-Iglesias MJ, Ajenjo JM, Altonaga JR, Diego-Nieto A, de Miguel A, Fernandez-Vazquez F. Time course of reendothelialization of stents in a normal coronary Swine model: characterization and quantification. *Vet Pathol*. 2011;48:1109-1117
248. Serruys PW, Garg S, Abizaid A, Ormiston J, Windecker S, Verheye S, Dubois C, Stewart J, Hauptmann KE, Schofer J, Stangl K, Witzensbichler B, Wiemer M, Barbato E, de Vries T, den Drijver AM, Otake H, Meredith L, Toyloy S, Fitzgerald P. A randomised comparison of novolimus-eluting and zotarolimus-eluting coronary stents: 9-month follow-up results of the EXCELLA II study. *EuroIntervention*. 2010;6:195-205
249. Honda Y, Grube E, de La Fuente LM, Yock PG, Stertz SH, Fitzgerald PJ. Novel drug-delivery stent: intravascular ultrasound observations from the first human experience with the QP2-eluting polymer stent system. *Circulation*. 2001;104:380-383
250. Kataoka T, Grube E, Honda Y, Morino Y, Hur SH, Bonneau HN, Colombo A, Di Mario C, Guagliumi G, Hauptmann KE, Pitney MR, Lansky AJ, Stertz SH, Yock PG, Fitzgerald PJ. 7-hexanoyltaxol-eluting stent for

- prevention of neointimal growth: an intravascular ultrasound analysis from the Study to COmpare REstenosis rate between QueST and QuaDS-QP2 (SCORE). *Circulation*. 2002;106:1788-1793
251. Herdeg C, Oberhoff M, Baumbach A, Blattner A, Axel DI, Schroder S, Heinle H, Karsch KR. Local paclitaxel delivery for the prevention of restenosis: biological effects and efficacy in vivo. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35:1969-1976
  252. van Beusekom HM, Saia F, Zindler JD, Lemos PA, Swager-Ten Hoor SL, van Leeuwen MA, de Feijter PJ, Serruys PW, van der Giessen WJ. Drug-eluting stents show delayed healing: paclitaxel more pronounced than sirolimus. *Eur Heart J*. 2007;28:974-979
  253. Schomig A, Dibra A, Windecker S, Mehilli J, Suarez de Lezo J, Kaiser C, Park SJ, Goy JJ, Lee JH, Di Lorenzo E, Wu J, Juni P, Pfisterer ME, Meier B, Kastrati A. A meta-analysis of 16 randomized trials of sirolimus-eluting stents versus paclitaxel-eluting stents in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50:1373-1380
  254. Dol F, Mares A, Herbert J. Simvastatin inhibits myointimal hyperplasia following carotid artery injury in cholesterol-fed rabbits. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1996;7:772-778
  255. Hagenaaers T, Gussenhoven EJ, van Sambeek MR, Jukema JW, Kranendonk SE, Bom N. Effect of simvastatin on restenosis after percutaneous transluminal angioplasty of femoropopliteal arterial obstruction. *Am J Cardiol*. 2000;86:774-776, A776
  256. Indolfi C, Cioppa A, Stabile E, Di Lorenzo E, Esposito G, Pisani A, Leccia A, Cavuto L, Stingone AM, Chieffo A, Capozzolo C, Chiariello M. Effects of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor simvastatin on smooth muscle cell proliferation in vitro and neointimal formation in vivo after vascular injury. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35:214-221
  257. Chen Z, Fukutomi T, Zago AC, Ehlers R, Detmers PA, Wright SD, Rogers C, Simon DI. Simvastatin reduces neointimal thickening in low-density lipoprotein receptor-deficient mice after experimental angioplasty without changing plasma lipids. *Circulation*. 2002;106:20-23
  258. Herdeg C, Fitzke M, Oberhoff M, Baumbach A, Schroeder S, Karsch KR. Effects of atorvastatin on in-stent stenosis in normo- and hypercholesterolemic rabbits. *Int J Cardiol*. 2003;91:59-69
  259. Walter DH. Insights into early and rapid effects of statin therapy after coronary interventions. *Curr Pharm Des*. 2004;10:369-373
  260. Jaschke B, Michaelis C, Milz S, Vogeser M, Mund T, Hengst L, Kastrati A, Schomig A, Wessely R. Local statin therapy differentially interferes with smooth muscle and endothelial cell proliferation and reduces neointima on a drug-eluting stent platform. *Cardiovasc Res*. 2005;68:483-492
  261. Petronio AS, Amoroso G, Limbruno U, Papini B, De Carlo M, Micheli A, Ciabatti N, Mariani M. Simvastatin does not inhibit intimal hyperplasia and restenosis but promotes plaque regression in normocholesterolemic patients undergoing coronary stenting: a randomized study with intravascular ultrasound. *American heart journal*. 2005;149:520-526
  262. Miyauchi K, Kasai T, Yokayama T, Aihara K, Kurata T, Kajimoto K, Okazaki S, Ishiyama H, Daida H. Effectiveness of statin-eluting stent on early inflammatory response and neointimal thickness in a porcine coronary model. *Circ J*. 2008;72:832-838
  263. Perez de Prado A, Perez C, Cuellas C, Regueiro M, Diego A, De Miguel A, Gonzalo Orden JM, Altonaga JR, Iglesias MJ, Ajenjo J, Martinez B, Molina M, Duocastella L, Fernandez A, Merlos M, Fernandez-Vazquez F. Vascular healing response to simvastatin-eluting-stent (IRIST®) in a swine coronary model (Abst). *EuroIntervention*. 2009;5:E103
  264. Perez de Prado A, Perez C, Cuellas C, Regueiro M, Diego A, De Miguel A, Martinez B, Ajenjo J, Gonzalo Orden JM, Iglesias MJ, Altonaga JR, Molina M, Duocastella L, Fernandez-Vazquez F. Better Vascular Healing Without Reduction in Anti-Restenotic Effect of a Low-dose Paclitaxel plus Simvastatin Eluting Stent: Preclinical Results (Abst). *J Am Coll Cardiol*. 2010;56:B30

265. New G, Moses JW, Roubin GS, Leon MB, Colombo A, Iyer SS, Tio FO, Mehran R, Kipshidze N. Estrogen-eluting, phosphorylcholine-coated stent implantation is associated with reduced neointimal formation but no delay in vascular repair in a porcine coronary model. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2002;57:266-271
266. Kyriakides ZS, Lymberopoulos E, Papalois A, Kyrzopoulos S, Dafnomili V, Sbarouni E, Kremastinos DT. Estrogen decreases neointimal hyperplasia and improves re-endothelialization in pigs. *Int J Cardiol.* 2006;113:48-53
267. Tepe G, Duda SH, Hanke H, Schulze S, Hagmeier S, Bruck B, Schott U, Betz E, Schmahl FW, Claussen CD. Covered stents for prevention of restenosis. Experimental and clinical results with different stent designs. *Invest Radiol.* 1996;31:223-229
268. Jabara R, Chronos N, Robinson K. Novel bioabsorbable salicylate-based polymer as a drug-eluting stent coating. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2008;72:186-194
269. Joner M, Morimoto K, Kasukawa H, Steigerwald K, Merl S, Nakazawa G, John MC, Finn AV, Acampado E, Kolodgie FD, Gold HK, Virmani R. Site-specific targeting of nanoparticle prednisolone reduces in-stent restenosis in a rabbit model of established atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:1960-1966
270. Gallagher H, Carroll WM, Dowd M, Rochev Y. The effects of vinblastine on endothelial cells. *Endothelium.* 2008;15:9-15
271. Gallagher H, Carroll WM, Rochev Y. The effects of vinblastine on smooth muscle cells in vitro: evaluation of a therapeutic window for the treatment of restenosis. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2010;55:399-407
272. Perez de Prado A, Perez-Martinez C, Cuellas-Ramon C, Gonzalo-Orden JM, Regueiro-Purrinos M, Martinez-Fernandez B, Diego-Nieto A, Fernandez-Vazquez F. Scanning electron microscopy analysis of luminal inflammation induced by different types of coronary stent in an animal model. *Rev Esp Cardiol.* 2011;64:159-162
273. Serruys PW, Ormiston JA, Sianos G, Sousa JE, Grube E, den Heijer P, de Feyter P, Buszman P, Schomig A, Marco J, Polonski L, Thuesen L, Zeiher AM, Bett JH, Suttorp MJ, Glogar HD, Pitney M, Wilkins GT, Whitbourn R, Veldhof S, Miquel K, Johnson R, Coleman L, Virmani R. Actinomycin-eluting stent for coronary revascularization: a randomized feasibility and safety study: the ACTION trial. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44:1363-1367
274. van der Giessen WJ, Sorop O, Serruys PW, Peters-Krabbendam I, van Beusekom HM. Lowering the dose of sirolimus, released from a nonpolymeric hydroxyapatite coated coronary stent, reduces signs of delayed healing. *JACC Cardiovasc Interv.* 2009;2:284-290
275. Ranade SV, Miller KM, Richard RE, Chan AK, Allen MJ, Helmus MN. Physical characterization of controlled release of paclitaxel from the TAXUS Express2 drug-eluting stent. *J Biomed Mater Res.* 2004;71A:625-634
276. Aragon J, Kar S, Tio F, Trauthen B, Parisky A, Watanabe C, Jamali A, Eigler N, Serruys PW, Litvack F. The effect of variable release kinetics on Paclitaxel efficacy from a drug eluting stent in a porcine model. *EuroIntervention.* 2005;1:228-235
277. Serruys PW, Sianos G, Abizaid A, Aoki J, den Heijer P, Bonnier H, Smits P, McClean D, Verheye S, Belardi J, Condado J, Pieper M, Gambone L, Bressers M, Symons J, Sousa E, Litvack F. The effect of variable dose and release kinetics on neointimal hyperplasia using a novel paclitaxel-eluting stent platform: the Paclitaxel In-Stent Controlled Elution Study (PISCES). *J Am Coll Cardiol.* 2005;46:253-260
278. Lao LL, Venkatraman SS. Adjustable paclitaxel release kinetics and its efficacy to inhibit smooth muscle cells proliferation. *J Control Release.* 2008;130:9-14
279. Wang Q, Pierson W, Sood P, Bol C, Cannon L, Gordon P, Saucedo J, Sudhir K. Pharmacokinetic sub-study in the SPIRIT III Randomized and Controlled Trial of XIENCE V everolimus eluting coronary stent system. *J Interv Cardiol.* 2010;23:26-32
280. Guagliumi G, Ikejima H, Sirbu V, Bezerra H, Musumeci G, Lortkipanidze N, Fiocca L, Tahara S, Vassileva A, Matiashvili A, Valsecchi O, Costa M. Impact of Drug Release Kinetics on Vascular Response to Different

- Zotarolimus-Eluting Stents Implanted in Patients With Long Coronary Stenoses The LongOCT Study (Optical Coherence Tomography in Long Lesions). *JACC Cardiovasc Interv.* 2011;4:778-785
281. Ostojic M, Sagic D, Jung R, Zhang YL, Nedeljkovic M, Mangovski L, Stojkovic S, Debeljacki D, Colic M, Beleslin B, Milosavljevic B, Orlic D, Topic D, Karanovic N, Paunovic D, Christians U. The pharmacokinetics of Biolimus A9 after elution from the Nobori stent in patients with coronary artery disease: the NOBORI PK study. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2008;72:901-908
  282. Balakrishnan B, Tzafriri AR, Seifert P, Groothuis A, Rogers C, Edelman ER. Strut position, blood flow, and drug deposition: implications for single and overlapping drug-eluting stents. *Circulation.* 2005;111:2958-2965
  283. Hwang CW, Levin AD, Jonas M, Li PH, Edelman ER. Thrombosis modulates arterial drug distribution for drug-eluting stents. *Circulation.* 2005;111:1619-1626
  284. Joner M, Byrne RA. The importance of preclinical research in contemporary interventional cardiology. *EuroIntervention.* 2010;6:19-23
  285. Gunn J, Arnold N, Chan KH, Shepherd L, Cumberland DC, Crossman DC. Coronary artery stretch versus deep injury in the development of in-stent neointima. *Heart.* 2002;88:401-405
  286. Kornowski R, Hong MK, Tio FO, Bramwell O, Wu H, Leon MB. In-stent restenosis: contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia. *J Am Coll Cardiol.* 1998;31:224-230
  287. Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP, Fowler DR, Kruth HS, Weber DK, Farb A, Guerrero LJ, Hayase M, Kutys R, Narula J, Finn AV, Virmani R. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *The New England journal of medicine.* 2003;349:2316-2325
  288. Matsumoto D, Shite J, Shinke T, Otake H, Tanino Y, Ogasawara D, Sawada T, Paredes OL, Hirata K, Yokoyama M. Neointimal coverage of sirolimus-eluting stents at 6-month follow-up: evaluated by optical coherence tomography. *Eur Heart J.* 2007;28:961-967
  289. Takano M, Yamamoto M, Xie Y, Murakami D, Inami S, Okamatsu K, Seimiya K, Ohba T, Seino Y, Mizuno K. Serial long-term evaluation of neointimal stent coverage and thrombus after sirolimus-eluting stent implantation by use of coronary angiography. *Heart.* 2007;93:1533-1536
  290. Chen BX, Ma FY, Wei L, Ruan JH, Xie WL, Zhao XZ, Sun SH, Guo XM, Wang F, Tian T, Chu XW. Neointimal Coverage of Bare Metal and Sirolimus-Eluting Stents Evaluated with Optical Coherence Tomography. *Heart.* 2008;94:566-570
  291. Guagliumi G, Sirbu V. Optical coherence tomography: high resolution intravascular imaging to evaluate vascular healing after coronary stenting. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2008;72:237-247
  292. Stefanadis C, Toutouzas K, Stefanadi E, Kolodgie F, Virmani R, Kipshidze N. First experimental application of bevacizumab-eluting PC coated stent for inhibition of vasa vasorum of atherosclerotic plaque: angiographic results in a rabbit atheromatic model. *Hellenic J Cardiol.* 2006;47:7-10
  293. Stefanadis C, Toutouzas K, Stefanadi E, Lazaris A, Patsouris E, Kipshidze N. Inhibition of plaque neovascularization and intimal hyperplasia by specific targeting vascular endothelial growth factor with bevacizumab-eluting stent: an experimental study. *Atherosclerosis.* 2007;195:269-276
  294. Barker SG, Talbert A, Cottam S, Baskerville PA, Martin JF. Arterial intimal hyperplasia after occlusion of the adventitial vasa vasorum in the pig. *Arterioscler Thromb.* 1993;13:70-77
  295. Kwon HM, Sangiorgi G, Ritman EL, Lerman A, McKenna C, Virmani R, Edwards WD, Holmes DR, Schwartz RS. Adventitial vasa vasorum in balloon-injured coronary arteries: visualization and quantitation by a microscopic three-dimensional computed tomography technique. *J Am Coll Cardiol.* 1998;32:2072-2079
  296. Granada JF, Feinstein SB. Imaging of the vasa vasorum. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2008;5 Suppl 2:S18-25

297. Alviar CL, Tellez A, Wallace-Bradley D, Lopez-Berestein G, Sanguino A, Schulz DG, Builes A, Ballantyne CM, Yang CY, Kaluza GL, Granada JF. Impact of adventitial neovascularisation on atherosclerotic plaque composition and vascular remodelling in a porcine model of coronary atherosclerosis. *EuroIntervention*. 2010;5:981-988
298. Schinkel AF, Krueger CG, Tellez A, Granada JF, Reed JD, Hall A, Zang W, Owens C, Kaluza GL, Staub D, Coll B, Ten Cate FJ, Feinstein SB. Contrast-enhanced ultrasound for imaging vasa vasorum: comparison with histopathology in a swine model of atherosclerosis. *Eur J Echocardiogr*. 2010;11:659-664
299. Nakazawa G, Granada JF, Alviar CL, Tellez A, Kaluza GL, Guilhermier MY, Parker S, Rowland SM, Kolodgie FD, Leon MB. Anti-CD34 Antibodies Immobilized on the Surface of Sirolimus-Eluting Stents Enhance Stent Endothelialization. *JACC Cardiovasc Interv*. 2010;3:68-75
300. Uchida Y, Sakurai T, Kanai M, Shirai S, Morita T. Characterization of coronary fibrin thrombus in patients with acute coronary syndrome using dye-staining angiography. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:1452-1460
301. Papadimitriou JM, Finlay-Jones JM, Walters MN. Surface characteristics of macrophages, epithelioid and giant cells using scanning electron microscopy. *Exp Cell Res*. 1973;76:353-362
302. Miyata K, Shimokawa H, Yamawaki T, Kunihiro I, Zhou X, Higo T, Tanaka E, Katsumata N, Egashira K, Takeshita A. Endothelial vasodilator function is preserved at the spastic/inflammatory coronary lesions in pigs. *Circulation*. 1999;100:1432-1437
303. Shimokawa H, Seto M, Katsumata N, Amano M, Kozai T, Yamawaki T, Kuwata K, Kandabashi T, Egashira K, Ikegaki I, Asano T, Kaibuchi K, Takeshita A. Rho-kinase-mediated pathway induces enhanced myosin light chain phosphorylations in a swine model of coronary artery spasm. *Cardiovasc Res*. 1999;43:1029-1039
304. Cowan CL, McKenzie JE. Cholinergic regulation of resting coronary blood flow in domestic swine. *Am J Physiol*. 1990;259:H109-115
305. Hata H, Egashira K, Fukai T, Ohara Y, Kasuya H, Takahashi T, Takeshita A. The role of endothelium-derived nitric oxide in acetylcholine-induced coronary vasoconstriction in closed-chest pigs. *Coron Artery Dis*. 1993;4:891-898
306. Nakamura T, Brott BC, Brants I, Panchal D, Li J, Chen JP, King SB, 3rd, Chronos N, Hou D. Vasomotor function after Paclitaxel-coated balloon post-dilation in porcine coronary stent model. *JACC Cardiovasc Interv*. 2011;4:247-255
307. Gibson CM, Cannon CP, Daley WL, Dodge JT, Jr., Alexander B, Jr., Marble SJ, McCabe CH, Raymond L, Fortin T, Poole WK, Braunwald E. TIMI frame count: a quantitative method of assessing coronary artery flow. *Circulation*. 1996;93:879-888
308. Barcin C, Denktas AE, Garratt KN, Higano ST, Holmes DR, Jr., Lerman A. Relation of Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) frame count to coronary flow parameters. *Am J Cardiol*. 2003;91:466-469
309. Frutkin AD, Mehta SK, McCrary JR, Marso SP. Limitations to the use of virtual histology-intravascular ultrasound to detect vulnerable plaque. *Eur Heart J*. 2007;28:1783-1784
310. Granada JF, Wallace-Bradley D, Win HK, Alviar CL, Builes A, Lev EI, Barrios R, Schulz DG, Raizner AE, Kaluza GL. In vivo plaque characterization using intravascular ultrasound-virtual histology in a porcine model of complex coronary lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:387-393
311. Hong MK, Mintz GS, Lee CW, Suh J, Kim JH, Park DW, Lee SW, Kim YH, Cheong SS, Kim JJ, Park SW, Park SJ. Comparison of virtual histology to intravascular ultrasound of culprit coronary lesions in acute coronary syndrome and target coronary lesions in stable angina pectoris. *Am J Cardiol*. 2007;100:953-959
312. Okubo M, Kawasaki M, Ishihara Y, Takeyama U, Yasuda S, Kubota T, Tanaka S, Yamaki T, Ojio S, Nishigaki K, Takemura G, Saio M, Takami T, Fujiwara H, Minatoguchi S. Tissue characterization of coronary plaques: comparison of integrated backscatter intravascular ultrasound with virtual histology intravascular ultrasound. *Circ J*. 2008;72:1631-1639

313. Slottow T, Pakala R, Okabe T, Hellings D, Lovec R, Tio F, Bui A, Waksman R. Optical coherence tomography and intravascular ultrasound imaging of bioabsorbable magnesium stent degradation in porcine coronary arteries. *Cardiovascular Revascularization Medicine*. 2008;9:248-254
314. Serruys PW, Ormiston JA, Onuma Y, Regar E, Gonzalo N, Garcia-Garcia HM, Nieman K, Bruining N, Dorange C, Miquel-Hebert K, Veldhof S, Webster M, Thuesen L, Dudek D. A bioabsorbable everolimus-eluting coronary stent system (ABSORB): 2-year outcomes and results from multiple imaging methods. *Lancet*. 2009;373:897-910
315. Takano M, Ohba T, Inami S, Seimiya K, Sakai S, Mizuno K. Angioscopic differences in neointimal coverage and in persistence of thrombus between sirolimus-eluting stents and bare metal stents after a 6-month implantation. *Eur Heart J*. 2006;27:2189-2195
316. Awata M, Kotani Ji, Uematsu M, Morozumi T, Watanabe T, Onishi T, Iida O, Sera F, Nanto S, Hori M, Nagata S. Serial Angioscopic Evidence of Incomplete Neointimal Coverage After Sirolimus-Eluting Stent Implantation: Comparison With Bare-Metal Stents. *Circulation*. 2007;116:910-916
317. Awata M, Nanto S, Uematsu M, Morozumi T, Watanabe T, Onishi T, Iida O, Sera F, Kotani J, Hori M, Nagata S. Angioscopic comparison of neointimal coverage between zotarolimus- and sirolimus-eluting stents. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52:789-790
318. Ertas G, van Beusekom HM, van der Giessen WJ. Late stent thrombosis, endothelialisation and drug-eluting stents. *Neth Heart J*. 2009;17:177-180
319. Bezerra HG, Costa MA, Guagliumi G, Rollins AM, Simon DI. Intracoronary Optical Coherence Tomography: A Comprehensive Review. *JACC Cardiovasc Interv*. 2009;2:1035-1046
320. Meissner OA, Rieber J, Babaryka G, Oswald M, Reim S, Siebert U, Redel T, Reiser M, Mueller-Lisse U. Intravascular Optical Coherence Tomography: Comparison with Histopathology in Atherosclerotic Peripheral Artery Specimens. *J Vasc Interv Radiol*. 2006;17:343-349
321. Sheehy A, Murata A, Wallace-Bradley D, Coleman L, Kaluza GL, Perkins L, Kolodgie F, Nakazawa G, Virmani R, Granada JF. Biological Evaluation of Vascular Response to Drug Eluting Stents Using Optical Coherence Tomography in a Porcine Coronary Artery Model (Abst). *Am J Cardiol*. 2008;102:27i
322. Murata A, Wallace-Bradley D, Tellez A, Alviar C, Aboodi M, Sheehy A, Coleman L, Perkins L, Nakazawa G, Mintz G, Kaluza GL, Virmani R, Granada JF. Accuracy of optical coherence tomography in the evaluation of neointimal coverage after stent implantation. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2010;3:76-84
323. Tanigawa J, Barlis P, Di Mario C. Do unapposed stent struts endothelialise? In vivo demonstration with optical coherence tomography. *Heart*. 2007;93:378
324. Onuma Y, Serruys PW, Perkins LE, Okamura T, Gonzalo N, Garcia-Garcia HM, Regar E, Kamberi M, Powers JC, Rapoza R, van Beusekom H, van der Giessen W, Virmani R. Intracoronary optical coherence tomography and histology at 1 month and 2, 3, and 4 years after implantation of everolimus-eluting bioresorbable vascular scaffolds in a porcine coronary artery model: an attempt to decipher the human optical coherence tomography images in the ABSORB trial. *Circulation*. 2010;122:2288-2300
325. Nakano M, Vorpahl M, Otsuka F, Taniwaki M, Yazdani SK, Finn AV, Ladich ER, Kolodgie FD, Virmani R. Ex vivo assessment of vascular response to coronary stents by optical frequency domain imaging. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2012;5:71-82
326. Templin C, Meyer M, Muller MF, Djonov V, Hlushchuk R, Dimova I, Flueckiger S, Kronen P, Sidler M, Klein K, Nicholls F, Ghadri JR, Weber K, Paunovic D, Corti R, Hoerstrup SP, Luscher TF, Landmesser U. Coronary optical frequency domain imaging (OFDI) for in vivo evaluation of stent healing: comparison with light and electron microscopy. *Eur Heart J*. 2010;31:1792-1801
327. van Beusekom H, van Duin R, Krabbendam-Peters I, van Haeren R, van der Giessen W. Single and repeated endovascular imaging cause significant but equal acute endothelial injury of a temporary nature as opposed to stent induced injury (Abst). *EuroIntervention*. 2011;7:M25



328. Wanibuchi H, Dingemans KP, Becker AE, Ueda M, Naruko T, Tanizawa S, Nakamura K. Is the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit a suitable experimental model for percutaneous transluminal coronary angioplasty in humans? A light microscopic, immunohistochemical and ultrastructural study. *J Am Coll Cardiol.* 1993;21:1490-1496
329. Rapacz J, Hasler-Rapacz J, Taylor KM, Checovich WJ, Attie AD. Lipoprotein mutations in pigs are associated with elevated plasma cholesterol and atherosclerosis. *Science.* 1986;234:1573-1577
330. Prescott MF, McBride CH, Hasler-Rapacz J, Von Linden J, Rapacz J. Development of complex atherosclerotic lesions in pigs with inherited hyper-LDL cholesterolemia bearing mutant alleles for apolipoprotein B. *Am J Pathol.* 1991;139:139-147
331. Fingerle J, Au YP, Clowes AW, Reidy MA. Intimal lesion formation in rat carotid arteries after endothelial denudation in absence of medial injury. *Arteriosclerosis.* 1990;10:1082-1087
332. Feldman LJ, Mazighi M, Scheuble A, Deux JF, De Benedetti E, Badier-Commander C, Brambilla E, Henin D, Steg PG, Jacob MP. Differential expression of matrix metalloproteinases after stent implantation and balloon angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit. *Circulation.* 2001;103:3117-3122
333. Wilczek K, Walichiewicz P, Petelenz B, Jache W, Jochem J, Tomasik A, Bilski P, Snietura M, Wodniecki J. Post-stenting intravascular brachytherapy trials on hypercholesterolemic rabbits using 32P liquid sources: implications for prevention of in-stent restenosis. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2002;25:307-313
334. Walichiewicz P, Petelenz B, Wilczek K, Jachec W, Jochem J, Tomasik A, Lange D, Wodniecki J. 32P liquid sources--comparison of the effectiveness of postangioplasty versus poststenting intravascular brachytherapy in hypercholesterolemic rabbits. Adjunctly implanted titanium stent does not attenuate the effect of endovascular irradiation. *Cardiovasc Radiat Med.* 2003;4:64-68
335. Ohtani K, Egashira K, Nakano K, Zhao G, Funakoshi K, Ihara Y, Kimura S, Tominaga R, Morishita R, Sunagawa K. Stent-based local delivery of nuclear factor-kappaB decoy attenuates in-stent restenosis in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation.* 2006;114:2773-2779
336. Narita H, Chen S, Komori K, Kadomatsu K. Midkine is expressed by infiltrating macrophages in in-stent restenosis in hypercholesterolemic rabbits. *J Vasc Surg.* 2008;47:1322-1329
337. Lafont A, Guzman LA, Whitlow PL, Goormastic M, Cornhill JF, Chisolm GM. Restenosis after experimental angioplasty. Intimal, medial, and adventitial changes associated with constrictive remodeling. *Circ Res.* 1995;76:996-1002
338. Cejna M, Breuss JM, Bergmeister H, de Martin R, Xu Z, Grgurin M, Losert U, Plenk H, Jr., Binder BR, Lammer J. Inhibition of neointimal formation after stent placement with adenovirus-mediated gene transfer of I kappa B alpha in the hypercholesterolemic rabbit model: initial results. *Radiology.* 2002;223:702-708
339. Danenberg HD, Golomb G, Groothuis A, Gao J, Epstein H, Swaminathan RV, Seifert P, Edelman ER. Liposomal alendronate inhibits systemic innate immunity and reduces in-stent neointimal hyperplasia in rabbits. *Circulation.* 2003;108:2798-2804
340. Tanous D, Brasen JH, Choy K, Wu BJ, Kathir K, Lau A, Celermajer DS, Stocker R. Probucol inhibits in-stent thrombosis and neointimal hyperplasia by promoting re-endothelialization. *Atherosclerosis.* 2006;189:342-349
341. Joner M, Farb A, Cheng Q, Finn AV, Acampado E, Burke AP, Skorija K, Creighton W, Kolodgie FD, Gold HK, Virmani R. Pioglitazone inhibits in-stent restenosis in atherosclerotic rabbits by targeting transforming growth factor-beta and MCP-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:182-189
342. Basselet C, Durand E, Addad F, Vitry F, Chatellier G, Demerens C, Lemitre M, Garnotel R, Urbain D, Bruneval P, Lafont A. Effect of local heating on restenosis and in-stent neointimal hyperplasia in the atherosclerotic rabbit model: a dose-ranging study. *Eur Heart J.* 2008;29:402-412

343. Theilmeier G, Quarck R, Verhamme P, Bochaton-Piallat ML, Lox M, Bernar H, Janssens S, Kockx M, Gabbiani G, Collen D, Holvoet P. Hypercholesterolemia impairs vascular remodelling after porcine coronary angioplasty. *Cardiovasc Res.* 2002;55:385-395
344. Stone GW, Rizvi A, Newman W, Mastali K, Wang JC, Caputo R, Doostzadeh J, Cao S, Simonton CA, Sudhir K, Lansky AJ, Cutlip DE, Kereiakes DJ. Everolimus-eluting versus paclitaxel-eluting stents in coronary artery disease. *The New England journal of medicine.* 2010;362:1663-1674
345. Duff GL, Mc MG. The effect of alloxan diabetes on experimental cholesterol atherosclerosis in the rabbit. *J Exp Med.* 1949;89:611-630
346. Brosky G, Logothetopoulos J. Streptozotocin diabetes in the mouse and guinea pig. *Diabetes.* 1969;18:606-611
347. Marshall M. Induction of chronic diabetes by streptozotocin in the miniature pig. *Res Exp Med (Berl).* 1979;175:187-196
348. Grussner R, Nakhleh R, Grussner A, Tomadze G, Diem P, Sutherland D. Streptozotocin-induced diabetes mellitus in pigs. *Horm Metab Res.* 1993;25:199-203
349. Carter AJ, Bailey L, Devries J, Hubbard B. The effects of uncontrolled hyperglycemia on thrombosis and formation of neointima after coronary stent placement in a novel diabetic porcine model of restenosis. *Coron Artery Dis.* 2000;11:473-479
350. Llano R, Winsor-Hines D, Patel DB, Seifert PS, Hamamdzcic D, Wilson GJ, Wang H, Keane MG, Huibregtse BA, Wilensky RL. Vascular responses to drug-eluting and bare metal stents in diabetic/hypercholesterolemic and nonatherosclerotic porcine coronary arteries. *Circ Cardiovasc Interv.* 2011;4:438-446
351. Huang Y, Venkatraman SS, Boey FY, Lahti EM, Umashankar PR, Mohanty M, Arumugam S, Khanolkar L, Vaishnav S. In vitro and in vivo performance of a dual drug-eluting stent (DDES). *Biomaterials.* 2010;31:4382-4391
352. Huang Y, Venkatraman SS, Boey FY, Umashankar PR, Mohanty M, Arumugam S. The short-term effect on restenosis and thrombosis of a cobalt-chromium stent eluting two drugs in a porcine coronary artery model. *J Interv Cardiol.* 2009;22:466-478
353. Lee CW, Park DW, Seung KB, Kim PJ, Park HJ, Kim WJ, Lee JY, Kang SJ, Lee SH, Kim YH, Park SW, Park SJ. Comparison of dual drug-eluting Cilotax stent and paclitaxel-eluting Taxus Liberte stent in native coronary artery lesions. *Am J Cardiol.* 2011;107:990-994
354. Byrne RA, Mehilli J, Iijima R, Schulz S, Pache J, Seyfarth M, Schomig A, Kastrati A. A polymer-free dual drug-eluting stent in patients with coronary artery disease: a randomized trial vs. polymer-based drug-eluting stents. *Eur Heart J.* 2009;30:923-931
355. Di Mario C, Griffiths H, Goktekin O, Peeters N, Verbist J, Bosiers M, Deloose K, Heublein B, Rohde R, Kasese V, Ilesley C, Erbel R. Drug-eluting bioabsorbable magnesium stent. *J Interv Cardiol.* 2004;17:391-395
356. Waksman R, Pakala R, Kuchulakanti PK, Baffour R, Hellinga D, Seabron R, Tio FO, Wittchow E, Hartwig S, Harder C, Rohde R, Heublein B, Andreae A, Waldmann KH, Haverich A. Safety and efficacy of bioabsorbable magnesium alloy stents in porcine coronary arteries. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2006;68:607-617; discussion 618-609
357. Pinto Slottow TL, Pakala R, Lovec RJ, Tio FO, Waksman R. Optical coherence tomographic imaging of a bioabsorbable magnesium stent lost in a porcine coronary artery. *Cardiovasc Revasc Med.* 2007;8:293-294
358. Pinto Slottow TL, Pakala R, Waksman R. Serial imaging and histology illustrating the degradation of a bioabsorbable magnesium stent in a porcine coronary artery. *Eur Heart J.* 2008;29:314
359. Waksman R. Current state of the absorbable metallic (magnesium) stent. *EuroIntervention.* 2009;5 Suppl F:F94-97

360. Haude M, Erbel R, Erne P, Verheye S, Degen H, Böse D, Vermeersch P, Wijnbergen I, Weissman N, Prati F, Waksman R, Koolen J. Safety and performance of the drug-eluting absorbable metal scaffold (DREAMS) in patients with de-novo coronary lesions: 12 month results of the prospective, multicentre, first-in-man BIOSOLVE-I trial. *Lancet*. 2013;381:836-844
361. Ramcharitar S, Serruys PW. Fully biodegradable coronary stents: progress to date. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2008;8:305-314
362. Onuma Y, Piazza N, Ormiston JA, Serruys PW. Everolimus-eluting bioabsorbable stent--Abbot Vascular programme. *EuroIntervention*. 2009;5 Suppl F:F98-F102
363. Ormiston JA, Serruys PW, Regar E, Dudek D, Thuesen L, Webster MW, Onuma Y, Garcia-Garcia HM, McGreevy R, Veldhof S. A bioabsorbable everolimus-eluting coronary stent system for patients with single de-novo coronary artery lesions (ABSORB): a prospective open-label trial. *Lancet*. 2008;371:899-907
364. Oberhoff M, Herdeg C, Al Ghobainy R, Cetin S, Kuttner A, Horch B, Baumbach A, Karsch KR. Local delivery of paclitaxel using the double-balloon perfusion catheter before stenting in the porcine coronary artery. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2001;53:562-568
365. Oberhoff M, Kunert W, Herdeg C, Kuttner A, Kranzhofer A, Horch B, Baumbach A, Karsch KR. Inhibition of smooth muscle cell proliferation after local drug delivery of the antimetabolic drug paclitaxel using a porous balloon catheter. *Basic research in cardiology*. 2001;96:275-282
366. Scheller B, Speck U, Abramjuk C, Bernhardt U, Bohm M, Nickenig G. Paclitaxel balloon coating, a novel method for prevention and therapy of restenosis. *Circulation*. 2004;110:810-814
367. Speck U, Scheller B, Abramjuk C, Breitwieser C, Dobberstein J, Boehm M, Hamm B. Neointima inhibition: comparison of effectiveness of non-stent-based local drug delivery and a drug-eluting stent in porcine coronary arteries. *Radiology*. 2006;240:411-418
368. Dommke C, Haase KK, Suselbeck T, Streitner I, Haghi D, Metz J, Borggrefe M, Herdeg C. Local paclitaxel delivery after coronary stenting in an experimental animal model. *Thromb Haemost*. 2007;98:674-680
369. Scheller B, Hehrlein C, Bocksch W, Rutsch W, Haghi D, Dietz U, Bohm M, Speck U. Treatment of coronary in-stent restenosis with a paclitaxel-coated balloon catheter. *The New England journal of medicine*. 2006;355:2113-2124
370. Joner M, Byrne RA, Lapointe JM, Radke PW, Bayer G, Steigerwald K, Wittchow E. Comparative assessment of drug-eluting balloons in an advanced porcine model of coronary restenosis. *Thromb Haemost*. 2011;105:864-872
371. Gray WA, Granada JF. Drug-coated balloons for the prevention of vascular restenosis. *Circulation*. 2010;121:2672-2680
372. Steigerwald K, Ballke S, Quee SC, Byrne RA, Vorpahl M, Vogeser M, Kolodgie F, Virmani R, Joner M. Vascular healing in drug-eluting stents: differential drug-associated response of limus-eluting stents in a preclinical model of stent implantation. *EuroIntervention*. 2012;8:752-759
373. Ghimire G, Spiro J, Kharbanda R, Roughton M, Barlis P, Mason M, Ilsley C, Di Mario C, Erbel R, Waksman R, Dalby M. Initial evidence for the return of coronary vasoreactivity following the absorption of bioabsorbable magnesium alloy coronary stents. *EuroIntervention*. 2009;4:481-484
374. Brugaletta S, Heo JH, Garcia-Garcia HM, Farooq V, van Geuns RJ, de Bruyne B, Dudek D, Smits PC, Koolen J, McClean D, Dorange C, Veldhof S, Rapoza R, Onuma Y, Bruining N, Ormiston JA, Serruys PW. Endothelial-dependent vasomotion in a coronary segment treated by ABSORB everolimus-eluting bioresorbable vascular scaffold system is related to plaque composition at the time of bioresorption of the polymer: indirect finding of vascular reparative therapy? *Eur Heart J*. 2012;33:1325-1333
375. Chatzizisis YS, Jonas M, Coskun AU, Beigel R, Stone BV, Maynard C, Gerrity RG, Daley W, Rogers C, Edelman ER, Feldman CL, Stone PH. Prediction of the localization of high-risk coronary atherosclerotic plaques on

- the basis of low endothelial shear stress: an intravascular ultrasound and histopathology natural history study. *Circulation*. 2008;117:993-1002
376. Al-Mashhadi RH, Sorensen CB, Kragh PM, Christoffersen C, Mortensen MB, Tolbod LP, Thim T, Du Y, Li J, Liu Y, Moldt B, Schmidt M, Vajta G, Larsen T, Purup S, Bolund L, Nielsen LB, Callesen H, Falk E, Mikkelsen JG, Bentzon JF. Familial hypercholesterolemia and atherosclerosis in cloned minipigs created by DNA transposition of a human PCSK9 gain-of-function mutant. *Science translational medicine*. 2013;5:166ra161
377. Yazdani SK, Otsuka F, Nakano M, Finn AV, Virmani R. Do animal models of vein graft atherosclerosis predict outcomes in man? *Atherosclerosis*. 2012;223:102-105
378. Perez de Prado A, Perez C, Cuellas C, Gonzalo Orden JM, Diego A, Regueiro M, Martinez B, De Miguel A, Ajenjo J, Altonaga JR, Iglesias MJ, Fernandez-Vazquez F. Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) activity and vasomotor dysfunction of coronary arteries after DES: link or chance? (Abst). *EuroIntervention*. 2011;5:M25
379. Kanazawa K, Suematsu M, Ishida T, Hirata K, Kawashima S, Akita H, Yokoyama M. Disparity between serotonin- and acetylcholine-provoked coronary artery spasm. *Clin Cardiol*. 1997;20:146-152
380. Ong P, Athanasiadis A, Hill S, Vogelsberg H, Voehringer M, Sechtem U. Coronary Artery Spasm as a Frequent Cause of Acute Coronary Syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52:523-527
381. Kandabashi T, Shimokawa H, Miyata K, Kunihiro I, Kawano Y, Fukata Y, Higo T, Egashira K, Takahashi S, Kaibuchi K, Takeshita A. Inhibition of myosin phosphatase by upregulated rho-kinase plays a key role for coronary artery spasm in a porcine model with interleukin-1beta. *Circulation*. 2000;101:1319-1323
382. Mongiardo R, Finocchiaro ML, Beltrame J, Pristipino C, Lombardo A, Cianflone D, Mazzari MA, Maseri A. Low incidence of serotonin-induced occlusive coronary artery spasm in patients with recent myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 1996;78:84-87
383. Dawes M, Chowienczyk PJ, Ritter JM. Effects of inhibition of the L-arginine/nitric oxide pathway on vasodilation caused by beta-adrenergic agonists in human forearm. *Circulation*. 1997;95:2293-2297
384. Garovic VD, Joyner MJ, Dietz NM, Boerwinkle E, Turner ST. 2-Adrenergic receptor polymorphism and nitric oxide-dependent forearm blood flow responses to isoproterenol in humans. *The Journal of Physiology*. 2002;546:583-589
385. Yang LX, Zhu J, Wang HJ, Holton RA. Enhanced apoptotic effects of novel paclitaxel analogs on NCI/ADR-RES breast cancer cells. *Anticancer research*. 2003;23:3295-3301
386. Zou Y, Dietrich H, Hu Y, Metzler B, Wick G, Xu Q. Mouse model of venous bypass graft arteriosclerosis. *Am J Pathol*. 1998;153:1301-1310
387. Eshtehardi P, Cook S, Wandel S, Raber L, Wenaweser P, Togni M, Vogel R, Garachemani A, Eberli FR, Luscher TF, Juni P, Hess OM, Meier B, Windecker S. Impact of arterial injury on neointimal hyperplasia after implantation of drug-eluting stents in coronary arteries: an intravascular ultrasound study. *EuroIntervention*. 2010;6:467-474
388. Bateurs C, Lablanche JM, Van Belle E, Niculescu R, Meurice T, Mc Fadden EP, Bertrand ME. Effects of coronary stenting on restenosis and occlusion after angioplasty of the culprit vessel in patients with recent myocardial infarction. *Circulation*. 1997;96:2854-2858
389. Hu Y, Zhang Z, Torsney E, Afzal AR, Davison F, Metzler B, Xu Q. Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice. *J Clin Invest*. 2004;113:1258-1265
390. Li G, Chen SJ, Oparil S, Chen YF, Thompson JA. Direct in vivo evidence demonstrating neointimal migration of adventitial fibroblasts after balloon injury of rat carotid arteries. *Circulation*. 2000;101:1362-1365
391. Scott NA, Cipolla GD, Ross CE, Dunn B, Martin FH, Simonet L, Wilcox JN. Identification of a potential role for the adventitia in vascular lesion formation after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries. *Circulation*. 1996;93:2178-2187

392. Shi Y, O'Brien JE, Fard A, Mannion JD, Wang D, Zalewski A. Adventitial myofibroblasts contribute to neointimal formation in injured porcine coronary arteries. *Circulation*. 1996;94:1655-1664
393. Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhisa T, Hirai H, Makuuchi M, Hirata Y, Nagai R. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med*. 2002;8:403-409
394. Bailey S, Seifert P, Huibregtse B, Poff B. Early healing following TAXUS stent implantation: endothelial cell coverage is similar in overlapped TAXUS Express stents and bare metal stents in swine coronary arteries. *Cardiovascular Revascularization Medicine*. 2006;7:90-92
395. Tanabe K, Serruys PW, Degertekin M, Regar E, van Domburg RT, Sousa JE, Wulfert E, Morice MC. Fate of side branches after coronary arterial sirolimus-eluting stent implantation. *Am J Cardiol*. 2002;90:937-941
396. Stone GW, Ellis SG, Cannon L, Mann JT, Greenberg JD, Spriggs D, O'Shaughnessy CD, DeMaio S, Hall P, Popma JJ, Koglin J, Russell ME. Comparison of a polymer-based paclitaxel-eluting stent with a bare metal stent in patients with complex coronary artery disease: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2005;294:1215-1223
397. Bartorelli AL, Trabattoni D, Montorsi P, Fabbicocchi F, Galli S, Ravagnani P, Grancini L, Cozzi S, Loaldi A. Aspirin alone antiplatelet regimen after intracoronary placement of the Carbostent: the ANTARES study. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2002;55:150-156
398. Gonzalo N, Barlis P, Serruys PW, Garcia-Garcia HM, Onuma Y, Ligthart J, Regar E. Incomplete Stent Apposition and Delayed Tissue Coverage Are More Frequent in Drug-Eluting Stents Implanted During Primary Percutaneous Coronary Intervention for ST-Segment Elevation Myocardial Infarction Than in Drug-Eluting Stents Implanted for Stable/Unstable Angina. Insights From Optical Coherence Tomography. *JACC Cardiovasc Interv*. 2009;2:445-452
399. Siqueira DA, Abizaid AA, Costa Jde R, Feres F, Mattos LA, Staico R, Tanajura LF, Chaves A, Centemero M, Sousa AG, Sousa JE. Late incomplete apposition after drug-eluting stent implantation: incidence and potential for adverse clinical outcomes. *Eur Heart J*. 2007;28:1304-1309
400. Cook S, Wenaweser P, Togni M, Billinger M, Morger C, Seiler C, Vogel R, Hess O, Meier B, Windecker S. Incomplete Stent Apposition and Very Late Stent Thrombosis After Drug-Eluting Stent Implantation. *Circulation*. 2007;115:2426-2434
401. Hoffmann R, Morice MC, Moses JW, Fitzgerald PJ, Mauri L, Breithardt G, Schofer J, Serruys PW, Stoll HP, Leon MB. Impact of late incomplete stent apposition after sirolimus-eluting stent implantation on 4-year clinical events: intravascular ultrasound analysis from the multicentre, randomised, RAVEL, E-SIRIUS and SIRIUS trials. *Heart*. 2008;94:322-328
402. Hong MK, Mintz GS, Lee CW, Park DW, Lee SW, Kim YH, Kang DH, Cheong SS, Song JK, Kim JJ, Park SW, Park SJ. Impact of late drug-eluting stent malapposition on 3-year clinical events. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50:1515-1516
403. Mintz GS. What to Do About Late Incomplete Stent Apposition? *Circulation*. 2007;115:2379-2381
404. Morton AC, Siotia A, Arnold ND, Korgul P, Bowles J, Heppenstall J, Gunn J. Simultaneous kissing stent technique to treat left main stem bifurcation disease. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2007;69:209-215
405. Gutierrez-Chico JL, Regar E, Nuesch E, Okamura T, Wykrzykowska J, di Mario C, Windecker S, van Es GA, Gobbens P, Juni P, Serruys PW. Delayed coverage in malapposed and side-branch struts with respect to well-apposed struts in drug-eluting stents: in vivo assessment with optical coherence tomography. *Circulation*. 2011;124:612-623
406. Joner M, Radke PW, Byrne RA, Hartwig S, Steigerwald K, Leclerc G, Wittchow E. Preclinical evaluation of a novel drug-eluting balloon in an animal model of in-stent stenosis. *J Biomater Appl*. 2013;27:717-726
407. Diego A, Perez de Prado A, Cuellas C, Perez-Martinez C, Gonzalo-Orden M, Altonaga JR, de Miguel A, Regueiro M, Ajenjo J, Sanchez-Lasheras F, Alvarez-Arenal A, Fernandez-Vazquez F. [In-stent restenosis

- related to vessel injury score degree. Are current experimental models valid for drug-eluting stents analysis?]. *Rev Esp Cardiol*. 2011;64:745-751
408. Perez de Prado A, Perez-Martinez C, Cuellas C, Gonzalo-Orden JM, Diego A, Regueiro M, Martinez-Fern B, Altonaga JR, Marin JF, Fernandez-Vazquez F. Preclinical Evaluation of Coronary Stents: Focus on Safety Issues. *Curr Vasc Pharmacol*. 2013;11:74-99
409. Speck U, Cremers B, Kelsch B, Biedermann M, Clever YP, Schaffner S, Mahnkopf D, Hanisch U, Bohm M, Scheller B. Do pharmacokinetics explain persistent restenosis inhibition by a single dose of paclitaxel? *Circ Cardiovasc Interv*. 2012;5:392-400
410. Loh JP, Waksman R. Paclitaxel drug-coated balloons: a review of current status and emerging applications in native coronary artery de novo lesions. *JACC Cardiovasc Interv*. 2012;5:1001-1012

# ***ANEXO 1***

**Publicaciones en formato original**





## Preclinical Evaluation of Coronary Stents: Focus on Safety Issues

Armando Pérez de Prado\*, Claudia Pérez-Martínez, Carlos Cuellas, Jose M. Gonzalo-Orden, Alejandro Diego, Marta Regueiro, Beatriz Martínez-Fernández, Jose R. Altónaga, J. Francisco G. Marín and Felipe Fernández-Vázquez

*Fundación Investigación Sanitaria en León, Grupo Cardiovascular and Instituto de Biomedicina (IBIOMED), León, Spain*

**Abstract:** In recent years, we have witnessed a revolution in the treatment of coronary artery disease. The development and improvement of drug eluting stents (DES) have lowered the incidence of restenosis to one-digit figures. In the search for a superior efficacy, animal models have played a key role. The classical swine model of coronary stenting remains the preferred model to measure restenosis, although the rabbit iliac artery stenting has become an accepted alternative. After widespread clinical use of DES, an unforeseen complication arose: late stent thrombosis. In a back-to-bench step, some data from animal models helped to explain the phenomenon. A delayed and incomplete vascular healing was detected. Toxic and hypersensitivity reactions to polymers and/or drugs seem to be the underlying causes. So, translational research focused on the safety aspect of these devices: development of better drug carriers as absorbable polymers or fully bioresorbable scaffolds, selection of different drugs and assessment of the re-endothelialization process. We review and evaluate the efficacy and safety of coronary stents in different animal models. Further improvements in this field such as, the selection of better animal models (e.g. hyperlipidemic, diabetic, atherosclerotic) that closely mimic the clinical setting and longer follow-up periods to detect late complications are also discussed.

**Keywords:** Animal model, drug eluting stent, endothelium, inflammation, percutaneous coronary intervention, safety, stent thrombosis vascular healing.

### INTRODUCTION

Cardiovascular disease (CVD) is the leading cause of death in Europe (accounting for 48% of all deaths) and the main cause of disease burden (23% of all illness and death) [1, 2]. The cost of CVD to the European Union economy has been estimated in €192 billion a year [1]. The main forms of CVD are stroke and coronary artery disease (CAD), with CAD as the first individual cause of mortality in Europe [1]. Then, it is not surprising that coronary revascularization, comprising coronary artery bypass graft surgery and percutaneous coronary intervention (PCI), have become frequent major medical procedures performed in the western countries [1, 3, 4]. PCI turned into the most used revascularization method as technical advances make more cases suitable for a non-surgical treatment [4].

PCI has evolved greatly since the first description in 1964: Dotter and Judkins described a technique to treat the arteriosclerotic obstructions with a transluminal approach [5]. In the 70's, Gruntzig detailed the technique of balloon angioplasty, as we know it today [6]. In the 80's, Sigwart *et al.* [7] presented the first short-term results of coronary stenting. Designed to overcome the major drawbacks of balloon angioplasty (elastic recoil leading to restenosis and a high risk of abrupt closure of the artery), coronary stents quickly became the most used device, replacing plain balloon angioplasty. In the 90's, 2 large randomized studies confirmed

the clinical superiority of coronary stents over balloon angioplasty [8, 9]. However, the rates of restenosis (mainly caused by excessive neointimal proliferation in the case of stents) were still quite high; between 22% [8] and 31% [9] of the stented segments showed a follow-up stenosis  $\geq 50\%$  (termed as angiographic binary restenosis). With the new century, the definitive prophylaxis for the in-stent restenosis appeared: drug eluting stents (DES). As compared with previous, bare metal stents (BMS), DES showed the ability to virtually abolish restenosis. The cornerstone RAVEL study found a 0% binary restenosis rate in the DES arm at 6-month follow-up. The rates of PCI and DES use showed a steep growth until September 2006. In the World Congress of Cardiology held in Barcelona, Spain, different research groups revealed a serious concern linking DES use with a higher risk of mortality. Subsequent publications [10-13] suggested that the cause for this impaired prognosis was high rate of late stent thrombosis (LST).

In the early years of stent development, subacute stent thrombosis (1 day to 1 month) was a common complication, with a rate of up to 20% with self-expandable stents [14]. The change from intense anticoagulation regimes to dual antiplatelet treatment (DAPT) using acetylsalicylic acid plus a thienopyridine lowered the incidence of this complication well below 5% [15, 16]. In any case, the incidence of stent thrombosis beyond the first month was quite uncommon. The single center [11], multicenter studies [13] and meta-analyses [10, 12] that blew the whistle on the adverse outcome of DES highlighted the delayed presentation of the thrombosis. A consensus of investigators coined the term of late – and very late – stent thrombosis to refer to those cases

\*Address correspondence to this author at the S. Cardiología Intervencionista - Hospital de León, Altos de Nava SN – 24008 León Spain; Tel./Fax: +34 987237683; E-mail: [aperez@secardiologia.es](mailto:aperez@secardiologia.es)

presenting beyond the first month – and first year – after the stent implantation [17]. The debate caused the publication of a “monographic” issue of the New England Journal of Medicine, with 4 new meta-analyses not supporting the hypothesis of a worse prognosis of DES-treated patients [18-21]. The controversy elicited a “back to bench” movement, the main characteristic of the translational research. More data about the biology and pathology of DES were needed.

Preclinical research in animal models has been a mandatory stage in the assessment of the efficacy of any new coronary stent, as both American (FDA) [22] and European (EMA) [23] regulatory agencies state. The preferred model has been the normal coronary arteries in swine since the first description of arterial over-stretch model with balloon inflation by Schwartz *et al.* [24]. Tantalum wire coils cause a deep injury to the artery [25], as does stent implantation. The elicited vascular response appears proportional to the caused injury. Stent implantation in the rabbit iliac arteries is another widely used animal model [26, 27]. A thorough appraisal of the animal models of stent restenosis or the current and future state-of-the-art of DES is beyond the scope of this review, but can be found elsewhere [28-31]. The principles of this type of research are also well established as recognized in consensus documents [32, 33]. An important warning has been added to the last version of this document: these models, previously used as bench tests for the efficacy of new devices, should specifically focus on the safety aspects to avoid new episodes like the LST controversy. This is the aim of our publication: to review the published evidence on preclinical safety analysis of coronary stents, in particular DES.

#### **PATHOBIOLOGY OF VASCULAR HEALING AFTER CORONARY STENT IMPLANTATION: COMPARISON OF HUMAN AND ANIMAL FEATURES AND CHRONOLOGY**

##### **Animal Models for the Analysis of Vascular Healing After Stent Implantation**

Several animal models have been used to assess the effects of endovascular devices on arterial injury, restenosis and vascular healing in rodents, rabbits, dogs, sheep, swine and non-human primates. As this review is focused on the vascular responses to stent implantation, only those animal models that allow stent implantation will be discussed.

Murine models, mice and rats, are among the preferred models in basic investigation because of clear advantages: low cost, easy handling, high reproducibility and many available markers for the characterization of molecular and cellular responses. Different groups have described rat models of stent implantation in the carotid artery [34, 35] using specially designed, tiny 1.5 mm, stents or with standard stents placed in the abdominal aorta [36, 37]. In all cases the stents were pre-mounted on PCI balloons, introduced locally and placed in healthy, unmodified arteries. Both models showed time courses of vascular healing equivalent to those of larger animal models. Nevertheless, there are 2 major drawbacks. First, the pathology features of the vascular response in rats are somewhat different to humans, with small thrombus and fibrin component, a different distribution of the cell-to-matrix components in the neointima and less in-

flammation than in humans. Second, some investigations that proved a high efficacy of anti-restenotic combinations in the rat model subsequently failed in human clinical trials [38, 39]; some authors [40, 41] explain these differences based on the different mechanisms involved in the vascular response to injury in these small mammals as compared with larger species. The compulsory choice of arterial fields outside the heart in these small animals implies 2 potential issues: these elastic arteries are less prone to injury with a lower neointimal proliferation than the coronary (muscular) arteries [39, 42] and the flow dynamics are quite different from the coronary arteries [29, 40, 41]. If these features are relevant to the obtained results is still controversial, but the murine model is not recommended by consensus documents [32, 33] in the preclinical evaluation of new DES.

Rabbits parallel with rodents in the small size, relative low cost and simple handling and housing. The preferred vascular sites to place the stents are the carotid and ilio-femoral arteries, in which commercially available devices can be tested, as they are comparable in size to human coronary arteries. Different authors have described the rates and time course of vascular healing in the rabbit iliac artery as comparable with the swine coronary model [26, 43, 44]. Besides, the flow dynamics of these arteries are not significantly different from the swine coronary arteries [45]. The rabbit iliac artery model is an animal model recommended by consensus [32, 33]. Despite that, this model shares some of the limitations with the murine model: the elastic nature of the iliac arteries could limit vascular injury [46] and potential end-organ damage in the heart (toxicity, embolization, ...) is missed. A distinctive feature of this model is a delayed re-endothelialization of the stent as compared with the swine coronary model [43, 44, 47-49], while no difference is usually observed in the time course of the rest of the vascular response. A key difference in the methodology could explain this fact: while swine models are usually single-injury models (simple implantation of the stent in healthy, naïve, arteries), most of the rabbit models have been carried out as double-injury models [39, 43, 50-52]. Even when using normolipemic New Zealand white rabbits, denudation of the endothelium is induced with a Fogarty or PCI balloon prior to the stent implantation [27, 43, 48, 53-57]. If this procedure is carried out some weeks before the stent implantation, predictable early-stage atherosclerotic lesions can be observed [29, 39]. The development of complex, atherosclerotic animal models will be discussed later in this review.

The swine coronary artery model is, by far, the most used model in the evaluation of coronary stents. The major advantages of this animal model are related to the close similarities of the anatomy and physiology of the pig and human hearts [58]. The coronary arteries distribution, size, and potential collateral supply are virtually the same. Platelet physiology [59, 60] and many aspects of the coagulation system [58, 61] also parallel the human counterparts. This animal model also offers a wide availability of coronary sites to implant single or overlapping stents in a human-like scenario and procedure. However, it has some shortcomings: although the production of animals is not expensive, the costs of handling and housing are considerably higher. The domestic crossbred swine normally used in this coronary model weighs between 25 and 60 kg at the time of stent implantation; 28 days after

the procedure the weight is usually the double and it can reach up to 400 kg in follow-up periods over 1 year. This is the main reason for choosing miniature pigs with a reduced growth potential, as Yucatan miniswine [42], despite its higher cost and low production rate. Some authors have deemed swine as a hyperproliferative model, highlighting a deep inflammatory reaction and the ordinary presence of granuloma [62-68], relatively uncommon in humans [66, 69-71]. Another distinctive attribute of the histopathologic analysis in swine is the frequent presence of eosinophilic infiltrates [45, 68], suggesting hypersensitivity reactions that have also been reported in human autopsies [72, 73]. This reaction is a rare finding in other animal models, though also reported in rabbits [74].

Other large mammal models such as dogs, sheep or non-human primates have been used. As they offer no advantages over the described models and suffer from different major limitations, no further details will be provided herein. The foremost exception to this statement is the sheep coronary model, as it is quite similar to the swine coronary model in terms of vascular responses and to the human physiology in terms of coagulation and fibrinolytic activity [75]. Moreover, the sheep coronary model offers a broad availability of large vessel bifurcations to test dedicated devices. Previous reviews discuss the characteristics of other animal models [28, 29, 42, 45, 76].

#### Time Course of Vascular Healing after Stent Implantation in Humans and Animals

Vascular healing in response to vascular injury involves similar processes and stages both in animals and humans, although the time course of the events is different. Based on the periods of restenosis development after BMS implantation [43, 44, 69, 77-80], a time ratio of 1 to 6 (animal to human) is usually considered. There are different factors that can explain this accelerated calendar. First, the common life expectancy of a human being is over 70 years, while pigs have a life span of 10-15 years and rabbits about 5 years. Second, these animals are usually young and healthy individuals with a normal, or even exaggerated [81], healing response; conversely, human patients are older with defective healing mechanisms. Third, the absence of underlying atherosclerosis can substantially modify the response and its time course. While this period is rather valid for the assessment of vascular healing after BMS placement, some data from human necropsies suggest this relationship may not be accurate for DES assessment.

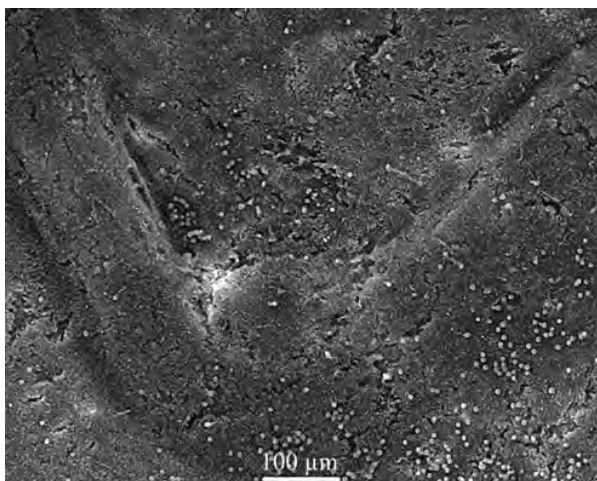
Table 1 summarizes the stages of vascular healing after stent implantation in humans [69, 78, 82] and in animals [43, 44, 77, 79, 80, 83, 84], namely in swine coronary arteries and rabbit iliac arteries that follow a parallel time course [44].

The characteristics and time course of vascular response to stenting in animals is well characterized [43, 44, 69, 77-80, 82-84]. The early stage (1-3 days) is prominently featured by platelets and coagulation system with adhesion and aggregation of platelets plus fibrin deposition surrounding the stent struts and a moderate inflammatory reaction with scattered adherent neutrophils (Figs. 1 and 2). The mural thrombi appear organized between stent struts at day 7, containing smooth muscle cells (SMC) and macrophages with a few lymphocytes, fibrin, and red blood cells, as well as luminal endothelial cells. A moderate number of luminal giant cells, adherent to the stent struts, are usually observed in swine coronary arteries [85, 86] (Figs. 3 and 4). Fibrin still appears up to 14 days with sparse inflammatory cells around stent struts. Although the neointimal growth process begins earlier, it is not till the second week that the neointima shows a limited number of SMC inside a proteoglycan-rich matrix. At its maximum point (28 days), the neointima contains SMC and type III collagen, with rare giant cells around stent struts and no trace of fibrin. The presence of inflammatory cells and fibrin surrounding the struts at 28 days is one of the distinctive features of DES as compared with BMS [54, 74, 87]. Cell proliferation in the neointima peaks at 7 days, is reduced by approximately half at 14 days, and returns to a low baseline level by 1 month [44].

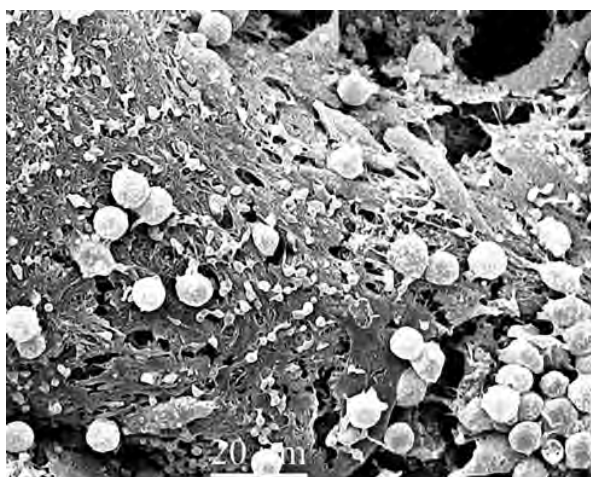
The results of human studies show slight differences. Platelet adhesion and fibrin deposition are still evident up to 14 and 30 days, respectively [78]. The inflammatory component, mainly polymorphonuclears and macrophages, appears early (1-3 days). Macrophages can be detected for at least 3 months. T lymphocytes appear late (14 days) and persist beyond 6 months. Cell proliferation in the neointima is evident at 14 days, but we lack data about the time course of cellular proliferation in humans. Conversely to the almost purely proliferative response of the cellular component in the animal neointima, SMC migration from within the plaque or media to the expanding neointima may be the dominant factor contributing to in-stent restenosis in humans [44]. In the long term, mirroring the evolution of any wound healing, type I collagen becomes the main component of the extracellular matrix, replacing type III collagen with subsequent neointimal shrinkage and remodeling [88].

**Table 1. Time Course of Vascular Healing (and Stent Restenosis) After Stent Implantation**

Human (Days)	Animal (Days)	Histologic and Physiologic Features
0-30	0-14	Platelet activation, fibrin deposition, thrombus
0-30	0-14	Inflammation, adherent luminal cells (early), deep inflammation (late)
14-90	4-16	Re-endothelialization and formation of granulation tissue
60-180	14-28	SMC proliferation and migration and extracellular matrix proteins production
60-?	14-180	Arterial remodeling



**Fig. (1).** Scanning electron microscopic (SEM) image of swine coronary artery, 1 day after drug eluting stent (DES) implantation. Non-endothelialized surface of strut covered with fibrin, platelets and inflammatory cells.

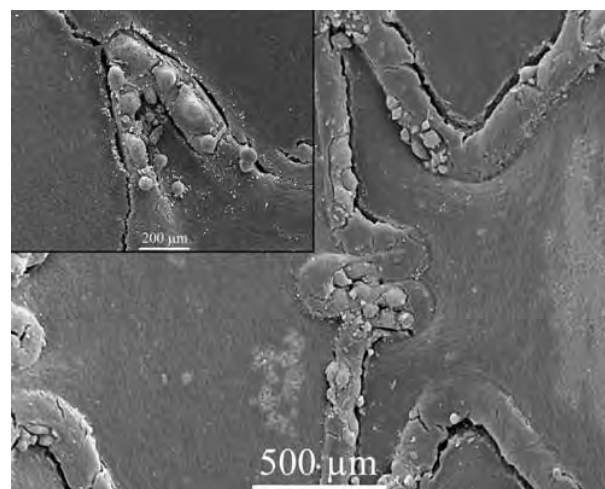


**Fig. (2).** SEM image of swine coronary artery, 1 day after DES implantation. High magnification shows the surface of a strut covered by fibrin, platelets and inflammatory cells.

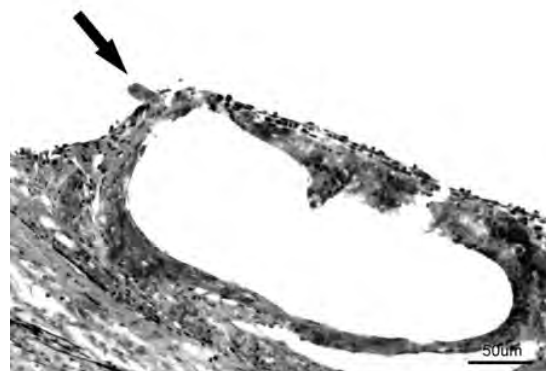
#### Lessons From the Results of Brachytherapy and Radioactive Stents. Any Implications for First Generation Des?

The first endeavors in the fight against in-stent restenosis used different radiation types and sources. Brachytherapy can be delivered using catheters ( $\beta$  or  $\gamma$  radiation) and stents ( $\beta$  radiation). Different animal studies demonstrated inhibition of neointimal proliferation [50, 51, 89-95], at the cost of incomplete healing in the short term [96-100]. The neointima in these irradiated arteries showed a decreased number of SMC and increased extracellular matrix formation [50]. Longer follow-up periods showed a progressive late neointimal growth, reaching the levels of restenosis observed in controls at 6 months [99] and up to 1 year [101]. Moreover, some worrying histological features were described: persis-

tent fibrin deposition and inflammation within the neointima and absence of complete endothelialization [94, 97, 100, 102-104]. These pathological findings correlated with a high incidence of subacute and late arterial thrombosis and a subsequent high death rate: up to 50% of the treated animals in a swine coronary model prematurely died [104]. The incidence of this feared complication, LST, was confirmed as the major drawback of the technique [105].



**Fig. (3).** SEM image of swine coronary artery, 7 days after DES implantation. Presence of luminal giant cells over the non-endothelialized surface of the struts. Left upper corner: detail of the giant cells.



**Fig. (4).** Histologic image of swine coronary artery, 28 days after DES implantation. Presence of a luminal giant cell (arrow) with partial endothelialization of the stent. Amorphous material (fibrin and cellular debris) as well as inflammatory cell infiltration around the strut. Verhoeff-Van Gieson stain.

After the disappointment of radiation therapy, DES took over the attention. The first DES that demonstrated its superiority in terms of restenosis reduction was the sirolimus eluting stent (SES), Cypher stent (Cordis, USA), claiming a 0% restenosis rate at 6 months [106]. These human results endorsed the promising data from animal research using par-

enteral [107] or locally delivered [108, 109] sirolimus. Soon after the RAVEL study publication, we got some preclinical evidence of loss of efficacy at longer follow-up periods [110] and the first reports of clinical LST [111, 112]. The next-in-row DES was the paclitaxel eluting stent (PES), Taxus stent (Boston Scientific, USA) that paralleled the 0% restenosis rate at 6 months in the TAXUS I study [113]. Again, it confirmed the results observed in animals [54, 114]. But the evidence of reduction in the long-term efficacy [87] and potential cause of LST [112] arrived even earlier.

#### The Need for Longer Follow-Up Periods. Late Catch-Up and New-Onset Arterial Disease Inside the Stents

The similarity in arterial histology after brachytherapy and DES implantation in animal models supports the theory of a common efficacy failure: neointimal growth seems to be delayed rather than prevented, the so-called “late catch-up”. Different experimental studies have confirmed its presence after brachytherapy [99, 101] and DES implantation [87, 110, 115]. This phenomenon has also been detected in the human scenario, both with PES [116-118] and SES [119-121]. What are the underlying mechanisms? Aoki *et al.* [122] found that whereas BMS showed shrinkage of the neointima between 6 months and 2 years, permanent-polymer PES exhibited an increase in neointimal volume. This phenomenon was not accompanied by late luminal loss, suggesting a compensatory increase in the total size of the vessel i.e. positive remodeling of the artery. Park *et al.* [123] described a catch-up phenomenon at 2 years restricted to the subgroup treated with a higher-dose polymer-free PES. Byrne *et al.* [124] presented the results of more than 1300 patients treated with different DES demonstrating the presence of a small but significant delayed (from 6-8 months to 2 years) late loss associated with permanent-polymer DES, both SES and PES, as compared with polymer-free SES.

Another perturbing finding is the appearance of new-onset atherosclerosis in the late phase after DES treatment. It is not a new entity as Van Beusekom *et al.* [82] reported it some years ago in the setting of BMS implantation in venous bypass grafts. More recently, new cases of such “neoatherosclerosis” have been described with some features of plaque vulnerability (lipid-laden intima, thin-cap fibroatheroma, ruptured plaques) as characterized by intravascular ultrasound (IVUS) and histology [125] or optical coherence tomography (OCT) [126, 127]. As expected, DES also share this issue [128, 129]. What’s worse, it seems that this complication appears more frequently and earlier in DES than in BMS. Nakazawa *et al.* [130] described these pathological changes in 31% of lesions treated with DES as compared with 16% of BMS in a large series of human necropsies. The mean time from stent implantation to the appearance of neoatherosclerosis was significantly shorter in DES ( $1.5 \pm 0.4$  years) than in BMS ( $6.1 \pm 1.5$  years). Kang *et al.* [127] analyzed a series of DES with in-stent restenosis and demonstrated a higher prevalence of vulnerable plaque features by OCT (thin-cap fibroatheroma 69% vs. 33%,  $p = 0.012$ ; red thrombi 27% vs. 0%,  $p = 0.007$ ) in those stents implanted  $\geq 20$  months ago than in DES  $<20$  months after implantation.

These late complications prompted the consensus recommendation of longer follow-up periods in the animal

model to avoid undesirable surprises after human use of such devices. The first consensus document [32] advised extra follow-up periods of 3 and 6 months, as endorsed by the FDA [22]. The most recent consensus document [33] extended this recommendation up to 1 year after implantation, as also the EMEA guidelines advocate [23].

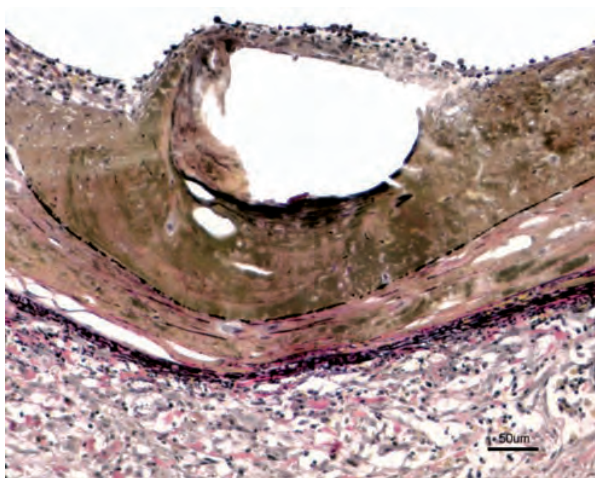
#### RE-ENDOTHELIALIZATION: THE RELEVANCE OF RECOVERING A NORMAL ENDOTHELIUM

##### Delayed Vascular Healing. Data From Animal Studies and Human Necropsies

Endothelial denudation is a common feature after balloon angioplasty and stent implantation. The loss of the endothelial monolayer implies the exposure of very thrombogenic structures, namely arterial media and components of the underlying atherosclerotic plaque. It is therefore critical to recover this shield to avoid arterial thrombosis. Different observations have reported a short time – 7 days – to prove full endothelialization in the BMS swine coronary model [83, 86], somewhat longer in rabbit iliac – between 21 [70] and 28 days [43] – while humans only show complete endothelialization after 3 months [69, 78]. As described in the previous section, brachytherapy induced a marked delay in the healing response with incomplete endothelialization at long-term follow up [96-100, 104]. Taking into account the histologic resemblances between irradiated arteries and those treated with DES, it was not surprising to find a delayed re-endothelialization of DES-treated arteries. Farb *et al.* [87] reported incomplete healing up to 28 days after PES implantation in a rabbit iliac model. Other markers of delayed healing (significant deposition of fibrin around the struts, medial cell loss and persistent signs of inflammation; Figs. 5 and 6) were described both in PES and SES [74]. The presence of heterophils / eosinophils in the inflammatory reaction suggested local hypersensitive reactions that could be linked with adverse clinical outcomes [72, 73, 131]. The 2 first-generation DES seem to show different pathologic features of delayed healing. SES tended to show more frequently eosinophils surrounding the struts [67, 74] and deep – even adventitial – granulomas [68] (Fig. 7). On the other hand, PES is associated with medial necrosis [74], positive remodeling [122] and excessive fibrin deposition [67, 87]. Human necropsies subsequently confirmed the data obtained in animal research. Farb *et al.* [132] first demonstrated delayed healing in some cases of human LST after DES treatment: 12 from 13 cases showed a defective neointimal layer over the stent. The same group of investigators [133] completed the data in a study with a mean time from stent implantation of more than 220 days. DES showed a significant poorer endothelialization over the struts ( $56 \pm 26\%$  vs.  $90 \pm 21\%$ ,  $p = 0.0001$ ) and a higher fibrin score ( $2.3 \pm 1.1$  vs.  $0.9 \pm 0.8$ ,  $p = 0.0001$ ) as compared with BMS samples. In a subsequent paper [134], these authors confirmed that the most powerful histological predictor for stent thrombosis was the absence of endothelial coverage, what they defined as the ratio of uncovered to total stent struts per section (RUTSS). The odds ratio for LST incidence of lesions presenting a RUTSS  $>30\%$  is 9.0 (95% CI, 3.5 to 22.0); the RUTSS  $>30\%$  cut-off point allows the detection of LST with a 75% sensitivity and 76% specificity. A higher RUTSS but also fibrin deposition

### Preclinical Safety Evaluation of Stents

and persistent inflammation appear more frequently in patients treated with DES in the setting of acute myocardial infarction than in stable angina patients, mirroring a higher incidence of LST in acute myocardial infarction cases [71]. Other variables associated with pathologic adverse data were stent fractures, especially those showing a transection gap [135], and, more importantly, overlapping stents [68, 70, 74, 136-138]. In the clinical setting, as much as 30% of the stent procedures involve overlapping stent implantation. So, it is relevant to know the precise implications and results of such treatment. The overlapping stents model is recommended by consensus [22, 23, 33] not in the initial but in the advanced phases of any protocol of preclinical evaluation of DES. This model is also adequate to evaluate stent fracture as it provides a hinge point for the distal stent.



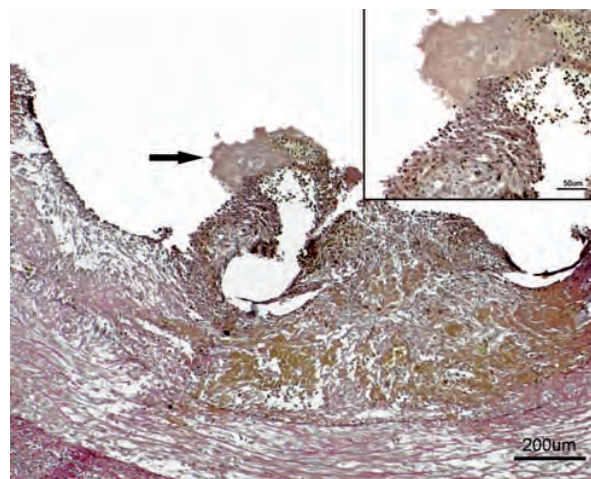
**Fig. (5).** Histologic image of swine coronary artery, 28 days after DES implantation. Presence of para-strut amorphous material. Malapposition of the strut against the internal elastic lamina. Medial necrosis beneath the stent strut and adventitial reaction. Verhoeff-Van Gieson stain.

### Endothelial Presence vs. Function Vasomotor Response

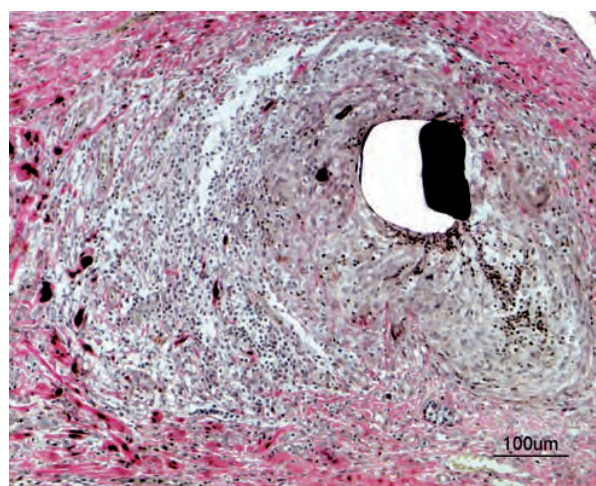
The absence of endothelial lining over the stent struts has been associated with negative prognosis, but the mere presence of endothelial cells does not imply a functional restoration of normal vascular physiology. Not all the published data agree with the marked delay of vascular healing observed with DES implantation. Different groups have shown an acceptable endothelialization rate in the swine model at 28 days with SES [108], PES [137] or tacrolimus-eluting stent (TES) [86, 139, 140]. Second-generation DES as zotarolimus (ZES) or everolimus (EES) eluting stents show even better results [48, 136, 141]. A common feature in many of these studies is the immaturity of the observed endothelial cells that translates into abnormal function [140, 142-147]. It is well known that the implantation of a stent induces a prolonged and more pronounced endothelial dysfunction than that observed after simple balloon inflation [148]. How can we assess endothelial function? Different markers of the mature endothelial cell can be analyzed by immunohistochemistry:

### Current Vascular Pharmacology, 2013, Vol. 11, No. 1 79

Platelet-endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1, CD31), a member of the immunoglobulin superfamily of transmembrane proteins, is concentrated at endothelial junctions [149]. It is likely that its interaction with integrins is essential in mediating trans-endothelial migration of leukocytes, rather than endothelial permeability. Its functions also involve vasculogenesis, apoptosis and hemostasis. *In vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that PECAM-1 inhibits the aggregation of platelets and induces smaller thrombi, which form slowly [150].



**Fig. (6).** Histologic image of swine coronary artery, 28 days after DES implantation. Luminal thrombus (arrow) and presence of para-strut amorphous material as well as inflammatory cell infiltration. Malapposition of the strut against the internal elastic lamina. Medial necrosis beneath the stent strut. **Right upper corner:** Detail of the luminal thrombus. Presence of foam cells and polymorphonuclears around stent strut. Verhoeff-Van Gieson stain.

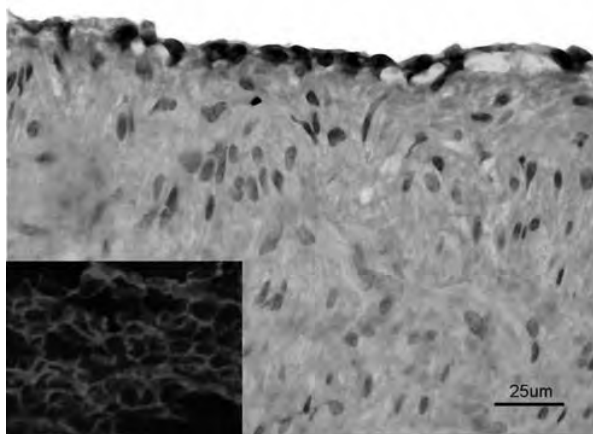


**Fig. (7).** Histologic image of swine coronary artery, 28 days after DES implantation. Strut is encompassed by chronic, active granulomatous inflammation with heterophils. Verhoeff-Van Gieson stain.

Thrombomodulin (CD141) is an integral membrane protein found on the surface of endothelial cells. It serves as a cofactor in the activation of protein C by thrombin in the coagulation pathway. Thrombomodulin-bound-thrombin has no procoagulant effect but stimulates fibrinolysis [151]. The loss of thrombomodulin function causes spontaneous thrombosis in the arterial and venous circulation [152].

The Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) comprises some important signaling proteins involved in vasculogenesis (*de novo* formation of embryonic circulatory system) and angiogenesis (development of blood vessels from pre-existing vasculature). VEGF has endothelial cell-specific mitogenic activity and is considered a key regulator of normal and pathologic angiogenesis and vascular permeability [153]. VEGF protein and mRNA levels are significantly up-regulated in tissues with ongoing angiogenesis while there is down-regulation following complete vascularization. VEGF-A is responsible for induction of pathologic angiogenesis as well as maintenance of normal vascular endothelium.

Nitric oxide (NO) is associated with inhibition of platelet and leukocyte activation, and maintenance of vascular smooth muscle in a non-proliferative state [144]. In addition to being the main determinant of basal vascular smooth muscle tone, NO opposes the actions of potent endothelium-derived contracting factors such as angiotensin-II and endothelin-1 [154-156]. Furthermore, both angiotensin-II [157] and endothelin-1 [158] have shown to induce platelet activation and release of growth factors. Impairment of NO activity or imbalance between endothelium-derived relaxing and constricting factors is crucial in the mechanisms of endothelial dysfunction. (Fig. 8) depicts the expression of endothelial NO synthase (eNOS) in a layer of endothelial cells and the presence of CD31 in the intercellular junctions (Fig. 8, lower left corner).



**Fig. (8).** Immunoperoxidase staining exhibits a strong reactivity with anti-eNOS antibody in the endothelial cells. ABC-Peroxidase. **Left lower corner:** Confocal en face immunofluorescence for CD31 in whole mount stented arterial segment. Strong cell to cell border localization.

The main *in vivo* hallmark of dysfunctional endothelium is abnormal vasomotor function. Togni *et al.* [159] first communicated the evidence of a distinct abnormal vasomotor response in humans 6 months after the implantation of SES: exercise, a physiological endothelium-dependent vasodilator, induced paradoxical vasoconstriction of the vessel distal to the stent. Although some previous data [160] demonstrated that local sirolimus induces a severe impairment of relaxant response of epicardial arteries to serotonin and bradykinin, no previous preclinical analysis of vasomotor response was conducted in DES studies [161]. The abnormal vasomotor response after SES implantation to different endothelium-dependent vasodilators [acetylcholine (ACh), substance P, serotonin, bradykinin, endothelin-1, rapid pacing] was further confirmed both in animals [140, 146, 162] and humans [163-169]. The results were similar after PES implantation, both in animals [140, 143, 146, 170, 171] and humans [164, 166-168, 172]. It seems that ZES [168, 169] and biolimus-eluting stents (BES) [167, 168, 173] show better results in terms of endothelial-dependent vasomotor function than the first-generation DES.

The potential explanation for this vasoconstriction involves the vasa vasorum, which can extend over several centimeters along the coronary artery wall [174]. The antiproliferative drugs may diffuse through these tiny channels. Furthermore, DES have been related with an increase in the number of vasa vasorum that may also play a role in persistent inflammation [175]. The polymer itself, through hypersensitivity reactions [72, 144], may participate in this abnormal vasomotor response. The abnormal vasomotor response and the morphological features of endothelial dysfunction – reduced eNOS expression [140] and markers of oxidative stress [171] – have been demonstrated to appear simultaneously after PES implantation. However, the link between morphological markers of mature endothelium, as eNOS expression, and functional assessment of vasomotor response to ACh is controversial [176].

#### Endothelium Recovery and Restenosis: Is There a Connection?

Some data regarding a potential link between endothelial dysfunction (assessed as brachial vasodilation in response to endothelium-dependent stimuli) and restenosis after BMS [177] reinforced the relevance of endothelial recovery, although other investigators could not confirm this connection [178]. Even when analyzing specific endothelial progenitor cells (EPC) characterized by the expression of CD34+/KDR+/CD45–, a significantly high number of circulating EPC were present in patients with restenosis compared with controls [179]. Endothelium modulates local homeostasis through vasoactive compounds and constitutes a barrier that isolates SMC from circulating growth factors. Endothelial cells synthesize different growth factors, as fibroblast growth factor, platelet-derived growth factor and transforming growth factor- $\beta$  that are important in SMC proliferation [180]. Functional endothelium maintains the mitogenic quiescence of SMC by the inhibitory effect of NO [181]. The loss of endothelial cells entails a proliferation and migration of SMC to the denuded vessel surface, where they secrete extracellular matrix proteins that finally lead to neointimal formation [182]. If the denudation of the endothelial surface

only involves a small area, little intimal hyperplasia develops [183], while greater neointimal growth can be observed with wider endothelial denudation [184]. Interestingly, SMC appear in the intima only in those areas devoid of endothelium at 7 days [185]. Where do the repopulating endothelial cells come from? It is well known that they can be derived from circulating EPC [186] but also they can proliferate from the undamaged borders of the artery [180] or even spring from monocytes / macrophages [187].

Based on these facts, Van Belle *et al.* [188] postulated that accelerated endothelialization by local delivery of an endothelial-specific growth factor in a rabbit iliac model of stent implantation significantly reduced in-stent neointima formation. More data about the connection of endothelial function and restenosis became available in animals [189, 190] and in humans [191-193]. The next development was a bio-engineered stent, Genous stent (OrbusNeich, USA) coated with anti-CD34 antibodies with the ability of recruiting circulating EPC to promote a fast endothelialization [194, 195]. The confirmation of this fast and complete endothelialization was achieved both in swine coronary model and baboon bypass model [196]. Although the first clinical use showed promising results [197], this pro-healing stent failed in its attempt to reduce the restenosis rate [198, 199]. One potential explanation for this uncoupling is the relative low number of circulating EPC among old, sick patients [193, 198] as compared with young, healthy animals. Also, the CD34+ markers are non-specific and shared by other hematopoietic stem cells. Therefore, it is possible that EPC capture stent have attracted other bone marrow cell lines such as SMC progenitors, which in turn promote neointimal proliferation [200-202]. New developments have been analyzed with the immobilization of integrin binding to arginine-glycine-aspartic acid (RGD) peptides on strut surfaces showing an improvement in endothelialization [203, 204].

### THE 3 VARIABLES IN THE EQUATION OF DES = METAL BACKBONE + POLYMER (IF ANY) + DRUG

#### Metal Backbone

Different aspects of the metallic structure of the stent and their potential influence on the long-term performance should be analyzed:

**Metallic alloys.** The first stents tested in coronary use were self-expanding prostheses made of 316L stainless steel [7] or nitinol, a nickel titanium alloy with a high shape memory (Wallstent®) [14]. For many years, balloon-expandable stainless steel stents (SSS) were the most popular stents implanted in the coronary arteries. Recently, new alloys have replaced the SSS as the metallic backbone of coronary stents, also of DES. Today, most of them are cobalt-chromium stents (CCS), an alloy that keeps the radial strength of stainless steel while reducing the thickness of the strut. Our group found no differences in endothelialization rate at short-term (1, 3 and 7 days) between CCS (80  $\mu$ m strut thickness) and SSS (100  $\mu$ m strut thickness) [86]. The platinum chromium stents (PCS, 81  $\mu$ m strut thickness) showed an endothelialization rate at 14 days equivalent to that of SSS (97  $\mu$ m) in a rabbit iliac artery model [205]. Different proportions of nickel and molybdenum can be found

in the different available stents. This difference in composition was postulated to be noteworthy, at least in terms of restenosis, as some data link the contact allergies to these elements with in-stent restenosis [206]. However, Messer *et al.* [207] found no differences between different alloys in terms of expression of the cellular adhesion molecules by endothelial cells. Others did not confirm the clinical association between nickel and restenosis [208].

**Strut thickness.** ISAR-STEREO and ISAR-STEREO 2 studies have demonstrated in clinical use that thinner strut (50 vs. 140  $\mu$ m) stents are associated with a significant reduction of angiographic and clinical restenosis after coronary artery stenting [209, 210], as did Briguori *et al.* [211] in a subset of lesions located in small vessels. Conversely, experimental data from rabbit iliac artery model using 2 different thickness values (125 and 200  $\mu$ m) of the struts of SSS showed no differences in terms of neointimal hyperplasia [212]. In terms of vascular healing response, strut tissue coverage (either with endothelial cells or with other kind of cells, plasma or fibrin) was significantly lower at 14 days in the rabbit iliac artery model with the thicker, 132  $\mu$ m, SSS (77%) compared with a thinner, 97  $\mu$ m, SSS (88%,  $p = 0.05$ ) and 81  $\mu$ m PCS (95%),  $p = 0.001$  [205].

**Geometry and Design.** Some authors [27, 213] noted the influence of stent design as the main contributor to the restenosis incidence. Stent geometry is of particular relevance as already demonstrated 15 years ago [27]: a lowering of strut-to-strut intersections by 29% without affecting mass or surface area reduced vascular injury by 42%, thrombosis by 69% and neointimal hyperplasia by 38%. The same group of investigators has demonstrated that the stent design (8 vs. 12 struts per section) and arterial geometry were the main *in vitro* predictors of restenosis [212]. The design of the stent, coil vs. slotted tube [214] or self-expanding nitinol stents vs. balloon-expandable stents [79, 215], could also play a role in the subsequent response. An elegant *in vitro* study [216] demonstrated that endothelial cell coverage might be impaired by stent strut thickness  $\geq 75$   $\mu$ m, likely related to flow disturbances impairing cell attachment [217]. Even subtle features as the edge angle of the struts may play a role in the rate of endothelialization: smaller edge angles facilitate endothelialization over stent struts when compared with larger angles [218].

**Coatings.** Different coatings have been used to improve the biocompatibility and, potentially, the results of the stents. Heparin-coated stents seemed to be associated with pro-healing effect [219, 220]. Carbon coating with Carbofilm (CID, Italy) have demonstrated an excellent profile in terms of endothelialization rate,  $\geq 95\%$  at 7 days in our model of swine coronary arteries [86, 139, 221, 222]. Titan stent (Hexacath, France), coated with titanium-nitride-oxide, has demonstrated a reduction in platelet adhesion and fibrinogen binding as well as less neointimal hyperplasia in the swine coronary model [223]. Clinical results of Titan stent resemble those obtained with the first version of ZES, Endeavor stent (Medtronic, USA) [224]. Silicon carbide (ProBio, Biotronik, Germany) coating may reduce thrombogenicity *in vitro* [225] and shows significant lower protein adhesion and rapid endothelialization leading to an improved functional endothelial layer [226]. Clinical results of the silicon carbide



coated stent claim to be equivalent to those obtained with DES arguing the faster endothelialization and functional recovery [227]. An excellent review of passive coatings is available [228].

Permanent vs temporary scaffolding. Since its birth, the concept of metallic stent has implied its lasting character to avoid abrupt closure and elastic recoil of the artery. However, both facts appear in a restricted time-window, usually limited to the first weeks after PCI. After this time point, the risk of suffering any of these events is negligible while the enduring presence of the stent could extend the induced damage to the artery. In addition, the metallic stent may hinder eventual future revascularization procedures as well as non-invasive imaging such as magnetic resonance imaging. The initial preclinical [229] and clinical [230] experiences with bioresorbable scaffolding used a Poly-L-Lactic acid (PLA) stent, the Igaki-Tamai stent. As it was observed with other different polymers in animal research [62-64], the elicited inflammatory reaction is intense and leads to a greater neointimal thickening. This pioneer research served as the basis for the development of temporary scaffolding combined with an antiproliferative drug, the Abbott BVS system. Other different biodegradable scaffolds have used Tyrosine-based polycarbonate copolymer (REVA stent, REVA Medical, USA) [231] or salicylic acid blended in poly-anhydride ester (IDEAL BDS, Bioabsorbable Therapeutics, USA) [232]. A different approach to bioresorption has come from absorbable metallic stents. The magnesium absorbable metallic stent (AMS, Biotronik, Germany) demonstrated a high degradation rate at 2 months [233]. Biocorrosible iron stents have also been tested in animals [234, 235] with data suggesting late (18 months) signs of biocorrosion [234]. Further appraisal on the results of these bioresorbable systems will be addressed later in this review.

### Polymers and Other Vehicles for the Antiproliferative Drugs

The first-generation DES were coated in permanent polymers not primarily intended for its vascular use. Although they fulfill the requirements of controlled drug release, few data are available about the long-term performance in vascular locations. Data from histopathologic studies indicate that these non-erodable polymers may contribute to the appearance of LST by inducing localized vascular inflammation, hyper eosinophilia, thrombogenic reactions, and apoptosis of smooth muscle cells [72, 73, 116]. The Cypher SES is coated in a permanent mixture of Poly(ethylene co-vinyl acetate) – PEVA – and poly(n-butyl methacrylate) – PBMA – that has been related to granulomatous and hypersensitivity reactions in animal models and humans [67, 236]. The TAXUS PES systems use Poly(styrene-b-isobutylene-b-styrene) – SIBBS – as the vehicle for the drug. This PES system has been associated with medial necrosis, positive remodeling, and excessive fibrin deposition [68, 137].

The second-generation DES improved the selection of polymers while using permanent drug carriers. The first version of ZES, the Endeavor stent, was coated with phosphorylcholine. This coating has demonstrated a high endothelialization rate (>90%) at 5 days [237, 238]. Unfortunately, the clinical results of this DES underperformed the

expected outcomes [31]. The second version of this ZES, Endeavor Resolute stent (Medtronic, USA), changed the polymer to the Biolinx amalgam. This compound is a blend of 3 different polymers: the hydrophobic C10 polymer to control drug release; the biocompatible and hydrophilic C19 polymer; and polyvinyl pyrrolidone to allow an early burst of drug release. The *in vitro* and *in vivo* results of this new DES showed promising safety and efficacy results [136, 141, 239], subsequently confirmed in clinical trials [168, 169]. Another second-generation DES that has proved superior efficacy as compared with first-generation DES [240, 241] is EES (Xience stent, Abbott, USA; Promus stent, Boston Scientific, USA). EES is coated with a polyvinylidene fluoride polymer, co-hexafluoropropylene and poly-n-butyl methacrylate. Different authors [48, 141, 205] have demonstrated a better profile of EES in terms of vascular healing as compared with other DES in preclinical experiments.

New permanent polymers have been developed to overcome the limitations of the previous compounds. An example is the P5 polymer (Iberhospitex, Spain), an acrylic/methacrylic co-polymer derived from Triflusal (an antiplatelet agent developed by Uriach, Spain) + butyl acrylate. We have demonstrated its excellent safety profile: the SSS coated with P5 polymer showed the same endothelialization rate (97%) at 7 days as the bare SSS [242] in the swine coronary model. But in the evolution of DES technology we can also find some failed attempts, related to inadequate selection of permanent polymers. The QuaDS DES is a slotted 316-L stainless steel tube coated with multiple polyacrylate sleeves that release a derivative of paclitaxel, 7-hexanoyltaxol (QP2 or “taxen”). Restenotic lesions from QuaDS-QP2-eluting stents at 12 months show persistent fibrin deposition with varying degrees of inflammation, blaming these adverse findings on the non-resorbable polymer [116].

As permanent polymer seem to be the bad guy in the field of DES safety, different approaches have focused the efforts in removing permanent polymers from the equation. Non-polymeric DES totally avoid the polymer as drug carrier with different designs: AmazoniaPax (Minvasys, France) elutes paclitaxel from a modified-surface CCS; BioFreedom (Biosensors, Switzerland) is a BES based on a SSS with microporous surface; VESTASync (MIV Therapeutics, USA) elutes sirolimus from a nanoporous hydroxyapatite modified-surface SSS; Yukon (Translumina, Germany) is a SES based on a SSS with microporous surface. Another example of these polymer-free stents is Janus stent (CID, Italy), a SSS coated with Carbofilm that elutes tacrolimus from small reservoirs in the metallic structure. Our group has demonstrated that Janus stent is associated with an excellent vascular healing rate in a swine coronary model [86, 139]. A different approach involves the use of biodegradable polymers. PLA has been used as an abluminal coating in BES in Biomatrix stent (Biosensors, Switzerland), Nobori stent (Terumo, Japan), Axxess stent (Devax, USA) or Xtent (Xtent, USA). Another mixture used as bioresorbable drug carrier is poly-DL-lactide-co-glycolide in reservoirs (Nevo stent, Cordis, USA) or as an abluminal coating (Synergy, Boston Scientific, USA). Nobori BES has demonstrated a favorable effect on vasomotor response to endothelium-dependent vasodilators  $\geq 9$  months after their implantation [167, 168], suggest-

ing a better functional recovery when the polymer has disappeared. Some data from a swine coronary model show an adequate re-endothelialization of Axxess BES but with loss of efficacy in terms of neointima reduction at long-term follow-up [115].

### Drugs: Paclitaxel vs. Limus. Other Drugs

The first-generation DES used 2 drugs that established the big pharmacologic families subsequently used in most of the commercially available DES. Sirolimus (rapamycin), a macrolide antibiotic approved for use as an immunosuppressant to prevent organ rejection, binds to the FK-binding protein 12 (FKBP12), which inhibits the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. This prevents the downregulation of the cell division kinase inhibitor p27kip1, inhibiting cell division between phases G1 and S1 of the cell cycle [243]. Sirolimus has a wide dose range, is cytostatic as opposed to cytotoxic, and has additional anti-inflammatory properties through its inhibition of interleukin-2, which reduces T- and B-cell activation [107]. However, not all the antiproliferative effects of this drug can be considered as positive effects. Fukuda *et al.* [244] proved that sirolimus might affect the growth and differentiation of EPC. The macrocyclic lactone group of antiproliferative drugs – everolimus, zotarolimus and biolimus – share the mechanism of action described for sirolimus. Everolimus is a synthetic derivative of sirolimus (40-O- [2-hydroxyethyl]- rapamycin) with a high antiproliferative potency [245, 246]. Zotarolimus (ABT-578) incorporates a tetrazole ring, which increases lipophilicity and facilitates crossing into SMC membranes [247]. Biolimus A9 is also a highly lipophilic sirolimus analogue [30, 248]. Novolimus [249] and myolimus have come to complete the so-called limus family. On the other hand, paclitaxel stands as the unique representative of its kind after the failure of the taxen-eluting stent, QuaDS-QP2 stent [116, 250, 251]. Paclitaxel, an extract derived from the bark of the *Taxus brevifolia* (Pacific Yew) tree, inhibits SMC proliferation and cell migration through the stabilization of microtubules [114]. The debate about the superiority of limus DES over PES seems to be finishing as all the published data point in the same direction. As previously described, limus and PES show distinctive adverse features in the histologic analysis [67, 74, 87, 122], but most of the studies agree in showing worse results in terms of delayed healing and abnormal vasomotor response with PES [48, 66, 136, 140, 146, 252]. The largest, patient-level, published meta-analysis showed that SES significantly reduced the risk of reintervention by 26% and stent thrombosis by 34%, without significant changes on the risk of death or myocardial infarction [253]. Second-generation DES have demonstrated even higher differences in clinical results favoring EES, ZES and BES [30, 31, 241].

Other drugs that have been successfully tested in different DES formulations include statins [242, 254-263], estrogens [264, 265], steroids [266-268] or immunosuppressant drugs as tacrolimus [86, 139, 140, 269-275]. Not all the tested drugs have shown to be equally effective and safe. Potent antiproliferative drugs as vinblastine have been tested to inhibit neointimal proliferation, but the therapeutic window seemed to be quite narrow to avoid a very negative effect on vascular healing [276-278]. As in the case of

QUADS-QP2 stent [116], another failed DES development showed late medial necrosis and positive remodeling of the artery. A SSS coated with a permanent polymer that elutes actinomycin D (a drug that affects the S phase of the cell cycle by forming a stable complex with DNA) was tested in the clinical ACTION trial [279]. The authors of the study concluded, “not all anti-proliferative drugs are effective in the prevention of restenosis”. It has become clear that promise in early preclinical studies (30 days) does not necessarily translate into clinical effectiveness at 6 months and that late safety animal data (90 days) is a prerequisite for clinical investigation [32].

There are critical variables for the success of a DES other than the selection of the best drug to block the neointimal process. The ability to deliver the desired dose of drug to the vessel wall and its long-lasting effects are pivotal issues. The fear of missing any of these aims probably compelled some manufacturers of first-generation DES to load the devices with doses that are potentially higher than desirable. Different groups [49, 263, 280] have demonstrated that lowering the doses of sirolimus or paclitaxel in different DES improve the healing response without compromising the antiproliferative effect. Another relevant matter is the assessment of pharmacokinetics with verification of adequate concentrations of drug into the vessel wall and negligible amounts of circulating drug. Some information regarding pharmacokinetics can be obtained from the literature about sirolimus [109], paclitaxel [281-284], everolimus [285], zotarolimus [286] and biolimus [287]. Other features about drug elution, strut position, overlapping and blood flow can be discerned with the aid of flow mathematical models. Balakrishnan *et al.* have demonstrated that drug deposition occurs less *via* contact between stent coating and the arterial wall than *via* flow-mediated deposition of solubilized drug, especially in the case of overlapping stents [288]. Finally, the results of the experimental research only serve as an approximation to the clinical scenario and it is almost impossible to mirror it completely. For example, it is hard to parallel a common clinical feature: the presence of a complicated atherosclerotic plaque with a significant burden of thrombus. Hwang *et al.* have substantiated that thrombus apposed on stents creates large variations in drug uptake and can act to either increase or decrease wall deposition according to the clot and stent geometry [289].

### HISTOPATHOLOGICAL VARIABLES TO BE ANALYZED IN A DES PRECLINICAL PROTOCOL

There are some common characteristics that must be measured and compared with other control stents, usually BMS [290]. The consensus publications [32, 33] acknowledge the next features:

Vessel injury and Inflammation. Histologic evaluation should include injury assessment by the classic Schwartz Injury Score [25] (values 0 to 3, Table 2a). However, this method is not a perfect indicator of injury, as it was described and applied only to muscular arteries and not to elastic arteries. The Schwartz method accurately computes the depth of vessel injury but does not account for its circumferential or longitudinal propagation. In order to overcome these limitations, Gunn *et al.* proposed a modified scale

**Table 2a. Injury Score as Proposed by Schwartz et al. [25]**

0	Internal elastic lamina intact; endothelium typically denuded, media compressed but not lacerated
1	Internal elastic lamina lacerated; media typically compressed but not lacerated
2	Internal elastic lacerated; media visibly lacerated; external elastic lamina intact but compressed
3	External elastic lamina lacerated; typically large lacerations of media extending through the external elastic lamina; coil wires sometimes residing in adventitia

[291] (values 0 to 4, Table 2b) at each stent strut site or for each section. Representative samples of injury score are depicted in (Fig. 9). In fact, some data from our research [263, 292] point out the relevance of the status of the internal elastic lamina (IEL) after stent implantation: differences in restenosis rate can only be established between BMS and PES when the IEL appears broken. The report of the induced vascular injury must include an inflammation description (presence, cell types, location, depth) and an inflammation score for the overall vessel as well as the adventitial, media, neointima, and at stent strut sites. Regarding inflammation score, substantial heterogeneity exists as different scores [100, 110, 214, 293] have been used (Tables 3a, 3b, 3c, 3d). In any case, as they are assessed as categorical variables, the presentation and comparison of data should be done according to this characteristic. An effort should be made to obtain quantitative measurement of cell density, reporting it as number of cells per area [294].

**Table 2b. Injury Score as Proposed by Gunn et al. [291]**

0	No deformation;
1	Internal Elastic Lamina deformed < 45°
2	Internal Elastic Lamina deformed > 45°
3	Ruptured Internal Elastic Lamina
4	Ruptured External Elastic Lamina

Fibrin/fibrinoid deposits, thrombus, hemorrhage (Figs. 5, 6 and 10). When any of these forms of blood collections persist, they are considered as delayed healing features [68, 74, 87, 97, 103, 104, 116, 133, 252, 295]. Their presence should be noted and quantified; a semi-quantitative score has been proposed to standardize the measurements [108], Table 4.

Endothelialization (Figs. 11 and 12). Endothelialization should be recorded as absent, partial, or complete in all sections. Semiquantitative analysis can be performed and presented as the percentage of circumference covered by endothelium from 1 to 3 (1, <25%; 2, 25% to 75%; 3, >75%) [108]. The time of complete re-endothelialization should be estimated. Some confusing terminology can be detected in the literature as regarding to “strut tissue coverage” [205, 296-299]. This is particularly relevant in the analysis of early stages of vessel healing after stent implantation because is very common to observe fibrin or different inflammatory cells other than endothelial cells. This issue will be discussed later herein.

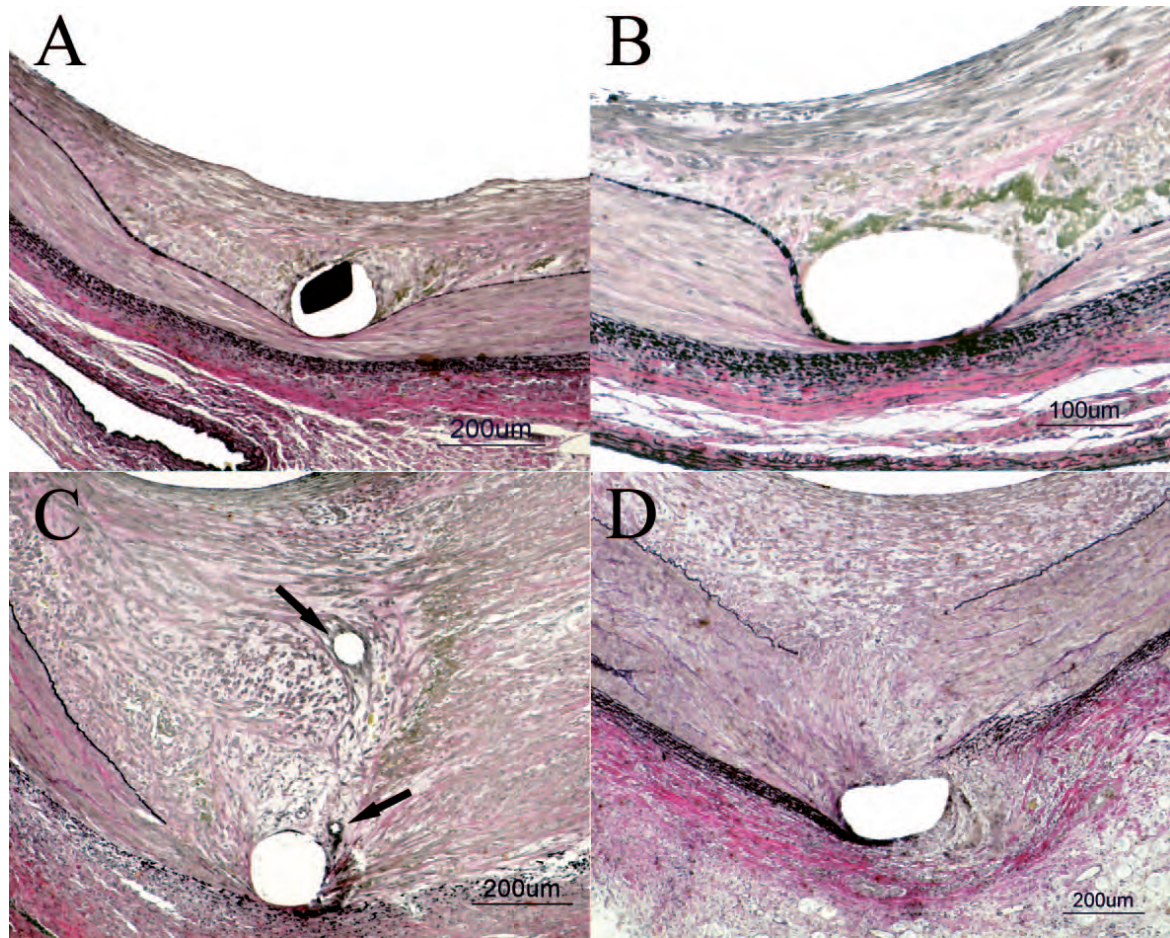
Angiogenesis, (Fig. 9), Panel C. Angiogenesis may also be recorded (value 0 to 3) and detailed in the adventitia, media, and neointima. Alternatively, a more quantitative parametric value can be reported such as the number and size of vessels per unit area or the number of cells expressing VEGF [300, 301].

Stent Apposition and Media Assessment, (Figs. 5 and 6). Other data should include stent strut apposition to the vessel wall (proportion of struts in contact). The description should also include adjacent tissue, including medial thinning, loss of cellularity, and hyalinization [33]. As previously described, medial necrosis could appear in the exam of the samples of stented arteries [44, 67, 68, 87, 279]. It symbolizes the highest injury that a DES can induce to the vessel, usually a toxic reaction to the drug.

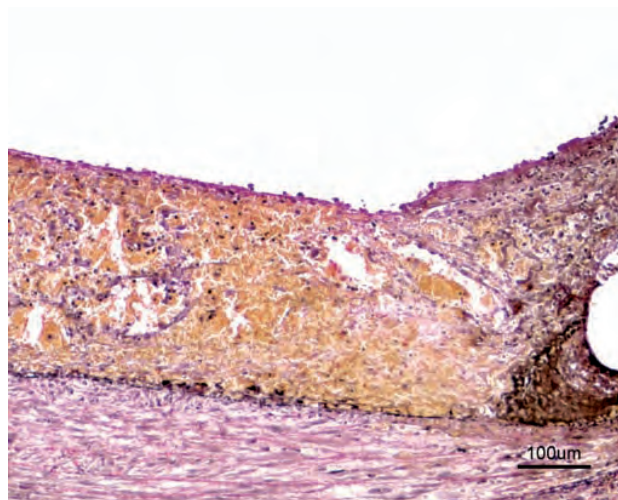
Adventitia. We must pay attention not only the inner layers of the vessel looking for clues on safety problems, but also to the adventitia. Studies have shown that coronary atherosclerosis and neointima formation are associated with increased numbers of vasa vasorum, both in the adventitia and in the plaque itself [302, 303]. Different methods have been developed to characterize the distribution and measure the density of vasa vasorum [303-306]. Another distinctive feature that can be observed in the depth of the artery is peristrut inflammation and granuloma [63, 66-68]. Granulomata may occur regularly in stent studies. Exclusion from analysis of vessels containing granuloma is permissible as its significance is still unclear, but the count of such vessels should be noted, and should typically account for less than 10% of vessels in preclinical studies [33].

Quantitative Histomorphometry. Histomorphometry of samples is essential for therapeutic evaluation. Measurements at all sections should include medial area, area within the IEL area, area within the external elastic lamina (EEL area), lumen area, and stent area (area within the stent itself). The main efficacy parameters i.e. neointimal area and thickness, can be obtained from the cited areas. But some safety details can also be measured. Separation of the stent struts from the IEL (radial gap), as a surrogate of underlying necrosis, should be measured and reported. Remodeling should be calculated for the midstent region: (EEL area/EEL area proximal reference). This variable is of particular interest as previous data point towards potential toxic responses to DES appearing as late positive remodeling of the stented vessel [68, 116, 122, 305].

Myocardial Histopathology. Histopathology from the myocardium directly supplied by all the stented arteries should be analyzed with special attention to the presence of myocardial infarcts. Toxic or hypersensitivity reactions could also appear in the myocardium as a consequence of



**Fig. (9).** Histologic image of swine coronary artery, 28 days after DES implantation. Verhoeff–Van Gieson stain. Different levels of vascular injury: **Panel A**, Injury score 1 (both by Schwartz [25] and Gunn [291] scores). **Panel B**, Injury score 1 (Schwartz), 2 (Gunn); note the marked angle of deformation of the internal elastic lamina. **Panel C**, Injury score 2 (Schwartz), 3 (Gunn); note the angiogenesis inside the neointima, small vessels marked with arrows. **Panel D**, Injury score 3 (Schwartz), 4 (Gunn); note the deep injury with ruptured external elastic lamina and adventitial reaction.



**Fig. (10).** Histologic image of swine coronary artery, 28 days after DES implantation. Intramural hemorrhage and incomplete re-endothelialization. Verhoeff–Van Gieson stain.

**Table 3a. Inflammation Score as Proposed by Hofma *et al.* [214]**

0	Non- existent inflammatory response
1	Inflammatory infiltrates in the adventitia
2	Diffuse, clearly recognizable inflammatory infiltrates in the adventitia
3	Severe, often granulomatous, inflammatory response in the adventitia, sometimes extending to the intima.

**Table 3b. Inflammation Score as Proposed by Kornowski *et al.* [293]**

0	No inflammatory cells surrounding the strut
1	Light, non-circumferential lymphohistiocytic infiltrate surrounding the strut
2	Localized, moderate to dense cellular aggregate surrounding the strut non-circumferentially
3	Circumferential dense lymphohistiocytic cell infiltration of the strut

**Table 3c. Inflammation Score as Proposed by Cheneau *et al.* [100]**

0	No inflammatory cells per strut
1	1 to 10 inflammatory cells per strut
2	11 to 20 inflammatory cells per strut
3	> 20 inflammatory cells per strut.

**Table 3d. Inflammation Score as Proposed by Carter *et al.* [110]**

0	None
1	Scattered inflammatory cells
2	Inflammatory cells encompassing 50% of a strut in at least 25% to 50% of the circumference of the artery
3	Inflammatory cells surrounding a strut in at least 25% to 50% of the circumference of the artery

**Table 4. Fibrin Score [108]**

1	Focal residual fibrin involving any portion of the artery and for moderate fibrin deposition adjacent to the strut involving < 25% of the circumference of the artery
2	Moderate fibrin deposition involving >25% of the circumference of the artery or heavy deposition of fibrin adjacent to and between stent struts involving <25% of the circumference of the artery
3	Heavy deposition of fibrin involving >25% of the circumference of the artery

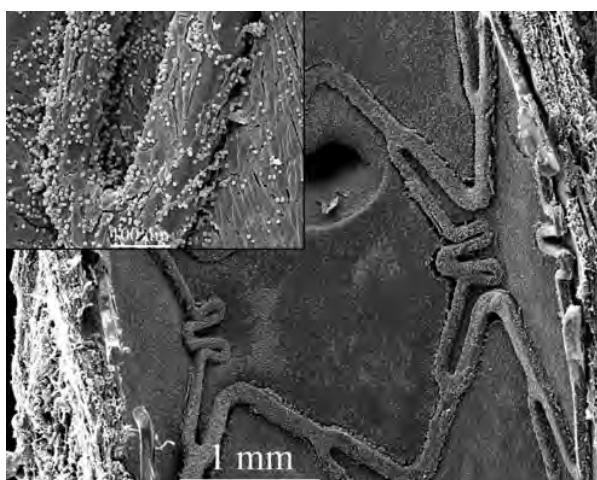
drug elution downstream or biodegradation of any component of the device.

#### **THE ROLE OF IMAGING TECHNIQUES IN THE ASSESSMENT OF VASCULAR HEALING: WYSIWYG (WHAT YOU SEE IS WHAT YOU GET)?**

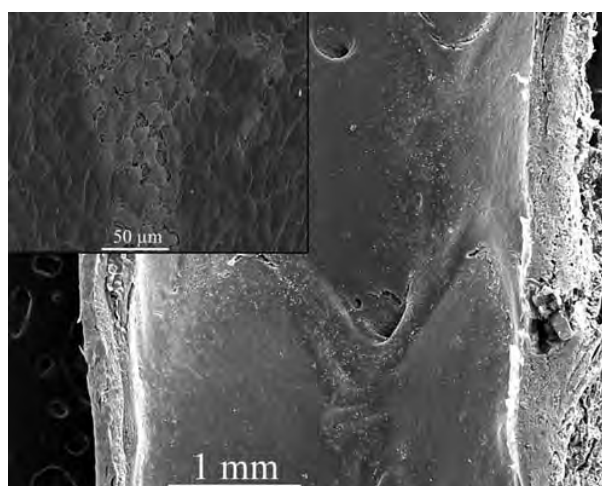
Histopathology remains the gold standard in the assessment of performance of these devices. Stented arteries are usually perfusion fixed *in situ* at a pressure of 100 mmHg with a posterior procedure of immersion fixation to allow a

complete and rapid percolation of the whole artery [29]. The fixed arteries are processed for plastic or epoxy embedding. Samples (from proximal, mid and distal segments) are sectioned on a rotary microtome with a tungsten carbide blade. Proximal and distal of non-stented arterial sections may be paraffin embedded to determine peri-stent impact. Further details on these techniques can be obtained elsewhere [307]. Commonly used stains of the samples include Hematoxylin and Eosin (H&E), elastin and trichrome (usually Masson) stains. Cell proliferation may be measured with methods as

bromodeoxyuridine (BrdU) or Ki-67 antigen immunohistochemistry. More specific cellular responses require specialty stains and immunohistochemical techniques [33] as PECAM-1, VEGF, thrombomodulin or eNOS expression (Fig. 8) is also used to assess. The expression of markers of endothelial maturity can be assessed with confocal microscopy of en face samples (usually stented artery halves, obtained from longitudinal bisection of the whole specimen) [48, 141, 308]. Evans Blue dye is a specific marker of endothelial permeability; its persistence in the vascular wall after intravascular perfusion implies the immaturity of endothelial intercellular junctions [103, 148, 309].



**Fig. (11).** SEM image of swine coronary artery, 3 days after DES implantation. The stent struts appear covered. **Left upper corner:** High magnification image demonstrates that only a few endothelial cells are covering the strut.



**Fig. (12).** SEM image of swine coronary artery, 7 days after DES implantation. Complete endothelial coverage above and between the struts. **Left upper corner:** Endothelial cells characterized as polygonal cells with prominent nuclei exhibiting a cobblestone-like phenotype. However, the intercellular junctions seem loose.

Scanning electron microscopy (SEM) of en face stented artery halves has gained a role in the assessment of endothelialization of DES as it accurately depicts the healing response of the luminal surface of the artery. The fixation, processing and analysis of the samples have been previously described [103]. SEM from 3 or more stents is recommended to assess endothelial recovery [33]. As “strut coverage” (with inflammatory cells [294] or blood components different from endothelial cells) is rather common, an extra effort to characterize the cell population seen over the struts should be made (Fig. 11). High-power fields should be obtained from different segments to ascertain which kinds of cells are present. Endothelial cells are easily recognized as polygonal cells with distinctive limits between them, prominent nuclei and irregular size, highly orientated and exhibiting a cobblestone-like phenotype, and appearing as a confluent flattened monolayer [310] (Fig. 12).

*In vivo* imaging techniques may enhance the evaluation of DES as they could analyze the evolution of vascular healing at different time points in the same animal, obviating the requirement of terminating it to analyze the results. Follow-up angiography is a must in the evaluation of these devices, allowing the measurement of relevant parameters as late loss, one of the main variables in efficacy assessment. It can also disclose serious problems as pre-mortem stent thrombosis. Little information about endothelialization, vascular healing or inflammation can be obtained from the simple angiography. But quantitative coronary angiography (QCA) allows the functional assessment of the whole healing process, analyzing the vasomotor response to different vasodilator drugs. Different endothelium-dependent drugs have been used in preclinical research as serotonin [59, 311, 312], bradykinin [59, 311] or substance P [138, 171]. ACh is one of the most used agonists in human research. Some debate exists over the adequacy of using this drug in the swine model as porcine arteries seems to have limited presence of muscarinic receptors and ACh therefore would not induce sufficient vasodilation [140, 313, 314]. Conversely, other authors have demonstrated significant differences between DES using ACh as the endothelium-dependent vasodilator [170, 315]. As the stented segment of the artery is rigid, no changes in the diameter can occur but both distal and proximal segments to the stent may show significant size changes. At these points, usually separated from the stent at least in 10-15 mm, minimal lumen diameter must be assessed by QCA at basal state, after endothelium-dependent vasodilation and maximal vasodilation with nitroglycerin or nitroprusside. In the same way the epicardial vessels can adjust the diameter in response to different stimuli, the distal microvascular bed (resistance vessels) can also change its size [140, 146, 165, 171]. A simple *in vivo* estimate of the microvasculature vasomotor responses can be obtained determining the TIMI frame count [316]. This index allows easy measurement of the time the radiographic contrast spends in reaching the distal epicardial branches; it has been correlated with more sophisticated measurements of microvascular status, as coronary flow reserve by Doppler [317].

Some different invasive imaging techniques can be performed during the follow-up angiographic study. IVUS examination of the stented arteries is widely used in human clinical studies. It is also a common tool in preclinical re-

search to measure the neointimal formation, being able to offer a volumetric estimation of the whole amount of neointima. Although some attempts of tissue characterization have been conducted (integrated backscatter analysis of the signal, virtual histology), correlations with the histology results are far from perfect [318-321]. So, IVUS is not the best technique to assess the presence of fibrin or thrombus; neither it has spatial resolution enough to ascertain if the stent struts appear covered or uncovered. Some data confirm that IVUS is a valuable tool to assess the process of biodegradation of metallic bioresorbable stents [322] or fully degradable PLA scaffoldings [323]. Angioscopy, another invasive tool, showed better results in terms of thrombus detection and strut coverage assessment [138, 297, 309, 324-327]. Nonetheless, its utility is hampered by the semi-quantitative nature of the results and its inability to discriminate between endothelial cells and other “strut-covering” structures.

The last advance in the *in vivo* assessment of re-endothelialization of stents is OCT. Intravascular OCT (time domain analysis) uses a fiberoptic wire that both emits light and records the reflection while being pulled back along the artery. The axial resolution varies from 12 to 18  $\mu\text{m}$  (150 to 200  $\mu\text{m}$  for IVUS). The lateral resolution is typically 20 to 90  $\mu\text{m}$  as compared with 150 to 300  $\mu\text{m}$  for IVUS. These improvements can be achieved at the cost of small tissue penetration (1-3 mm vs. IVUS 4-8 mm) [328]. OCT has shown a high correlation with histologic-derived values of neointimal thickness or area [329-331] and its superb axial resolution also allows to adequately categorize the stent struts as covered or uncovered [296, 298, 299, 332]. Moreover, OCT has demonstrated its value in the analysis of evolution of BVS resorption both in animals [333] and in humans [323]. But it lacks specificity at classifying the strut coverage as endothelial or non-endothelial lining [330, 331]. The last progress of this technique comes with the analysis of optical frequency-domain imaging (OFDI). It improves the results of conventional OCT systems by 10 times in the frame rate, axial scan/s and faster pullback speed. Other improvements include slightly better axial resolution (10-15  $\mu\text{m}$ ), lateral resolution (20-40  $\mu\text{m}$ ), and tissue penetration (2-3.5 mm). What's more important in the search for the ideal *in vivo* surrogate for histology, OFDI seems to be able to discriminate the features of the actual strut lining [334]. OFDI measurements revealed a significant difference, minimal overlapping and good discriminating value between fibrin- and neointima-covered coronary stent struts (0.39 vs. 0.53,  $p = 0.001$ ; AUC in ROC analysis = 0.86), suggesting that differences in optical density provide information on the type of stent strut coverage [335].

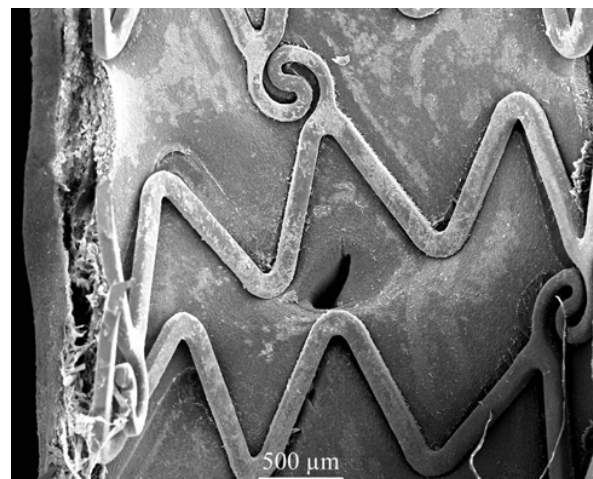
As the imaging techniques evolve and are increasingly used, a word of caution should be noted. Any imaging procedure, just even the simple advance of an angioplasty guidewire, can induce significant damages in the endothelial lining that could persist up to 5 days in the animal model [336]. Its contribution to the final analysis should be taken into account.

#### HOW CAN THE EXPERIMENTS BE IMPROVED? BETTER ANIMAL MODELS

One of the major drawbacks of DES preclinical research remains the significant difference between testing a device in

a healthy, young animal as compared with the atherosclerotic milieu in an older human patient. Different approaches have been tested to overcome this limitation. There are many mouse models for atherosclerosis: the apolipoprotein E-deficient mice (ApoE  $-/-$  mice), the Low-Density Lipoprotein (LDL) receptor-deficient mice (LDLr  $-/-$  mice) or the ApoE\*3Leiden (E3L) transgenic mouse are good examples [28]. Conversely, only a few natural or genetically modified rabbit or swine models of heightened susceptibility to atherosclerosis exist. Watanabe (WHHL) rabbits are a variant of the New Zealand White strain, lacking a receptor to LDL [337]. Both the injury and the response to injury after PCI in this model were almost identical to that seen in humans. The Familial Hypercholesterolemic Rapacz pigs (LDLr  $-/-$ ) bear 3 defined lipoprotein-associated defective allotypes, designated Lpb5, Lpr1, and Lpu1 [338]. These animals suffer from hypercholesterolemia even on a low fat, cholesterol-free diet and develop complicated atherosclerotic plaques that closely resemble advanced atherosclerotic lesions found in humans [339].

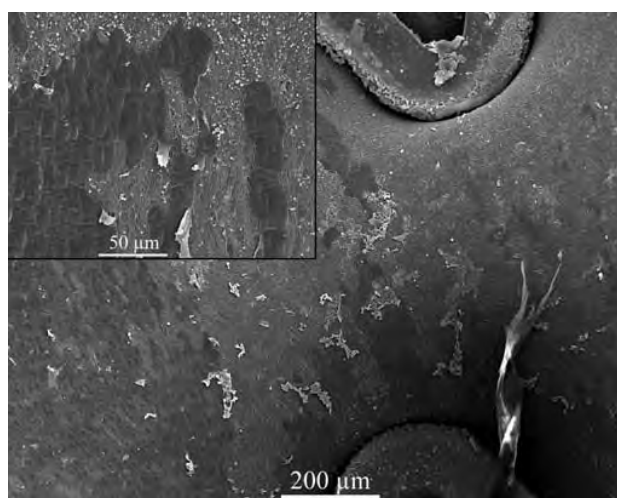
Denudation of endothelium, even in healthy animals, is a common way to promote the appearance of atherosclerotic lesions. An intravascular procedure of endothelial denudation (repeated dilatations with Fogarty balloons or standard PCI balloons) of the iliac arteries is usually performed. Although the simple implantation of a balloon-mounted stent induces a significant endothelial denudation, some areas of endothelial lining can still be observed between the struts (Figs. 13 and 14). Balloon denudation not only removes the endothelium, but also damages the whole artery [340]. It is, then, a commonly used model to test different devices, treatments or to increase knowledge about the underlying mechanisms [48, 53, 54, 205].



**Fig. (13).** SEM image of swine coronary artery, immediately after direct stent implantation. Significant endothelial denudation (clear areas), but some areas of endothelial lining are seen between the struts (dark areas).

Hypercholesterolemia and coronary atherosclerosis are easily induced in rabbits by feeding animals with a  $\geq 0.15\%$  atherogenic (cholesterol dissolved in 6% peanut oil) diet

[52]. Multiple experiments have been conducted using this hypercholesterolemic model [258, 301, 341-345]. To further improve the resemblance between human disease and experimental models some authors use the endothelial denudation with balloon inflation or with air drying [346] in these animals. It is the “double-injury rabbit model” used in many instances [51, 55, 141, 268, 343, 347-351]. Both farm swine and miniswine are also prone to present hypercholesterolemia and atherosclerosis after an adequate diet [59, 352]. Nevertheless, the atherosclerotic swine model is far more time-consuming (2 months are enough to observe atherosclerotic plaques in the rabbit model vs. 9 months in the swine model) and the death rate of these animals is quite high as the coronary atherosclerosis entails the same risks of sudden death than the human counterparts suffer.



**Fig. (14).** SEM image of swine coronary artery, immediately after direct stent implantation. Detail of the denuded endothelium (clear areas) between the struts, while a significant portion of the endothelial lining persists (showing the characteristic cobblestone pattern and prominent nuclei).

Diabetes is a well-known risk factor for atherosclerosis, CAD and in-stent restenosis in humans [8, 9]. Even better second-generation DES for restenosis prevention, as the EES, show a relative failure in diabetic patients [353]. The induction of diabetes in research animals with the injection of alloxan in rabbits [354] or streptozotocin in swine [355-357] is a common procedure to study the influence of this disease in atherosclerosis progression or to better understand the underlying mechanisms [358-361]. However, no published data can be achieved about the use of diabetic rabbit model to test vascular stents and the results of stent implantation in diabetic swine are scarce. Carter *et al.* [362] observed that neointimal thickening and the degree of in-stent stenosis were similar to those of the non-diabetic swine. However, sudden death due to stent thrombosis occurred in 45% of these diabetic animals. More recently, Llano *et al.* [363] have demonstrated that diabetic / hypercholesterolemic pigs show greater differences between PES and BMS both in terms of restenosis and in vascular healing (re-endothelialization and persistent inflammation). The short-

term death rate in this group is <10%, probably reflecting better antiplatelet treatment. Nevertheless, these results remark the concept of high vulnerability of the diseased pigs, rendering them a troublesome model to test coronary devices.

In conclusion, although some promising data about better, more patient-like, animal models may offer relevant information about the actual performance of DES in the clinical scenario they are intended for, the recommended models to carry out the required tests remain the healthy animal models [33].

## NEW DEVELOPMENTS

The acquired knowledge allows the design of new concepts in the DES field. Combined (or dual) stents have been tested searching for the best balance between antiproliferative properties and vascular healing. An example of this approach is the building of a SES (Cypher stent) whose abluminal surface is treated with the same anti-CD34 antibody immobilization process used for the Genous stent. Nakazawa *et al.* [308] demonstrated a better endothelialization rate of this combined stent as compared with SES both at 3 and 14 days. In fact, the endothelialization rate of the combined device at 14 days was not significantly different from the result of Genous stent ( $82 \pm 8$  vs.  $98 \pm 2\%$ ). Our group has reported similar endothelialization results while keeping the antiproliferative effects of a dual DES combining simvastatin + paclitaxel (Irist-Duo<sup>®</sup> stent, Iberhospitex) [263]. Other authors have reported interesting results with dual DES combining a classic antiproliferative drug with antiplatelet agents as triflusal + sirolimus [364, 365] or cilostazol + paclitaxel [366]; or anti-hyperlipidemic drugs as probucol + sirolimus [367].

The role and results of bioabsorbable polymers and polymer-free DES have been discussed above. Currently approved polymer-free and bioabsorbable polymer stents are being used with a high success rate, both in efficacy and safety. The logical further step is to advance towards a “leave nothing behind” politics, the biodegradable stents. Two main concepts constitute the practical application of this idea: metallic and polymeric stents. The magnesium AMS symbolizes the first group. After a well-developed preclinical program [233, 322, 368-371], the results were tested in humans in the PROGRESS AMS study [372] with disappointing results: the need for a new revascularization procedure reached 45% at 12-months and some data pointed out to a lower radial force than expected. Subsequent changes in the structure and composition of the metallic backbone plus the addition of bioresorbable matrix for controlled release of an antiproliferative drug give origin to DREAMS (Drug Eluting Absorbable Metallic Stent) that will be assessed in the BIOSOLVE-I FIM study [233]. Regarding the bioabsorbable polymeric stents, the REVA stent degrades into water, carbon dioxide, and ethanol, leaving iodinated desaminotyrosyl-tyrosine, which is absorbed and excreted from the body [30, 373]. Scarce data can be found in the literature about its preclinical and clinical results [231, 373], but the restenosis rate seems to be high at 4-6 months. Again, a new design, adding a limus drug will be tested searching for better efficacy. The Abbott BVS, with a back-



bone of PLA and a covering matrix of poly D-L lactide that controls the elution of everolimus, has also been tested in animal models [374]. Onuma *et al.* [333] concluded that stent struts that are still discernible by OCT at 2 years in swine coronary arteries are compatible with largely bioresorbed struts, as demonstrated by histological and gel permeation chromatography analysis. At 3 and 4 years, both OCT and histology confirm complete integration of the struts into the arterial wall. This stent has been also tested in human clinical trials demonstrating acceptable results in terms of efficacy (late luminal loss 0.44 mm, quite similar to PES but still far from the 0.11 mm that has demonstrated the EES) [375]. Longer follow up (2 years) has demonstrated that the stent was bioabsorbed, had vasomotion restored and restenosis prevented, without evidence of LST [323]. An intriguing observation has been disclosed: late luminal enlargement due to plaque reduction without vessel remodeling. A second-generation device, BVS Revision 1.1, uses the same polymer with a change in the processing procedure that increases its radial force, which allows a promising late luminal loss value of 0.19 mm [30]. Nonetheless, preclinical data on safety of all these novel devices should be extended to avoid past problems.

Notwithstanding that only DES are the target of this review, we conclude with a brief appraisal of drug eluting balloon (DEB) technology. As an alternative method of local deliver of antiproliferative drugs, mainly paclitaxel, different DEBs based on distinct drug vehicles have demonstrated its efficacy in preclinical research [376-380]. This good result was translated into high efficacy in the treatment of an adverse clinical condition: in-stent restenosis treatment [381]. However, not all the commercially available systems offer the same results neither in the preclinical field [382] nor in the human tests [383]. Furthermore, some worrying data about a marked delay in the re-endothelialization of the treated vessel [382] and abnormal vasomotor responses [315] parallels the DES story.

## CONCLUDING REMARKS

The development of DES has virtually abolished the incidence of restenosis but some worrying signs of delayed vascular healing may appear, as late stent thrombosis. Preclinical research, previously intended to test the efficacy of these new devices, should now focus on the safety aspects to avoid unforeseen clinical complications. The preferred animal models of stent implantation are swine coronary arteries and rabbit iliac arteries, although diseased animal (especially hyperlipidemic rabbits) models could better mimic the human clinical scenario. The vascular healing processes and stages in these animal models and in humans are quite similar, although the time courses are different. Prolonged (up to 1 year) follow-up periods in the preclinical experiments can help in evaluating the appearance of late complications, as LST, new-onset atherosclerosis or late catch-up phenomenon. Delayed re-endothelialization of the stented vessel is a common finding in DES and has been related to adverse clinical outcomes. The recovery not only of the endothelial lining but also of its normal function is relevant for adequate healing. The 3 components of DES, metallic backbone, carrier and drug, have significant impact on the final performance, both in terms of neointimal proliferation and vascular

healing. Histopathology analysis of the stented arteries should be systemically performed, measuring and characterizing arterial injury, inflammation, endothelialization, fibrin deposition and other variables that can be clues of delayed healing. Although histopathology remains the gold standard in the assessment of the vessel response to the stent, different imaging techniques may offer valuable information on the healing process at intermediate time points. Many developments as dual stents or fully bioresorbable scaffoldings are being tested and results are expected in the near future.

Rewording one of the statements published in the last expert consensus document [33] we can conclude that if vascular healing appears to be adequate within 28 days of stent placement in animal models, this finding does not necessarily entail the same favorable human behavior. However, if the animal model suggests abnormal or delayed healing response, this observation suggests but does not prove potential problems in the human setting. It is important to reach a consensus about the preclinical research models not only between different groups of investigators, but also with the regulatory agencies such as FDA, EMEA or national agencies.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflicts of interest.

## ACKNOWLEDGEMENTS OF FUNDING

Declared none.

## REFERENCES

- [1] Allender S, Scarborough P, Peto V, *et al.* European cardiovascular disease statistics [Online]. Access date: 2011 Jun 06. Available from: <http://www.ehnheart.org/component/downloads/downloads/683.html>
- [2] Rayner M, Allender S, Scarborough P. Cardiovascular disease in Europe. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2009; 16 (Suppl 2): S43-7.
- [3] Ryan J, Linde-Zwirble W, Engelhart L, Cooper L, Cohen DJ. Temporal Changes in Coronary Revascularization Procedures, Outcomes, and Costs in the Bare-Metal Stent and Drug-Eluting Stent Eras: Results From the US Medicare Program. *Circulation* 2009; 119: 952-61.
- [4] Epstein AJ, Polsky D, Yang F, Yang L, Groeneveld PW. Coronary revascularization trends in the United States, 2001-2008. *JAMA* 2011; 305: 1769-76.
- [5] Dotter CT, Judkins MP. Transluminal Treatment of Arteriosclerotic Obstruction. Description of a New Technic and a Preliminary Report of Its Application. *Circulation* 1964; 30: 654-70.
- [6] Gruntzig A. Transluminal dilatation of coronary-artery stenosis. *Lancet* 1978; 1: 263.
- [7] Sigwart U, Puel J, Mirkovitch V, Joffre F, Kappenberger L. Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty. *N Engl J Med* 1987; 316: 701-6.
- [8] Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F, *et al.* A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group. *N Engl J Med* 1994; 331: 489-95.
- [9] Fischman DL, Leon MB, Baim DS, *et al.* A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators. *N Engl J Med* 1994; 331: 496-501.
- [10] Nordmann AJ, Briel M, Bucher HC. Mortality in randomized controlled trials comparing drug-eluting vs. bare metal stents in coronary artery disease: a meta-analysis. *Eur Heart J* 2006; 27: 2784-814.

- [11] Pfisterer M, Brunner-La Rocca HP, Buser PT, *et al.* Late clinical events after clopidogrel discontinuation may limit the benefit of drug-eluting stents: an observational study of drug-eluting vs. bare-metal stents. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: 2584-91.
- [12] Camenzind E, Steg PG, Wijns W. Stent thrombosis late after implantation of first-generation drug-eluting stents: a cause for concern. *Circulation* 2007; 115: 1440-55.
- [13] Lagerqvist B, James SK, Stenestrand U, Lindback J, Nilsson T, Wallentin L. Long-term outcomes with drug-eluting stents vs. bare-metal stents in Sweden. *N Engl J Med* 2007; 356: 1009-19.
- [14] Serruys PW, Strauss BH, Beatt KJ, *et al.* Angiographic follow-up after placement of a self-expanding coronary-artery stent. *N Engl J Med* 1991; 324: 13-7.
- [15] Colombo A, Hall P, Nakamura S, *et al.* Intracoronary stenting without anticoagulation accomplished with intravascular ultrasound guidance. *Circulation* 1995; 91: 1676-88.
- [16] Perez de Prado A, Garcia EJ, Abeytua M, *et al.* [Coronary endoprosthesis (stents) implanted without coumadin administration: one year's experience]. *Rev Esp Cardiol* 1996; 49: 439-43.
- [17] Cutlip DE, Windecker S, Mehran R, *et al.* Clinical end points in coronary stent trials: a case for standardized definitions. *Circulation* 2007; 115: 2344-51.
- [18] Kastrati A, Mehilli J, Pache J, *et al.* Analysis of 14 trials comparing sirolimus-eluting stents with bare-metal stents. *N Engl J Med* 2007; 356: 1030-9.
- [19] Mauri L, Hsieh WH, Massaro JM, Ho KK, D'Agostino R, Cutlip DE. Stent thrombosis in randomized clinical trials of drug-eluting stents. *N Engl J Med* 2007; 356: 1020-9.
- [20] Spaulding C, Daemen J, Boersma E, Cutlip DE, Serruys PW. A pooled analysis of data comparing sirolimus-eluting stents with bare-metal stents. *N Engl J Med* 2007; 356: 989-97.
- [21] Stone GW, Moses JW, Ellis SG, *et al.* Safety and efficacy of sirolimus- and paclitaxel-eluting coronary stents. *N Engl J Med* 2007; 356: 998-1008.
- [22] Draft Guidance for Industry: Coronary Drug-Eluting Stents—Nonclinical and Clinical Studies [Online]. Accessed: 2011 Jun 06. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM072196.pdf>
- [23] Guideline on the development of medicinal substances contained in drug-eluting (medicinal substance-eluting) coronary stents [Online]. Accessed: 2011 Jun 06. Available from: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500003275.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003275.pdf)
- [24] Schwartz RS, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vliestra RE, Holmes DR. Restenosis after balloon angioplasty. A practical proliferative model in porcine coronary arteries. *Circulation* 1990; 82: 2190-200.
- [25] Schwartz RS, Huber KC, Murphy JG, *et al.* Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model. *J Am Coll Cardiol* 1992; 19: 267-74.
- [26] Hehrlein C, Zimmermann M, Pill J, Metz J, Kubler W, von Hodenberg E. The role of elastic recoil after balloon angioplasty of rabbit arteries and its prevention by stent implantation. *Eur Heart J* 1994; 15: 277-80.
- [27] Rogers C, Edelman ER. Endovascular stent design dictates experimental restenosis and thrombosis. *Circulation* 1995; 91: 2995-3001.
- [28] Jeremy JY, Thomas AC. Animal models for studying neointima formation. *Curr Vasc Pharmacol* 2010; 8: 198-219.
- [29] Perkins LE. Preclinical models of restenosis and their application in the evaluation of drug-eluting stent systems. *Vet Pathol* 2010; 47: 58-76.
- [30] Garg S, Serruys PW. Coronary stents: looking forward. *J Am Coll Cardiol* 2010; 56: S43-78.
- [31] Garg S, Serruys PW. Coronary stents: current status. *J Am Coll Cardiol* 2010; 56: S1-42.
- [32] Schwartz RS, Edelman ER, Carter A, *et al.* Drug-eluting stents in preclinical studies: recommended evaluation from a consensus group. *Circulation* 2002; 106: 1867-73.
- [33] Schwartz RS, Edelman E, Virmani R, *et al.* Drug-Eluting Stents in Preclinical Studies: Updated Consensus Recommendations for Preclinical Evaluation. *Circ Cardiovasc Interv* 2008; 1: 143-53.
- [34] Indolfi C, Esposito G, Stabile E, *et al.* A new rat model of small vessel stenting. *Basic Res Cardiol* 2000; 95: 179-85.
- [35] Finn AV, Gold HK, Tang A, *et al.* A novel rat model of carotid artery stenting for the understanding of restenosis in metabolic diseases. *J Vasc Res* 2002; 39: 414-25.
- [36] Roks AJ, Henning RH, van Boven AJ, Tio RA, van Gilst WH. Rat abdominal aortic stenting: a simple model displaying in-stent restenosis. *Am J Cardiol* 2002; 89: 1149-50.
- [37] Langeveld B, Roks AJ, Tio RA, *et al.* Rat abdominal aorta stenting: a new and reliable small animal model for in-stent restenosis. *J Vasc Res* 2004; 41: 377-86.
- [38] Hermans WR, Rensing BJ, Foley DP, *et al.* Therapeutic dissection after successful coronary balloon angioplasty: no influence on restenosis or on clinical outcome in 693 patients. The MERCATOR Study Group (Multicenter European Research Trial with Cilazapril after Angioplasty to prevent Transluminal Coronary Obstruction and Restenosis). *J Am Coll Cardiol* 1992; 20: 767-80.
- [39] Lafont A, Faxon D. Why do animal models of post-angioplasty restenosis sometimes poorly predict the outcome of clinical trials? *Cardiovasc Res* 1998; 39: 50-9.
- [40] Jackson CL. Animal models of restenosis. *Trends Cardiovasc Med* 1994; 4: 122-30.
- [41] Narayanaswamy M, Wright KC, Kandarpa K. Animal models for atherosclerosis, restenosis, and endovascular graft research. *J Vasc Interv Radiol* 2000; 11: 5-17.
- [42] Muller DW, Ellis SG, Topol EJ. Experimental models of coronary artery restenosis. *J Am Coll Cardiol* 1992; 19: 418-32.
- [43] Van Belle E, Tio FO, Couffinhal T, Maillard L, Passeri J, Isner JM. Stent endothelialization. Time course, impact of local catheter delivery, feasibility of recombinant protein administration, and response to cytokine expedition. *Circulation* 1997; 95: 438-48.
- [44] Virmani R, Kolodgie FD, Farb A, Lafont A. Drug eluting stents: are human and animal studies comparable? *Heart* 2003; 89: 133-8.
- [45] Bayes-Genis A, Kantor B, Keelan PC, *et al.* Restenosis and Hyperplasia: Animal Models. *Curr Interv Cardiol Rep* 2000; 2: 303-8.
- [46] Asada Y, Kisanuki A, Tsuneyoshi A, Marutsuka K, Hatakeyama K, Sumiyoshi A. Effects of inflation pressure of balloon catheter on vascular injuries and subsequent development of intimal hyperplasia in rabbit aorta. *Atherosclerosis* 1996; 121: 45-53.
- [47] Perkins L, Quee S, Coleman L, *et al.* Three *in vivo* preclinical models to assess re-endothelialization following coronary stent implantation. *Am J Cardiol* 2007; 100: S176.
- [48] Joner M, Nakazawa G, Finn AV, *et al.* Endothelial cell recovery between comparator polymer-based drug-eluting stents. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52: 333-42.
- [49] Nakazawa G, Finn AV, Ladich E, *et al.* Drug-eluting stent safety: findings from preclinical studies. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2008; 6: 1379-91.
- [50] Hehrlein C, Gollan C, Donges K, *et al.* Low-dose radioactive endovascular stents prevent smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia in rabbits. *Circulation* 1995; 92: 1570-5.
- [51] Verin V, Popowski Y, Urban P, *et al.* Intra-arterial beta irradiation prevents neointimal hyperplasia in a hypercholesterolemic rabbit restenosis model. *Circulation* 1995; 92: 2284-90.
- [52] Kolodgie FD, Katocs AS, Jr., Largis EE, *et al.* Hypercholesterolemia in the rabbit induced by feeding graded amounts of low-level cholesterol. Methodological considerations regarding individual variability in response to dietary cholesterol and development of lesion type. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 1454-64.
- [53] Rogers C, Edelman ER, Simon DI. A mAb to the beta2-leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) reduces intimal thickening after angioplasty or stent implantation in rabbits. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 10134-9.
- [54] Drachman DE, Edelman ER, Seifert P, *et al.* Neointimal thickening after stent delivery of paclitaxel: change in composition and arrest of growth over six months. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 2325-32.
- [55] Danenberg HD, Welt FG, Walker M, 3rd, Seifert P, Toegel GS, Edelman ER. Systemic inflammation induced by lipopolysaccharide increases neointimal formation after balloon and stent injury in rabbits. *Circulation* 2002; 105: 2917-22.
- [56] John MC, Wessely R, Kastrati A, *et al.* Differential healing responses in polymer- and non-polymer-based sirolimus-eluting stents. *JACC Cardiovasc Interv* 2008; 1: 535-44.
- [57] Finn AV, John M, Nakazawa G, *et al.* Differential healing after sirolimus, paclitaxel, and bare metal stent placement in combination with peroxisome proliferator-activator receptor gamma agonists: requirement for mTOR/Akt2 in PPARgamma activation. *Circ Res* 2009; 105: 1003-12.

- [58] Gardner TJ, Johnson DL. Cardiovascular system. In: Swindle MM, Adams RJ, editors. *Experimental Surgery and Physiology: Induced Animal Models of Human Disease*. Baltimore, MD: William & Wilkins; 1988. p. 74-124.
- [59] Shimokawa H, Vanhoutte PM. Impaired endothelium-dependent relaxation to aggregating platelets and related vasoactive substances in porcine coronary arteries in hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Circ Res* 1989; 64: 900-14.
- [60] Goodman SL. Sheep, pig, and human platelet-material interactions with model cardiovascular biomaterials. *J Biomed Mater Res* 1999; 45: 240-50.
- [61] Cromeens DM, Rodgers GP, Minor ST. Warfarin sodium for anticoagulation of atherosclerotic miniature swine. *J Invest Surg* 1990; 3: 141-5.
- [62] van Beusekom HMM, van der Giessen WJ, Wagenvoort CA, van Ingen Schenau DS, Huijts RA, Serruys PW. Histological features of a polymer endovascular prosthesis after transcatheter implantation in porcine arteries. *Cardiovasc Pathol* 1993; 2: 41-51.
- [63] Kornowski R, Hong MK, Virmani R, Jones R, Vodovotz Y, Leon MB. Granulomatous 'foreign body reactions' contribute to exaggerated in-stent restenosis. *Coron Artery Dis* 1999; 10: 9-14.
- [64] van der Giessen WJ, Lincoff AM, Schwartz RS, et al. Marked inflammatory sequelae to implantation of biodegradable and non-biodegradable polymers in porcine coronary arteries. *Circulation* 1996; 94: 1690-7.
- [65] Yorozyua M, Suzuki H, Iso Y, et al. Comparison of the morphological changes of restenosis after the implantation of various types of stents in a swine model. *Coron Artery Dis* 2002; 13: 305-12.
- [66] Virmani R, Kolodgie FD, Farb A. Drug-eluting stents: are they really safe? *Am Heart Hosp J* 2004; 2: 85-8.
- [67] Nakazawa G, Ladich E, Finn AV, Virmani R. Pathophysiology of vascular healing and stent mediated arterial injury. *EuroIntervention* 2008; 4 (Suppl C): C7-10.
- [68] Wilson GJ, Nakazawa G, Schwartz RS, et al. Comparison of Inflammatory Response After Implantation of Sirolimus- and Paclitaxel-Eluting Stents in Porcine Coronary Arteries. *Circulation* 2009; 120: 141-9.
- [69] Grewe PH, Deneke T, Machraoui A, Barmeyer J, Muller KM. Acute and chronic tissue response to coronary stent implantation: pathologic findings in human specimen. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 157-63.
- [70] Finn AV, Nakazawa G, Joner M, et al. Vascular responses to drug eluting stents: importance of delayed healing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 1500-10.
- [71] Nakazawa G, Finn AV, Joner M, et al. Delayed Arterial Healing and Increased Late Stent Thrombosis at Culprit Sites After Drug-Eluting Stent Placement for Acute Myocardial Infarction Patients: An Autopsy Study. *Circulation* 2008; 118: 1138-45.
- [72] Virmani R, Guagliumi G, Farb A, et al. Localized hypersensitivity and late coronary thrombosis secondary to a sirolimus-eluting stent: should we be cautious? *Circulation* 2004; 109: 701-5.
- [73] Nebeker JR, Virmani R, Bennett CL, et al. Hypersensitivity cases associated with drug-eluting coronary stents: a review of available cases from the Research on Adverse Drug Events and Reports (RADAR) project. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47: 175-81.
- [74] Finn AV, Kolodgie FD, Harnek J, et al. Differential response of delayed healing and persistent inflammation at sites of overlapping sirolimus- or paclitaxel-eluting stents. *Circulation* 2005; 112: 270-8.
- [75] Karges HE, Funk KA, Ronneberger H. Activity of coagulation and fibrinolysis parameters in animals. *Arzneimittelforschung* 1994; 44: 793-7.
- [76] Touchard AG, Schwartz RS. Preclinical restenosis models: challenges and successes. *Toxicol Pathol* 2006; 34: 11-8.
- [77] Carter AJ, Laird JR, Farb A, Kufs W, Wortham DC, Virmani R. Morphologic characteristics of lesion formation and time course of smooth muscle cell proliferation in a porcine proliferative restenosis model. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24: 1398-405.
- [78] Farb A, Sangiorgi G, Carter AJ, et al. Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans. *Circulation* 1999; 99: 44-52.
- [79] Taylor AJ, Gorman PD, Kenwood B, Hudak C, Tashko G, Virmani R. A comparison of four stent designs on arterial injury, cellular proliferation, neointima formation, and arterial dimensions in an experimental porcine model. *Catheter Cardiovasc Interv* 2001; 53: 420-5.
- [80] Schwartz RS, Chronos NA, Virmani R. Preclinical restenosis models and drug-eluting stents: still important, still much to learn. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 1373-85.
- [81] Yao F, Visovatti S, Johnson CS, et al. Age and growth factors in porcine full-thickness wound healing. *Wound Repair Regen* 2001; 9: 371-7.
- [82] van Beusekom HM, van der Giessen WJ, van Suylen R, Bos E, Bosman FT, Serruys PW. Histology after stenting of human saphenous vein bypass grafts: observations from surgically excised grafts 3 to 320 days after stent implantation. *J Am Coll Cardiol* 1993; 21: 45-54.
- [83] van der Giessen WJ, Serruys PW, van Beusekom HM, et al. Coronary stenting with a new, radiopaque, balloon-expandable endoprosthesis in pigs. *Circulation* 1991; 83: 1788-98.
- [84] Sangiorgi G, Arbustini E, Lanzarini P, et al. Non-biodegradable expanded polytetrafluoroethylene-covered stent implantation in porcine peripheral arteries: histologic evaluation of vascular wall response compared with uncoated stents. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2001; 24: 260-70.
- [85] Bailey S, Seifert P, Huijbregtse B, Poff B. Early healing following TAXUS stent implantation: endothelial cell coverage is similar in overlapped TAXUS Express stents and bare metal stents in swine coronary arteries. *Cardiovasc Revasc Med* 2006; 7: 90-2.
- [86] Pérez de Prado A, Pérez-Martínez C, Cuellas-Ramón C, et al. Time course of reendothelialization of stents in a normal coronary Swine model: characterization and quantification. *Vet Pathol* 2011; 48: 1109-17.
- [87] Farb A, Heller PF, Shroff S, et al. Pathological analysis of local delivery of paclitaxel via a polymer-coated stent. *Circulation* 2001; 104: 473-9.
- [88] Farb A, Kolodgie FD, Hwang JY, et al. Extracellular matrix changes in stented human coronary arteries. *Circulation* 2004; 110: 940-7.
- [89] Wiedermann JG, Marboe C, Amols H, Schwartz A, Weinberger J. Intracoronary irradiation markedly reduces restenosis after balloon angioplasty in a porcine model. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23: 1491-8.
- [90] Waksman R, Robinson KA, Crocker IR, Gravanis MB, Cipolla GD, King SB, 3rd. Endovascular low-dose irradiation inhibits neointima formation after coronary artery balloon injury in swine. A possible role for radiation therapy in restenosis prevention. *Circulation* 1995; 91: 1533-9.
- [91] Waksman R, Robinson KA, Crocker IR, et al. Intracoronary radiation before stent implantation inhibits neointima formation in stented porcine coronary arteries. *Circulation* 1995; 92: 1383-6.
- [92] Waksman R, Robinson KA, Crocker IR, et al. Intracoronary low-dose beta-irradiation inhibits neointima formation after coronary artery balloon injury in the swine restenosis model. *Circulation* 1995; 92: 3025-31.
- [93] Wiedermann JG, Marboe C, Amols H, Schwartz A, Weinberger J. Intracoronary irradiation markedly reduces neointimal proliferation after balloon angioplasty in swine: persistent benefit at 6-month follow-up. *J Am Coll Cardiol* 1995; 25: 1451-6.
- [94] Carter AJ, Laird JR. Experimental results with endovascular irradiation via a radioactive stent. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996; 36: 797-803.
- [95] Fischell TA, Carter AJ, Laird JR. The beta-particle-emitting radioisotope stent (isostent): animal studies and planned clinical trials. *Am J Cardiol* 1996; 78: 45-50.
- [96] Carter AJ, Scott D, Bailey L, Hoopes T, Jones R, Virmani R. Dose-response effects of 32P radioactive stents in an atherosclerotic porcine coronary model. *Circulation* 1999; 100: 1548-54.
- [97] Farb A, Shroff S, John M, Sweet W, Virmani R. Late arterial responses (6 and 12 months) after (32)P beta-emitting stent placement: sustained intimal suppression with incomplete healing. *Circulation* 2001; 103: 1912-9.
- [98] Cheneau E. Absence of full-stent endothelialization 3 months after gamma radiation. *Cardiovasc Radiat Med* 2001; 2: 263.
- [99] Coussement PK, Stella P, Vanbilloen H, et al. Intracoronary beta-radiation of *de novo* coronary lesions using a (186)Re liquid-filled balloon system: six-month results from a clinical feasibility study. *Catheter Cardiovasc Interv* 2002; 55: 28-36.
- [100] Cheneau E, John MC, Fournadjiev J, et al. Time course of stent endothelialization after intravascular radiation therapy in rabbit iliac arteries. *Circulation* 2003; 107: 2153-8.

## Preclinical Safety Evaluation of Stents

## Current Vascular Pharmacology, 2013, Vol. 11, No. 1 93

- [101] Kay IP, Wardeh AJ, Kozuma K, *et al.* Radioactive stents delay but do not prevent in-stent neointimal hyperplasia. *Circulation* 2001; 103: 14-7.
- [102] Carter AJ, Laird JR, Bailey LR, *et al.* Effects of endovascular radiation from a beta-particle-emitting stent in a porcine coronary restenosis model. A dose-response study. *Circulation* 1996; 94: 2364-8.
- [103] Farb A, Tang AL, Shroff S, Sweet W, Virmani R. Neointimal responses 3 months after (32)P beta-emitting stent placement. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 48: 889-98.
- [104] Kaluza GL, Raizner AE, Mazur W, *et al.* Long-term effects of intracoronary beta-radiation in balloon- and stent-injured porcine coronary arteries. *Circulation* 2001; 103: 2108-13.
- [105] Leon MB, Teirstein PS, Moses JW, *et al.* Localized intracoronary gamma-radiation therapy to inhibit the recurrence of restenosis after stenting. *N Engl J Med* 2001; 344: 250-6.
- [106] Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, *et al.* A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med* 2002; 346: 1773-80.
- [107] Gallo R, Padurean A, Jayaraman T, *et al.* Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by targeting regulators of the cell cycle. *Circulation* 1999; 99: 2164-70.
- [108] Suzuki T, Kopia G, Hayashi S, *et al.* Stent-based delivery of sirolimus reduces neointimal formation in a porcine coronary model. *Circulation* 2001; 104: 1188-93.
- [109] Klugherz BD, Llanos G, Lieuallen W, *et al.* Twenty-eight-day efficacy and pharmacokinetics of the sirolimus-eluting stent. *Coron Artery Dis* 2002; 13: 183-8.
- [110] Carter AJ, Aggarwal M, Kopia GA, *et al.* Long-term effects of polymer-based, slow-release, sirolimus-eluting stents in a porcine coronary model. *Cardiovasc Res* 2004; 63: 617-24.
- [111] Kerner A, Gruberg L, Kapeliovich M, Grenadier E. Late stent thrombosis after implantation of a sirolimus-eluting stent. *Catheter Cardiovasc Interv* 2003; 60: 505-8.
- [112] McFadden EP, Stabile E, Regar E, *et al.* Late thrombosis in drug-eluting coronary stents after discontinuation of antiplatelet therapy. *Lancet* 2004; 364: 1519-21.
- [113] Grube E, Silber S, Hauptmann KE, *et al.* TAXUS I: six- and twelve-month results from a randomized, double-blind trial on a slow-release paclitaxel-eluting stent for *de novo* coronary lesions. *Circulation* 2003; 107: 38-42.
- [114] Herdeg C, Oberhoff M, Baumbach A, *et al.* Local paclitaxel delivery for the prevention of restenosis: biological effects and efficacy *in vivo*. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 1969-76.
- [115] Cilingiroglu M, Elliott J, Patel D, *et al.* Long-term effects of novel biolimus eluting DEVAX AXCESS plus nitinol self-expanding stent in a porcine coronary model. *Catheter Cardiovasc Interv* 2006; 68: 271-9.
- [116] Virmani R, Liistro F, Stankovic G, *et al.* Mechanism of late in-stent restenosis after implantation of a paclitaxel derivate-eluting polymer stent system in humans. *Circulation* 2002; 106: 2649-51.
- [117] Cosgrave J, Qasim A, Latif A, Aranzulla TC, Colombo A. Very late restenosis after paclitaxel-eluting stent implantation. *Ann Intern Med* 2007; 147: 885-7.
- [118] Lopez-Palop R, Carrillo P, Frutos A, Cordero A. Very late restenosis of a paclitaxel-eluting stent implanted to treat previous in-stent restenosis of a bare metal stent. *Rev Esp Cardiol* 2010; 63: 1101-3.
- [119] Wessely R, Kastrati A, Schomig A. Late restenosis in patients receiving a polymer-coated sirolimus-eluting stent. *Ann Intern Med* 2005; 143: 392-4.
- [120] Cosgrave J, Corbett SJ, Melzi G, *et al.* Late restenosis following sirolimus-eluting stent implantation. *Am J Cardiol* 2007; 100: 41-4.
- [121] Kuriyama N, Kobayashi Y, Nakama T, *et al.* Late restenosis following sirolimus-eluting stent implantation. *JACC Cardiovasc Interv* 2011; 4: 123-8.
- [122] Aoki J, Colombo A, Dudek D, *et al.* Persistent remodeling and neointimal suppression 2 years after polymer-based, paclitaxel-eluting stent implantation: insights from serial intravascular ultrasound analysis in the TAXUS II study. *Circulation* 2005; 112: 3876-83.
- [123] Park DW, Hong MK, Mintz GS, *et al.* Two-year follow-up of the quantitative angiographic and volumetric intravascular ultrasound analysis after non-polymeric paclitaxel-eluting stent implantation: late "catch-up" phenomenon from ASPECT Study. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: 2432-9.
- [124] Byrne RA, Iijima R, Mehilli J, *et al.* Durability of antirestenotic efficacy in drug-eluting stents with and without permanent polymer. *JACC Cardiovasc Interv* 2009; 2: 291-9.
- [125] Ramcharitar S, Garcia-Garcia HM, Nakazawa G, *et al.* Ultrasonic and pathological evidence of a neo-intimal plaque rupture in patients with bare metal stents. *EuroIntervention* 2007; 3: 290-1.
- [126] Takano M, Yamamoto M, Inami S, *et al.* Appearance of lipid-laden intima and neovascularization after implantation of bare-metal stents. *J Am Coll Cardiol* 2009; 55: 26-32.
- [127] Kang SJ, Mintz GS, Akasaka T, *et al.* Optical coherence tomographic analysis of in-stent neoatherosclerosis after drug-eluting stent implantation. *Circulation* 2011; 123: 2954-63.
- [128] Higo T, Ueda Y, Oyabu J, *et al.* Atherosclerotic and thrombotic neointima formed over sirolimus drug-eluting stent: an angioscopic study. *JACC Cardiovasc Imaging* 2009; 2: 616-24.
- [129] Nakazawa G, Vorpahl M, Finn AV, Narula J, Virmani R. One step forward and two steps back with drug-eluting-stents: from preventing restenosis to causing late thrombosis and nouveau atherosclerosis. *JACC Cardiovasc Imaging* 2009; 2: 625-8.
- [130] Nakazawa G, Otsuka F, Nakano M, *et al.* The pathology of neoatherosclerosis in human coronary implants bare-metal and drug-eluting stents. *J Am Coll Cardiol* 2011; 57: 1314-22.
- [131] Chen JP, Hou D, Pendyala L, Goudevenos JA, Kounis NG. Drug-Eluting Stent Thrombosis: The Kounis Hypersensitivity-Associated Acute Coronary Syndrome Revisited. *JACC Cardiovasc Interv* 2009; 2: 583-93.
- [132] Farb A, Burke AP, Kolodgie FD, Virmani R. Pathological mechanisms of fatal late coronary stent thrombosis in humans. *Circulation* 2003; 108: 1701-6.
- [133] Joner M, Finn AV, Farb A, *et al.* Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: 193-202.
- [134] Finn AV, Joner M, Nakazawa G, *et al.* Pathological correlates of late drug-eluting stent thrombosis: strut coverage as a marker of endothelialization. *Circulation* 2007; 115: 2435-41.
- [135] Nakazawa G, Finn AV, Vorpahl M, *et al.* Incidence and Predictors of Drug-Eluting Stent Fracture in Human Coronary Artery. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54: 1924-31.
- [136] Nakazawa G, Finn AV, John MC, Kolodgie FD, Virmani R. The significance of preclinical evaluation of sirolimus-, paclitaxel-, and zotarolimus-eluting stents. *Am J Cardiol* 2007; 100: 36M-44M.
- [137] Wilson G, Polovick J, Huijbregtse B, Poff B. Overlapping paclitaxel-eluting stents: Long-term effects in a porcine coronary artery model. *Cardiovasc Res* 2007; 76: 361-72.
- [138] Shinke T, Li J, Chen JP, *et al.* High Incidence of Intramural Thrombus After Overlapping Paclitaxel-Eluting Stent Implantation: Angioscopic and Histopathologic Analysis in Porcine Coronary Arteries. *Circ Cardiovasc Interv* 2008; 1: 28-35.
- [139] Perez de Prado A, Perez Martinez C, Cuellas Ramon C, *et al.* Endothelialization of non-apposed stent struts located over the origin of a side branch. *J Interv Cardiol* 2009; 22: 222-7.
- [140] van Beusekom HM, Sorop O, van den Heuvel M, *et al.* Endothelial function rather than endothelial restoration is altered in paclitaxel- as compared to bare metal-, sirolimus- and tacrolimus-eluting stents. *EuroIntervention* 2010; 6: 117-25.
- [141] Nakazawa G, Nakano M, Otsuka F, *et al.* Evaluation of polymer-based comparator drug-eluting stents using a rabbit model of iliac artery atherosclerosis. *Circ Cardiovasc Interv* 2011; 4: 38-46.
- [142] Lerman A, Eeckhout E. Coronary endothelial dysfunction following sirolimus-eluting stent placement: should we worry about it? *Eur Heart J* 2006; 27: 125-6.
- [143] van Beusekom HMM, Sorop O, van den Heuvel M, *et al.* Early endothelialization in paclitaxel eluting stents is similar to other drug eluting stents but shows transient endothelial dysfunction (Abst). *EuroIntervention* 2009; 5: E65.
- [144] Pendyala LK, Yin X, Li J, Chen JP, Chronos N, Hou D. The First-Generation Drug-Eluting Stents and Coronary Endothelial Dysfunction. *JACC Cardiovasc Interv* 2009; 2: 1169-77.
- [145] Muhlestein JB. Endothelial Dysfunction Associated With Drug-Eluting Stents. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51: 2139-40.
- [146] van den Heuvel M, Sorop O, Batenburg WW, *et al.* Specific coronary drug-eluting stents interfere with distal microvascular function after single stent implantation in pigs. *JACC Cardiovasc Interv* 2010; 3: 723-30.
- [147] van Beusekom HM, Serruys PW. Drug-eluting stent endothelium: presence or dysfunction. *JACC Cardiovasc Interv* 2010; 3: 76-7.

- [148] van Beusekom HM, Whelan DM, Hofma SH, *et al.* Long-term endothelial dysfunction is more pronounced after stenting than after balloon angioplasty in porcine coronary arteries. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 1109-17.
- [149] Mehta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev* 2006; 86: 279-367.
- [150] Falati S, Patil S, Gross PL, *et al.* Platelet PECAM-1 inhibits thrombus formation *in vivo*. *Blood* 2006; 107: 535-41.
- [151] Binette TM, Taylor FB, Jr., Peer G, Bajzar L. Thrombin-thrombomodulin connects coagulation and fibrinolysis: more than an *in vitro* phenomenon. *Blood* 2007; 110: 3168-75.
- [152] Isermann B, Hendrickson SB, Zogg M, *et al.* Endothelium-specific loss of murine thrombomodulin disrupts the protein C anticoagulant pathway and causes juvenile-onset thrombosis. *J Clin Invest* 2001; 108: 537-46.
- [153] Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18: 4-25.
- [154] Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-6.
- [155] Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, *et al.* A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332: 411-5.
- [156] Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* 1989; 3: 2007-18.
- [157] Jagroop IA, Mikhailidis DP. Angiotensin II can induce and potentiate shape change in human platelets: effect of losartan. *J Hum Hypertens* 2000; 14: 581-5.
- [158] Jagroop IA, Mikhailidis DP. Effect of endothelin-1 on human platelet shape change: reversal of activation by naftidrofuryl. *Platelets* 2000; 11: 272-7.
- [159] Togni M, Windecker S, Cocchia R, *et al.* Sirolimus-Eluting Stents Associated With Paradoxical Coronary Vasoconstriction. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: 231-6.
- [160] Jeanmart H, Malo O, Carrier M, Nickner C, Desjardins N, Perrault LP. Comparative study of cyclosporine and tacrolimus vs. newer immunosuppressants mycophenolate mofetil and rapamycin on coronary endothelial function. *J Heart Lung Transplant* 2002; 21: 990-8.
- [161] Kipshidze N, Leon MB. Endothelial dysfunction after drug-eluting stent was never predicted in preclinical studies. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47: 1911; author reply 2-3.
- [162] Li J, Jabara R, Pendyala L, *et al.* Abnormal Vasomotor Function of Porcine Coronary Arteries Distal to Sirolimus-Eluting Stents. *JACC Cardiovasc Interv* 2008; 1: 279-85.
- [163] Hofma SH, van der Giessen WJ, van Dalen BM, *et al.* Indication of long-term endothelial dysfunction after sirolimus-eluting stent implantation. *Eur Heart J* 2006; 27: 166-70.
- [164] Shin DI, Kim PJ, Seung KB, *et al.* Drug-eluting stent implantation could be associated with long-term coronary endothelial dysfunction. *Int Heart J* 2007; 48: 553-67.
- [165] Obata JE, Kitta Y, Takano H, *et al.* Sirolimus-eluting stent implantation aggravates endothelial vasomotor dysfunction in the infarct-related coronary artery in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50: 1305-9.
- [166] Kim JW, Suh SY, Choi CU, *et al.* Six-month comparison of coronary endothelial dysfunction associated with sirolimus-eluting stent vs. paclitaxel-eluting stent. *JACC Cardiovasc Interv* 2008; 1: 65-71.
- [167] Hamilos MI, Ostojic M, Beleslin B, *et al.* Differential effects of drug-eluting stents on local endothelium-dependent coronary vasomotion. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51: 2123-9.
- [168] Hamilos M, Sarma J, Ostojic M, *et al.* Interference of Drug-Eluting Stents With Endothelium-Dependent Coronary Vasomotion: Evidence for Device-Specific Responses. *Circ Cardiovasc Interv* 2008; 1: 193-200.
- [169] Kim JW, Seo HS, Park JH, *et al.* A prospective, randomized, 6-month comparison of the coronary vasomotor response associated with a zotarolimus- vs. a sirolimus-eluting stent. *J Am Coll Cardiol* 2009; 53: 1653-9.
- [170] Farhan S, Hemetsberger R, Matiasek J, *et al.* Implantation of paclitaxel-eluting stent impairs the vascular compliance of arteries in porcine coronary stenting model. *Atherosclerosis* 2009; 202: 144-51.
- [171] Pendyala LK, Li J, Shinke T, *et al.* Endothelium-Dependent Vasomotor Dysfunction in Pig Coronary Arteries With Paclitaxel-Eluting Stents Is Associated With Inflammation and Oxidative Stress. *JACC Cardiovasc Interv* 2009; 2: 253-62.
- [172] Togni M, Raber L, Cocchia R, *et al.* Local vascular dysfunction after coronary paclitaxel-eluting stent implantation. *Int J Cardiol* 2007; 120: 212-20.
- [173] Pendyala LK, Matsumoto D, Shinke T, *et al.* Nobori stent shows less vascular inflammation and early recovery of endothelial function compared with cypher stent. *JACC Cardiovasc Interv* 2012; 5: 436-44.
- [174] Gossel M, Rosol M, Malyar NM, *et al.* Functional anatomy and hemodynamic characteristics of vasa vasorum in the walls of porcine coronary arteries. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2003; 272: 526-37.
- [175] Sahler LG, Davis D, Saad WE, Patel NC, Lee DE, Waldman DL. Comparison of vasa vasorum after intravascular stent placement with sirolimus drug-eluting and bare metal stents. *J Med Imaging Radiat Oncol* 2008; 52: 570-5.
- [176] Perez de Prado A, Perez C, Cuellas C, *et al.* Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) activity and vasomotor dysfunction of coronary arteries after DES: link or chance? (Abst). *EuroIntervention* 2011; 5: M25.
- [177] Kitta Y, Nakamura T, Kodama Y, *et al.* Endothelial vasomotor dysfunction in the brachial artery is associated with late in-stent coronary restenosis. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: 648-55.
- [178] Chia S, Megson IL, Ludlam CA, Fox KA, Newby DE. Preserved endothelial vasomotion and fibrinolytic function in patients with acute stent thrombosis or in-stent restenosis. *Thromb Res* 2003; 111: 343-9.
- [179] Pelliccia F, Cianfrocca C, Rosano G, Mercurio G, Speciale G, Pasceri V. Role of Endothelial Progenitor Cells in Restenosis and Progression of Coronary Atherosclerosis After Percutaneous Coronary Intervention A Prospective Study. *JACC Cardiovasc Interv* 2010; 3: 78-86.
- [180] Kipshidze N, Dangas G, Tsapenko M, *et al.* Role of the endothelium in modulating neointimal formation. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 733-9.
- [181] Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989; 83: 1774-7.
- [182] Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis. *Circ J* 2009; 73: 595-601.
- [183] Shirotani M, Yui Y, Kawai C. Restenosis after Coronary Angioplasty: Pathogenesis of Neointimal Thickening Initiated by Endothelial Loss. *Endothelium* 1993; 1: 5-22.
- [184] Bjorkerud S, Bondjers G. Arterial repair and atherosclerosis after mechanical injury. 5. Tissue response after induction of a large superficial transverse injury. *Atherosclerosis* 1973; 18: 235-55.
- [185] Haudenschild CC, Schwartz SM. Endothelial regeneration. II. Restitution of endothelial continuity. *Lab Invest* 1979; 41: 407-18.
- [186] Stump MM, Jordan GL, Jr., Debakey ME, Halpert B. Endothelium Grown from Circulating Blood on Isolated Intravascular Dacron Hub. *Am J Pathol* 1963; 43: 361-7.
- [187] Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 2003; 107: 1164-9.
- [188] Van Belle E, Maillard L, Tio FO, Isner JM. Accelerated endothelialization by local delivery of recombinant human vascular endothelial growth factor reduces in-stent intimal formation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 235: 311-6.
- [189] Shibata M, Suzuki H, Nakatani M, *et al.* The involvement of vascular endothelial growth factor and flt-1 in the process of neointimal proliferation in pig coronary arteries following stent implantation. *Histochem Cell Biol* 2001; 116: 471-81.
- [190] Werner N, Junk S, Laufs U, *et al.* Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circ Res* 2003; 93: e17-24.
- [191] Gomma AH, Elrayess MA, Knight CJ, Hawe E, Fox KM, Humphries SE. The endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp and -786T>C) gene polymorphisms are associated with coronary in-stent restenosis. *Eur Heart J* 2002; 23: 1955-62.
- [192] Suzuki T, Okumura K, Sone T, *et al.* The Glu298Asp polymorphism in endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary in-stent restenosis. *Int J Cardiol* 2002; 86: 71-6.

- [193] George J, Herz I, Goldstein E, *et al.* Number and adhesive properties of circulating endothelial progenitor cells in patients with in-stent restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: e57-60.
- [194] Shirota T, Yasui H, Matsuda T. Intraluminal tissue-engineered therapeutic stent using endothelial progenitor cell-inoculated hybrid tissue and *in vitro* performance. *Tissue Eng* 2003; 9: 473-85.
- [195] Shirota T, Yasui H, Shimokawa H, Matsuda T. Fabrication of endothelial progenitor cell (EPC)-seeded intravascular stent devices and *in vitro* endothelialization on hybrid vascular tissue. *Biomaterials* 2003; 24: 2295-302.
- [196] Kutryk MJ, Kuliszewski MA. *In vivo* endothelial progenitor cell seeding for the accelerated endothelialization of endovascular devices. *Am J Cardiol* 2003; 92: 94L-5L.
- [197] Aoki J, Serruys PW, van Beusekom H, *et al.* Endothelial progenitor cell capture by stents coated with antibody against CD34: the HEALING-FIM (Healthy Endothelial Accelerated Lining Inhibits Neointimal Growth-First In Man) Registry. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 1574-9.
- [198] Duckers HJ, Silber S, de Winter R, *et al.* Circulating endothelial progenitor cells predict angiographic and intravascular ultrasound outcome following percutaneous coronary interventions in the HEALING-II trial: evaluation of an endothelial progenitor cell capturing stent. *EuroIntervention* 2007; 3: 67-75.
- [199] Duckers HJ, Soullie T, den Heijer P, *et al.* Accelerated vascular repair following percutaneous coronary intervention by capture of endothelial progenitor cells promotes regression of neointimal growth at long term follow-up: final results of the Healing II trial using an endothelial progenitor cell capturing stent (Genous R stent). *EuroIntervention* 2007; 3: 350-8.
- [200] Rotmans JI. *In vivo* cell seeding with anti-cd34 antibodies successfully accelerates endothelialization but stimulates intimal hyperplasia in porcine arteriovenous expanded polytetrafluoroethylene grafts. *Circulation* 2005; 112: 12-8.
- [201] Schober A, Hoffmann R, Oprea N, *et al.* Peripheral CD34+ cells and the risk of in-stent restenosis in patients with coronary heart disease. *Am J Cardiol* 2005; 96: 1116-22.
- [202] Inoue T, Sata M, Hikichi Y, *et al.* Mobilization of CD34-positive bone marrow-derived cells after coronary stent implantation: impact on restenosis. *Circulation* 2007; 115: 553-61.
- [203] Blindt R, Vogt F, Astafieva I, *et al.* A novel drug-eluting stent coated with an integrin-binding cyclic Arg-Gly-Asp peptide inhibits neointimal hyperplasia by recruiting endothelial progenitor cells. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47: 1786-95.
- [204] Joner M, Cheng Q, Schonhofer-Merl S, *et al.* Polymer-free immobilization of a cyclic RGD peptide on a nitinol stent promotes integrin-dependent endothelial coverage of strut surfaces. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2012; 100: 637-45.
- [205] Soucy NV, Feygin G, Tunstall R, *et al.* Strut tissue coverage and endothelial cell coverage: a comparison between bare metal stent platforms and platinum chromium stents with and without everolimus-eluting coating. *EuroIntervention* 2010; 6: 630-7.
- [206] Koster R, Vieluf D, Kiehn M, *et al.* Nickel and molybdenum contact allergies in patients with coronary in-stent restenosis. *Lancet* 2000; 356: 1895-7.
- [207] Messer RL, Wataha JC, Lewis JB, Lockwood PE, Caughman GB, Tseng WY. Effect of vascular stent alloys on expression of cellular adhesion molecules by endothelial cells. *J Long Term Eff Med Implants* 2005; 15: 39-47.
- [208] Norgaz T, Hobikoglu G, Serdar ZA, *et al.* Is there a link between nickel allergy and coronary stent restenosis? *Tohoku J Exp Med* 2005; 206: 243-6.
- [209] Kastrati A, Mehilli J, Dirschinger J, *et al.* Intracoronary stenting and angiographic results: strut thickness effect on restenosis outcome (ISAR-STEREO) trial. *Circulation* 2001; 103: 2816-21.
- [210] Pache J, Kastrati A, Mehilli J, *et al.* Intracoronary stenting and angiographic results: strut thickness effect on restenosis outcome (ISAR-STEREO-2) trial. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 1283-8.
- [211] Briguori C, Sarais C, Pagnotta P, *et al.* In-stent restenosis in small coronary arteries: impact of strut thickness. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40: 403-9.
- [212] Garasic JM, Edelman ER, Squire JC, Seifert P, Williams MS, Rogers C. Stent and artery geometry determine intimal thickening independent of arterial injury. *Circulation* 2000; 101: 812-8.
- [213] Ormiston JA, Webster MW, Ruygrok PN. Stent strut thickness and restenosis. *Circulation* 2002; 105: E12.
- [214] Hofma SH, Whelan DM, van Beusekom HM, Verdouw PD, van der Giessen WJ. Increasing arterial wall injury after long-term implantation of two types of stent in a porcine coronary model. *Eur Heart J* 1998; 19: 601-9.
- [215] Hong MK, Beyar R, Kornowski R, Tio FO, Bramwell O, Leon MB. Acute and chronic effects of self-expanding nitinol stents in porcine coronary arteries. *Coron Artery Dis* 1997; 8: 45-8.
- [216] Simon C, Palmaz JC, Sprague EA. Influence of topography on endothelialization of stents: clues for new designs. *J Long Term Eff Med Implants* 2000; 10: 143-51.
- [217] Sprague EA, Luo J, Palmaz JC. Endothelial cell migration onto metal stent surfaces under static and flow conditions. *J Long Term Eff Med Implants* 2000; 10: 97-110.
- [218] Hamuro M, Palmaz JC, Sprague EA, Fuss C, Luo J. Influence of stent edge angle on endothelialization in an *in vitro* model. *J Vasc Interv Radiol* 2001; 12: 607-11.
- [219] Meng S, Liu Z, Shen L, *et al.* The effect of a layer-by-layer chitosan-heparin coating on the endothelialization and coagulation properties of a coronary stent system. *Biomaterials* 2009; 30: 2276-83.
- [220] Lin Q, Yan J, Qiu F, Song X, Fu G, Ji J. Heparin/collagen multilayer as a thromboresistant and endothelial favorable coating for intravascular stent. *J Biomed Mater Res A* 2011; 96: 132-41.
- [221] Tomai F, Ghini AS, Ferri C, *et al.* Effects of carbon-coated coronary stents on the markers of inflammation, thrombin generation and platelet and endothelial activation. *Ital Heart J* 2003; 4: 23-8.
- [222] Bhargava B, Reddy NK, Karthikeyan G, *et al.* A novel paclitaxel-eluting porous carbon-carbon nanoparticle coated, non-polymeric cobalt-chromium stent: evaluation in a porcine model. *Catheter Cardiovasc Interv* 2006; 67: 698-702.
- [223] Windecker S, Mayer I, De Pasquale G, *et al.* Stent coating with titanium-nitride-oxide for reduction of neointimal hyperplasia. *Circulation* 2001; 104: 928-33.
- [224] Pilgrim T, Raber L, Limacher A, *et al.* Comparison of titanium-nitride-oxide-coated stents with zotarolimus-eluting stents for coronary revascularization a randomized controlled trial. *JACC Cardiovasc Interv* 2011; 4: 672-82.
- [225] Hansi C, Arab A, Rzany A, Ahrens I, Bode C, Hehrlein C. Differences of platelet adhesion and thrombus activation on amorphous silicon carbide, magnesium alloy, stainless steel, and cobalt chromium stent surfaces. *Catheter Cardiovasc Interv* 2009; 73: 488-96.
- [226] Rzany A, Schaldach M. Smart Material Silicon Carbide: Reduced Activation of Cells and Proteins on a-SiC:H-coated Stainless Steel. *Prog Biomed Res* 2001; 4: 182-94.
- [227] Dahm JB, Willems T, Wolpers HG, Nordbeck H, Becker J, Ruppert J. Clinical investigation into the observation that silicon carbide coating on cobalt chromium stents leads to early differentiating functional endothelial layer, increased safety and DES-like recurrent stenosis rates: results of the PRO-Heal Registry (PRO-Kinetic enhancing rapid in-stent endothelialisation). *EuroIntervention* 2009; 4: 502-8.
- [228] Menown I, Lowe R, Penn I. Passive stent coatings in the drug-eluting era. *J Invasive Cardiol* 2005; 17: 222-8.
- [229] Tamai H, Igaki K, Tsuji T, *et al.* A Biodegradable Poly-L-lactic Acid Coronary Stent in the Porcine Coronary Artery. *J Interv Cardiol* 1999; 12: 443-50.
- [230] Tamai H, Igaki K, Kyo E, *et al.* Initial and 6-month results of biodegradable poly-L-lactic acid coronary stents in humans. *Circulation* 2000; 102: 399-404.
- [231] Pollman M. Engineering a bioabsorbable stent: REVA programme update. *EuroIntervention* 2009; 5: F54-F7.
- [232] Jabara R, Pendyala L, Geva S, Chen J, Chronos N, Robinson K. Novel fully bioabsorbable salicylate-based sirolimuseluting stent. *EuroIntervention* 2009; 5: F58-F64.
- [233] Waksman R. Current state of the absorbable metallic (magnesium) stent. *EuroIntervention* 2009; 5: F94-F7.
- [234] Peuster M, Wohlsein P, Brugmann M, *et al.* A novel approach to temporary stenting: degradable cardiovascular stents produced from corrodible metal-results 6-18 months after implantation into New Zealand white rabbits. *Heart* 2001; 86: 563-9.
- [235] Waksman R, Pakala R, Baffour R, Seabron R, Hellings D, Tio FO. Short-term effects of biocorrosible iron stents in porcine coronary arteries. *J Interv Cardiol* 2008; 21: 15-20.
- [236] Cook S, Ladich E, Nakazawa G, *et al.* Correlation of intravascular ultrasound findings with histopathological analysis of thrombus aspirates in patients with very late drug-eluting stent thrombosis. *Circulation* 2009; 120: 391-9.

- [237] Lewis AL, Tolhurst LA, Stratford PW. Analysis of a phosphorylcholine-based polymer coating on a coronary stent pre- and post-implantation. *Biomaterials* 2002; 23: 1697-706.
- [238] Chin-Quee SL, Hsu SH, Nguyen-Ehrenreich KL, et al. Endothelial cell recovery, acute thrombogenicity, and monocyte adhesion and activation on fluorinated copolymer and phosphorylcholine polymer stent coatings. *Biomaterials* 2010; 31: 648-57.
- [239] Udipi K, Melder RJ, Chen M, et al. The next generation Endeavor Resolute Stent: role of the BioLinX Polymer System. *EuroIntervention* 2007; 3: 137-9.
- [240] Stone GW, Midei M, Newman W, et al. Randomized comparison of everolimus-eluting and paclitaxel-eluting stents: two-year clinical follow-up from the Clinical Evaluation of the Xience V Everolimus Eluting Coronary Stent System in the Treatment of Patients with *de novo* Native Coronary Artery Lesions (SPIRIT) III trial. *Circulation* 2009; 119: 680-6.
- [241] Onuma Y, Serruys PW, Kukreja N, et al. Randomized comparison of everolimus- and paclitaxel-eluting stents: pooled analysis of the 2-year clinical follow-up from the SPIRIT II and III trials. *Eur Heart J* 2010; 31: 1071-8.
- [242] Perez de Prado A, Perez C, Cuellas C, et al. Vascular healing response to simvastatin-eluting-stent (IRIST®) in a swine coronary model (Abst). *EuroIntervention* 2009; 5: E103.
- [243] Sehgal SN. Rapamune (Sirolimus, rapamycin): an overview and mechanism of action. *Ther Drug Monit* 1995; 17: 660-5.
- [244] Fukuda D, Sata M, Tanaka K, Nagai R. Potent inhibitory effect of sirolimus on circulating vascular progenitor cells. *Circulation* 2005; 111: 926-31.
- [245] Farb A, John M, Acampado E, Kolodgie FD, Prescott MF, Virmani R. Oral everolimus inhibits in-stent neointimal growth. *Circulation* 2002; 106: 2379-84.
- [246] Waksman R, Pakala R, Baffour R, et al. Optimal dosing and duration of oral everolimus to inhibit in-stent neointimal growth in rabbit iliac arteries. *Cardiovasc Revasc Med* 2006; 7: 179-84.
- [247] Kandzari DE, Leon MB. Overview of pharmacology and clinical trials program with the zotarolimus-eluting endeavor stent. *J Interv Cardiol* 2006; 19: 405-13.
- [248] Tada N, Virmani R, Grant G, et al. Polymer-free biolimus a9-coated stent demonstrates more sustained intimal inhibition, improved healing, and reduced inflammation compared with a polymer-coated sirolimus-eluting cypher stent in a porcine model. *Circ Cardiovasc Interv* 2010; 3: 174-83.
- [249] Serruys PW, Garg S, Abizaid A, et al. A randomised comparison of novolimus-eluting and zotarolimus-eluting coronary stents: 9-month follow-up results of the EXCELLA II study. *EuroIntervention* 2010; 6: 195-205.
- [250] Honda Y, Grube E, de La Fuente LM, Yock PG, Stertz SH, Fitzgerald PJ. Novel drug-delivery stent: intravascular ultrasound observations from the first human experience with the QP2-eluting polymer stent system. *Circulation* 2001; 104: 380-3.
- [251] Kataoka T, Grube E, Honda Y, et al. 7-hexanoyltaxol-eluting stent for prevention of neointimal growth: an intravascular ultrasound analysis from the Study to Compare REstenosis rate between QueST and QuaDS-QP2 (SCORE). *Circulation* 2002; 106: 1788-93.
- [252] van Beusekom HM, Saia F, Zindler JD, et al. Drug-eluting stents show delayed healing: paclitaxel more pronounced than sirolimus. *Eur Heart J* 2007; 28: 974-9.
- [253] Schomig A, Dibra A, Windecker S, et al. A meta-analysis of 16 randomized trials of sirolimus-eluting stents vs. paclitaxel-eluting stents in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50: 1373-80.
- [254] Dol F, Mares A, Herbert J. Simvastatin inhibits myointimal hyperplasia following carotid artery injury in cholesterol-fed rabbits. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1996; 7: 772-8.
- [255] Hagens T, Gussenhoven EJ, van Sambeek MR, Jukema JW, Kranendonk SE, Bom N. Effect of simvastatin on restenosis after percutaneous transluminal angioplasty of femoropopliteal arterial obstruction. *Am J Cardiol* 2000; 86: 774-6, A6.
- [256] Indolfi C, Cioppa A, Stabile E, et al. Effects of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor simvastatin on smooth muscle cell proliferation *in vitro* and neointimal formation *in vivo* after vascular injury. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 214-21.
- [257] Chen Z, Fukutomi T, Zago AC, et al. Simvastatin reduces neointimal thickening in low-density lipoprotein receptor-deficient mice after experimental angioplasty without changing plasma lipids. *Circulation* 2002; 106: 20-3.
- [258] Herdeg C, Fitzke M, Oberhoff M, Baumbach A, Schroeder S, Karsch KR. Effects of atorvastatin on in-stent stenosis in normo- and hypercholesterolemic rabbits. *Int J Cardiol* 2003; 91: 59-69.
- [259] Walter DH. Insights into early and rapid effects of statin therapy after coronary interventions. *Curr Pharm Des* 2004; 10: 369-73.
- [260] Jaschke B, Michaelis C, Milz S, et al. Local statin therapy differentially interferes with smooth muscle and endothelial cell proliferation and reduces neointima on a drug-eluting stent platform. *Cardiovasc Res* 2005; 68: 483-92.
- [261] Petronio AS, Amoroso G, Limbruno U, et al. Simvastatin does not inhibit intimal hyperplasia and restenosis but promotes plaque regression in normocholesterolemic patients undergoing coronary stenting: a randomized study with intravascular ultrasound. *Am Heart J* 2005; 149: 520-6.
- [262] Miyauchi K, Kasai T, Yokayama T, et al. Effectiveness of Statin-Eluting Stent on Early Inflammatory Response and Neointimal Thickness in a Porcine Coronary Model. *Circ J* 2008; 72: 832-8.
- [263] Perez de Prado A, Perez C, Cuellas C, et al. Better Vascular Healing Without Reduction in Anti-Restenotic Effect of a Low-dose Paclitaxel plus Simvastatin Eluting Stent: Preclinical Results (Abst). *J Am Coll Cardiol* 2010; 56: B30.
- [264] New G, Moses JW, Roubin GS, et al. Estrogen-eluting, phosphorylcholine-coated stent implantation is associated with reduced neointimal formation but no delay in vascular repair in a porcine coronary model. *Catheter Cardiovasc Interv* 2002; 57: 266-71.
- [265] Kyriakides ZS, Lymberopoulos E, Papalois A, et al. Estrogen decreases neointimal hyperplasia and improves re-endothelialization in pigs. *Int J Cardiol* 2006; 113: 48-53.
- [266] Tepe G, Duda SH, Hanke H, et al. Covered stents for prevention of restenosis. Experimental and clinical results with different stent designs. *Invest Radiol* 1996; 31: 223-9.
- [267] Jabara R, Chronos N, Robinson K. Novel bioabsorbable salicylate-based polymer as a drug-eluting stent coating. *Catheter Cardiovasc Interv* 2008; 72: 186-94.
- [268] Joner M, Morimoto K, Kasukawa H, 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.
- [269] Bartorelli AL, Trabattini D, Fabbicchio F, et al. Synergy of passive coating and targeted drug delivery: the tacrolimus-eluting Janus CarboStent. *J Interv Cardiol* 2003; 16: 499-505.
- [270] Wieneke H, Dirsch O, Sawitowski T, et al. Synergistic effects of a novel nanoporous stent coating and tacrolimus on intima proliferation in rabbits. *Catheter Cardiovasc Interv* 2003; 60: 399-407.
- [271] Huang Y, Salu K, Wang L, et al. Use of a tacrolimus-eluting stent to inhibit neointimal hyperplasia in a porcine coronary model. *J Invasive Cardiol* 2005; 17: 142-8.
- [272] Scheller B, Grandt A, Wnendt S, Lorenz G, Bohm M, Nickenig G. Comparative study of tacrolimus and paclitaxel stent coating in the porcine coronary model. *Z Kardiol* 2005; 94: 445-52.
- [273] Morice MC, Bestehorn HP, Carrié D, et al. Direct stenting of *de novo* coronary stenoses with tacrolimus-eluting vs. carbon-coated carbostents. The randomized JUPITER II trial. *EuroIntervention* 2006; 2: 45-52.
- [274] van Beusekom H, Sorop O, Weymaere M, Duncker D, van der Giessen WJ. The neointimal response to stents eluting Tacrolimus from a degradable coating depends on the balance between polymer degradation and drug release. *EuroIntervention* 2008; 4: 139-47.
- [275] Prunotto M, Vignolini C, Lolli V, et al. Short-, mid-, and long-term effects of a polymer-free tacrolimus-eluting stent in a porcine coronary model. *J Biomed Mater Res A* 2009; 88: 872-9.
- [276] Gallagher H, Carroll WM, Dowd M, Rochev Y. The effects of vinblastine on endothelial cells. *Endothelium* 2008; 15: 9-15.
- [277] Gallagher H, Carroll WM, Rochev Y. The effects of vinblastine on smooth muscle cells *in vitro*: evaluation of a therapeutic window for the treatment of restenosis. *J Cardiovasc Pharmacol* 2010; 55: 399-407.
- [278] Perez de Prado A, Perez-Martinez C, Cuellas-Ramon C, et al. Scanning electron microscopy analysis of luminal inflammation induced by different types of coronary stent in an animal model. *Rev Esp Cardiol* 2011; 64: 159-62.
- [279] Serruys PW, Ormiston JA, Sianos G, et al. Actinomycin-eluting stent for coronary revascularization: a randomized feasibility and

- safety study: the ACTION trial. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 1363-7.
- [280] van der Giessen WJ, Sorop O, Serruys PW, Peters-Krabendam I, van Beusekom HM. Lowering the dose of sirolimus, released from a non-polymeric hydroxyapatite coated coronary stent, reduces signs of delayed healing. *JACC Cardiovasc Interv* 2009; 2: 284-90.
- [281] Ranade SV, Miller KM, Richard RE, Chan AK, Allen MJ, Helmus MN. Physical characterization of controlled release of paclitaxel from the TAXUS Express2 drug-eluting stent. *J Biomed Mater Res* 2004; 71A: 625-34.
- [282] Aragon J, Kar S, Tio F, *et al.* The effect of variable release kinetics on Paclitaxel efficacy from a drug eluting stent in a porcine model. *EuroIntervention* 2005; 1: 228-35.
- [283] Serruys PW, Sianos G, Abizaid A, *et al.* The effect of variable dose and release kinetics on neointimal hyperplasia using a novel paclitaxel-eluting stent platform: the Paclitaxel In-Stent Controlled Elution Study (PISCES). *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: 253-60.
- [284] Lao LL, Venkatraman SS. Adjustable paclitaxel release kinetics and its efficacy to inhibit smooth muscle cells proliferation. *J Control Release* 2008; 130: 9-14.
- [285] Wang Q, Pierson W, Sood P, *et al.* Pharmacokinetic sub-study in the SPIRIT III Randomized and Controlled Trial of XIENCE V everolimus eluting coronary stent system. *J Interv Cardiol* 2010; 23: 26-32.
- [286] Guagliumi G, Ikejima H, Sirbu V, *et al.* Impact of Drug Release Kinetics on Vascular Response to Different Zotarolimus-Eluting Stents Implanted in Patients With Long Coronary Stenoses The LongOCT Study (Optical Coherence Tomography in Long Lesions). *JACC Cardiovasc Interv* 2011; 4: 778-85.
- [287] Ostojic M, Sagic D, Jung R, *et al.* The pharmacokinetics of Biolimus A9 after elution from the Nobori stent in patients with coronary artery disease: the NOBORI PK study. *Catheter Cardiovasc Interv* 2008; 72: 901-8.
- [288] Balakrishnan B, Tzafirri AR, Seifert P, Groothuis A, Rogers C, Edelman ER. Strut position, blood flow, and drug deposition: implications for single and overlapping drug-eluting stents. *Circulation* 2005; 111: 2958-65.
- [289] Hwang CW, Levin AD, Jonas M, Li PH, Edelman ER. Thrombosis modulates arterial drug distribution for drug-eluting stents. *Circulation* 2005; 111: 1619-26.
- [290] Joner M, Byrne RA. The importance of preclinical research in contemporary interventional cardiology. *EuroIntervention* 2010; 6: 19-23.
- [291] Gunn J, Arnold N, Chan KH, Shepherd L, Cumberland DC, Crossman DC. Coronary artery stretch vs. deep injury in the development of in-stent neointima. *Heart* 2002; 88: 401-5.
- [292] Diego A, Perez de Prado A, Cuellas C, *et al.* In-stent restenosis related to vessel injury score degree. Are current experimental models valid for drug-eluting stents analysis? *Rev Esp Cardiol* 2011; 64: 745-51.
- [293] Komowski R, Hong MK, Tio FO, Bramwell O, Wu H, Leon MB. In-stent restenosis: contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 224-30.
- [294] Pérez de Prado A, Pérez-Martínez C, Cuellas-Ramón C, *et al.* Analysis of Luminal Inflammation Elicited by Different Coronary Stents in an Animal Model With Scanning Electron Microscopy. *Rev Esp Cardiol* 2011; 64: 159-62.
- [295] Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP, *et al.* Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med* 2003; 349: 2316-25.
- [296] Matsumoto D, Shite J, Shinke T, *et al.* Neointimal coverage of sirolimus-eluting stents at 6-month follow-up: evaluated by optical coherence tomography. *Eur Heart J* 2007; 28: 961-7.
- [297] Takano M, Yamamoto M, Xie Y, *et al.* Serial long-term evaluation of neointimal stent coverage and thrombus after sirolimus-eluting stent implantation by use of coronary angiography. *Heart* 2007; 93: 1533-6.
- [298] Chen BX, Ma FY, Wei L, *et al.* Neointimal Coverage of Bare Metal and Sirolimus-Eluting Stents Evaluated with Optical Coherence Tomography. *Heart* 2008; 94: 566-70.
- [299] Guagliumi G, Sirbu V. Optical coherence tomography: high resolution intravascular imaging to evaluate vascular healing after coronary stenting. *Catheter Cardiovasc Interv* 2008; 72: 237-47.
- [300] Stefanadis C, Toutouzas K, Stefanadi E, Kolodgie F, Virmani R, Kipshidze N. First experimental application of bevacizumab-eluting PC coated stent for inhibition of vasa vasorum of atherosclerotic plaque: angiographic results in a rabbit atheromatic model. *Hellenic J Cardiol* 2006; 47: 7-10.
- [301] Stefanadis C, Toutouzas K, Stefanadi E, Lazaris A, Patsouris E, Kipshidze N. Inhibition of plaque neovascularization and intimal hyperplasia by specific targeting vascular endothelial growth factor with bevacizumab-eluting stent: an experimental study. *Atherosclerosis* 2007; 195: 269-76.
- [302] Barker SG, Talbert A, Cottam S, Baskerville PA, Martin JF. Arterial intimal hyperplasia after occlusion of the adventitial vasa vasorum in the pig. *Arterioscler Thromb* 1993; 13: 70-7.
- [303] Kwon HM, Sangiorgi G, Ritman EL, *et al.* Adventitial vasa vasorum in balloon-injured coronary arteries: visualization and quantitation by a microscopic three-dimensional computed tomography technique. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 2072-9.
- [304] Granada JF, Feinstein SB. Imaging of the vasa vasorum. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2008; 5 (Suppl 2): S18-25.
- [305] Alviar CL, Tellez A, Wallace-Bradley D, *et al.* Impact of adventitial neovascularisation on atherosclerotic plaque composition and vascular remodelling in a porcine model of coronary atherosclerosis. *EuroIntervention* 2010; 5: 981-8.
- [306] Schinkel AF, Krueger CG, Tellez A, *et al.* Contrast-enhanced ultrasound for imaging vasa vasorum: comparison with histopathology in a swine model of atherosclerosis. *Eur J Echocardiogr* 2010; 11: 659-64.
- [307] Roussele S, Wicks J. Preparation of medical devices for evaluation. *Toxicol Pathol* 2008; 36: 81-4.
- [308] Nakazawa G, Granada JF, Alviar CL, *et al.* Anti-CD34 Antibodies Immobilized on the Surface of Sirolimus-Eluting Stents Enhance Stent Endothelialization. *JACC Cardiovasc Interv* 2010; 3: 68-75.
- [309] Uchida Y, Sakurai T, Kanai M, Shirai S, Morita T. Characterization of coronary fibrin thrombus in patients with acute coronary syndrome using dye-staining angiography. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31: 1452-60.
- [310] Papadimitriou JM, Finlay-Jones JM, Walters MN. Surface characteristics of macrophages, epithelioid and giant cells using scanning electron microscopy. *Exp Cell Res* 1973; 76: 353-62.
- [311] Miyata K, Shimokawa H, Yamawaki T, *et al.* Endothelial vasodilator function is preserved at the spastic/inflammatory coronary lesions in pigs. *Circulation* 1999; 100: 1432-7.
- [312] Shimokawa H, Seto M, Katsumata N, *et al.* Rho-kinase-mediated pathway induces enhanced myosin light chain phosphorylations in a swine model of coronary artery spasm. *Cardiovasc Res* 1999; 43: 1029-39.
- [313] Cowan CL, McKenzie JE. Cholinergic regulation of resting coronary blood flow in domestic swine. *Am J Physiol* 1990; 259: H109-15.
- [314] Hata H, Egashira K, Fukui T, *et al.* The role of endothelium-derived nitric oxide in acetylcholine-induced coronary vasoconstriction in closed-chest pigs. *Coron Artery Dis* 1993; 4: 891-8.
- [315] Nakamura T, Brott BC, Brants I, *et al.* Vasomotor function after Paclitaxel-coated balloon post-dilation in porcine coronary stent model. *JACC Cardiovasc Interv* 2011; 4: 247-55.
- [316] Gibson CM, Cannon CP, Daley WL, *et al.* TIMI frame count: a quantitative method of assessing coronary artery flow. *Circulation* 1996; 93: 879-88.
- [317] Barcin C, Denktas AE, Garratt KN, Higano ST, Holmes DR, Jr., Lerman A. Relation of Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) frame count to coronary flow parameters. *Am J Cardiol* 2003; 91: 466-9.
- [318] Frutkin AD, Mehta SK, McCrary JR, Marso SP. Limitations to the use of virtual histology-intravascular ultrasound to detect vulnerable plaque. *Eur Heart J* 2007; 28: 1783-4.
- [319] Granada JF, Wallace-Bradley D, Win HK, *et al.* *In vivo* plaque characterization using intravascular ultrasound-virtual histology in a porcine model of complex coronary lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 387-93.
- [320] Hong MK, Mintz GS, Lee CW, *et al.* Comparison of virtual histology to intravascular ultrasound of culprit coronary lesions in acute coronary syndrome and target coronary lesions in stable angina pectoris. *Am J Cardiol* 2007; 100: 953-9.
- [321] Okubo M, Kawasaki M, Ishihara Y, *et al.* Tissue characterization of coronary plaques: comparison of integrated backscatter intravascular ultrasound with virtual histology intravascular ultrasound. *Circ J* 2008; 72: 1631-9.



- [322] Slottow T, Pakala R, Okabe T, *et al.* Optical coherence tomography and intravascular ultrasound imaging of bioabsorbable magnesium stent degradation in porcine coronary arteries. *Cardiovasc Revasc Med* 2008; 9: 248-54.
- [323] Serruys PW, Ormiston JA, Onuma Y, *et al.* A bioabsorbable everolimus-eluting coronary stent system (ABSORB): 2-year outcomes and results from multiple imaging methods. *Lancet* 2009; 373: 897-910.
- [324] Takano M, Ohba T, Inami S, Seimiya K, Sakai S, Mizuno K. Angioscopic differences in neointimal coverage and in persistence of thrombus between sirolimus-eluting stents and bare metal stents after a 6-month implantation. *Eur Heart J* 2006; 27: 2189-95.
- [325] Awata M, Kotani Ji, Uematsu M, *et al.* Serial Angioscopic Evidence of Incomplete Neointimal Coverage After Sirolimus-Eluting Stent Implantation: Comparison With Bare-Metal Stents. *Circulation* 2007; 116: 910-6.
- [326] Awata M, Nanto S, Uematsu M, *et al.* Angioscopic comparison of neointimal coverage between zotarolimus- and sirolimus-eluting stents. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52: 789-90.
- [327] Ertas G, van Beusekom HM, van der Giessen WJ. Late stent thrombosis, endothelialisation and drug-eluting stents. *Neth Heart J* 2009; 17: 177-80.
- [328] Bezerra HG, Costa MA, Guagliumi G, Rollins AM, Simon DI. Intracoronary Optical Coherence Tomography: A Comprehensive Review. *JACC Cardiovasc Interv* 2009; 2: 1035-46.
- [329] Meissner OA, Rieber J, Babaryka G, *et al.* Intravascular Optical Coherence Tomography: Comparison with Histopathology in Atherosclerotic Peripheral Artery Specimens. *J Vasc Interv Radiol* 2006; 17: 343-9.
- [330] Sheehy A, Murata A, Wallace-Bradley D, *et al.* Biological Evaluation of Vascular Response to Drug Eluting Stents Using Optical Coherence Tomography in a Porcine Coronary Artery Model (Abst). *Am J Cardiol* 2008; 102: 27i.
- [331] Murata A, Wallace-Bradley D, Tellez A, *et al.* Accuracy of optical coherence tomography in the evaluation of neointimal coverage after stent implantation. *JACC Cardiovasc Imaging* 2010; 3: 76-84.
- [332] Tanigawa J, Barlis P, Di Mario C. Do unapposed stent struts endothelialise? *In vivo* demonstration with optical coherence tomography. *Heart* 2007; 93: 378.
- [333] Onuma Y, Serruys PW, Perkins LE, *et al.* Intracoronary optical coherence tomography and histology at 1 month and 2, 3, and 4 years after implantation of everolimus-eluting bioresorbable vascular scaffolds in a porcine coronary artery model: an attempt to decipher the human optical coherence tomography images in the ABSORB trial. *Circulation* 2010; 122: 2288-300.
- [334] Nakano M, Vorpahl M, Otsuka F, *et al.* *Ex vivo* assessment of vascular response to coronary stents by optical frequency domain imaging. *JACC Cardiovasc Imaging* 2012; 5: 71-82.
- [335] Templin C, Meyer M, Muller MF, *et al.* Coronary optical frequency domain imaging (OFDI) for *in vivo* evaluation of stent healing: comparison with light and electron microscopy. *Eur Heart J* 2010; 31: 1792-801.
- [336] van Beusekom H, van Duin R, Krabbendam-Peters I, van Haeren R, van der Giessen W. Single and repeated endovascular imaging cause significant but equal acute endothelial injury of a temporary nature as opposed to stent induced injury (Abst). *EuroIntervention* 2011; 7: M25.
- [337] Wanibuchi H, Dingemans KP, Becker AE, *et al.* Is the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit a suitable experimental model for percutaneous transluminal coronary angioplasty in humans? A light microscopic, immunohistochemical and ultrastructural study. *J Am Coll Cardiol* 1993; 21: 1490-6.
- [338] Rapacz J, Hasler-Rapacz J, Taylor KM, Checovich WJ, Attie AD. Lipoprotein mutations in pigs are associated with elevated plasma cholesterol and atherosclerosis. *Science* 1986; 234: 1573-7.
- [339] Prescott MF, McBride CH, Hasler-Rapacz J, Von Linden J, Rapacz J. Development of complex atherosclerotic lesions in pigs with inherited hyper-LDL cholesterol bearing mutant alleles for apolipoprotein B. *Am J Pathol* 1991; 139: 139-47.
- [340] Fingerle J, Au YP, Clowes AW, Reidy MA. Intimal lesion formation in rat carotid arteries after endothelial denudation in absence of medial injury. *Arteriosclerosis* 1990; 10: 1082-7.
- [341] Feldman LJ, Mazighi M, Scheuble A, *et al.* Differential expression of matrix metalloproteinases after stent implantation and balloon angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit. *Circulation* 2001; 103: 3117-22.
- [342] Wilczek K, Walichiewicz P, Petelenz B, *et al.* Post-stenting intravascular brachytherapy trials on hypercholesterolemic rabbits using 32P liquid sources: implications for prevention of in-stent restenosis. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2002; 25: 307-13.
- [343] Walichiewicz P, Petelenz B, Wilczek K, *et al.* 32P liquid sources--comparison of the effectiveness of postangioplasty vs. poststenting intravascular brachytherapy in hypercholesterolemic rabbits. Adjunctly implanted titanium stent does not attenuate the effect of endovascular irradiation. *Cardiovasc Radiat Med* 2003; 4: 64-8.
- [344] Ohtani K, Egashira K, Nakano K, *et al.* Stent-based local delivery of nuclear factor-kappaB decoy attenuates in-stent restenosis in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation* 2006; 114: 2773-9.
- [345] Narita H, Chen S, Komori K, Kadomatsu K. Midkine is expressed by infiltrating macrophages in in-stent restenosis in hypercholesterolemic rabbits. *J Vasc Surg* 2008; 47: 1322-9.
- [346] Lafont A, Guzman LA, Whitlow PL, Goormastic M, Cornhill JF, Chisolm GM. Restenosis after experimental angioplasty. Intimal, medial, and adventitial changes associated with constrictive remodeling. *Circ Res* 1995; 76: 996-1002.
- [347] Cejna M, Breuss JM, Bergmeister H, *et al.* Inhibition of neointimal formation after stent placement with adenovirus-mediated gene transfer of I kappa B alpha in the hypercholesterolemic rabbit model: initial results. *Radiology* 2002; 223: 702-8.
- [348] Danenberg HD, Golomb G, Groothuis A, *et al.* Liposomal alendronate inhibits systemic innate immunity and reduces in-stent neointimal hyperplasia in rabbits. *Circulation* 2003; 108: 2798-804.
- [349] Tanous D, Brasen JH, Choy K, *et al.* Probucol inhibits in-stent thrombosis and neointimal hyperplasia by promoting re-endothelialization. *Atherosclerosis* 2006; 189: 342-9.
- [350] Joner M, Farb A, Cheng Q, *et al.* Pioglitazone inhibits in-stent restenosis in atherosclerotic rabbits by targeting transforming growth factor-beta and MCP-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 182-9.
- [351] Brasselet C, Durand E, Addad F, *et al.* Effect of local heating on restenosis and in-stent neointimal hyperplasia in the atherosclerotic rabbit model: a dose-ranging study. *Eur Heart J* 2008; 29: 402-12.
- [352] Theilmeier G, Quarck R, Verhamme P, *et al.* Hypercholesterolemia impairs vascular remodelling after porcine coronary angioplasty. *Cardiovasc Res* 2002; 55: 385-95.
- [353] Stone GW, Rizvi A, Newman W, *et al.* Everolimus-eluting vs. paclitaxel-eluting stents in coronary artery disease. *N Engl J Med* 2010; 362: 1663-74.
- [354] Duff GL, Mc MG. The effect of alloxan diabetes on experimental cholesterol atherosclerosis in the rabbit. *J Exp Med* 1949; 89: 611-30.
- [355] Brosky G, Logothetopoulos J. Streptozotocin diabetes in the mouse and guinea pig. *Diabetes* 1969; 18: 606-11.
- [356] Marshall M. Induction of chronic diabetes by streptozotocin in the miniature pig. *Res Exp Med (Berl)* 1979; 175: 187-96.
- [357] Grussner R, Nakhleh R, Grussner A, Tomadze G, Diem P, Sutherland D. Streptozotocin-induced diabetes mellitus in pigs. *Horm Metab Res* 1993; 25: 199-203.
- [358] Jonas M, Edelman ER, Groothuis A, Baker AB, Seifert P, Rogers C. Vascular neointimal formation and signaling pathway activation in response to stent injury in insulin-resistant and diabetic animals. *Circ Res* 2005; 97: 725-33.
- [359] Shi Y, Zhang P, Zhang L, *et al.* Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in leukocyte activation and inflammatory responses. *Atherosclerosis* 2007; 191: 54-62.
- [360] Mohler ER, 3rd, Sarov-Blat L, Shi Y, *et al.* Site-specific atherogenic gene expression correlates with subsequent variable lesion development in coronary and peripheral vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 850-5.
- [361] Wilensky RL, Shi Y, Mohler ER, 3rd, *et al.* Inhibition of lipoprotein-associated phospholipase A2 reduces complex coronary atherosclerotic plaque development. *Nat Med* 2008; 14: 1059-66.
- [362] Carter AJ, Bailey L, Devries J, Hubbard B. The effects of uncontrolled hyperglycemia on thrombosis and formation of neointima after coronary stent placement in a novel diabetic porcine model of restenosis. *Coron Artery Dis* 2000; 11: 473-9.
- [363] Llano R, Winsor-Hines D, Patel DB, *et al.* Vascular responses to drug-eluting and bare metal stents in diabetic/hypercholesterolemic and non-atherosclerotic porcine coronary arteries. *Circ Cardiovasc Interv* 2011; 4: 438-46.

## Preclinical Safety Evaluation of Stents

- [364] Huang Y, Venkatraman SS, Boey FY, *et al.* *In vitro* and *in vivo* performance of a dual drug-eluting stent (DDES). *Biomaterials* 2010; 31: 4382-91.
- [365] Huang Y, Venkatraman SS, Boey FY, Umashankar PR, Mohanty M, Arumugam S. The short-term effect on restenosis and thrombosis of a cobalt-chromium stent eluting two drugs in a porcine coronary artery model. *J Interv Cardiol* 2009; 22: 466-78.
- [366] Lee CW, Park DW, Seung KB, *et al.* Comparison of dual drug-eluting Cilotax stent and paclitaxel-eluting Taxus Liberte stent in native coronary artery lesions. *Am J Cardiol* 2011; 107: 990-4.
- [367] Byrne RA, Mehilli J, Iijima R, *et al.* A polymer-free dual drug-eluting stent in patients with coronary artery disease: a randomized trial vs. polymer-based drug-eluting stents. *Eur Heart J* 2009; 30: 923-31.
- [368] Di Mario C, Griffiths H, Goktekin O, *et al.* Drug-eluting bioabsorbable magnesium stent. *J Interv Cardiol* 2004; 17: 391-5.
- [369] Waksman R, Pakala R, Kuchulakanti PK, *et al.* Safety and efficacy of bioabsorbable magnesium alloy stents in porcine coronary arteries. *Catheter Cardiovasc Interv* 2006; 68: 607-17; discussion 18-9.
- [370] Pinto Slottow TL, Pakala R, Lovec RJ, Tio FO, Waksman R. Optical coherence tomographic imaging of a bioabsorbable magnesium stent lost in a porcine coronary artery. *Cardiovasc Revasc Med* 2007; 8: 293-4.
- [371] Pinto Slottow TL, Pakala R, Waksman R. Serial imaging and histology illustrating the degradation of a bioabsorbable magnesium stent in a porcine coronary artery. *Eur Heart J* 2008; 29: 314.
- [372] Waksman R, Erbel R, Di Mario C, *et al.* Early- and long-term intravascular ultrasound and angiographic findings after bioabsorbable magnesium stent implantation in human coronary arteries. *JACC Cardiovasc Interv* 2009; 2: 312-20.
- [373] Ramcharitar S, Serruys PW. Fully biodegradable coronary stents: progress to date. *Am J Cardiovasc Drugs* 2008; 8: 305-14.

## Current Vascular Pharmacology, 2013, Vol. 11, No. 1 99

- [374] Onuma Y, Piazza N, Ormiston J, Serruys P. Everolimus-eluting bioabsorbable stent – Abbott Vascular programme. *EuroIntervention* 2009; 5: F98-F102.
- [375] Ormiston JA, Serruys PW, Regar E, *et al.* A bioabsorbable everolimus-eluting coronary stent system for patients with single de novo coronary artery lesions (ABSORB): a prospective open-label trial. *Lancet* 2008; 371: 899-907.
- [376] Oberhoff M, Herdeg C, Al Ghobainy R, *et al.* Local delivery of paclitaxel using the double-balloon perfusion catheter before stenting in the porcine coronary artery. *Catheter Cardiovasc Interv* 2001; 53: 562-8.
- [377] Oberhoff M, Kunert W, Herdeg C, *et al.* Inhibition of smooth muscle cell proliferation after local drug delivery of the antimitotic drug paclitaxel using a porous balloon catheter. *Basic Res Cardiol* 2001; 96: 275-82.
- [378] Scheller B, Speck U, Abramjuk C, Bernhardt U, Bohm M, Nickenig G. Paclitaxel balloon coating, a novel method for prevention and therapy of restenosis. *Circulation* 2004; 110: 810-4.
- [379] Speck U, Scheller B, Abramjuk C, *et al.* Neointima inhibition: comparison of effectiveness of non-stent-based local drug delivery and a drug-eluting stent in porcine coronary arteries. *Radiology* 2006; 240: 411-8.
- [380] Dommke C, Haase KK, Suselbeck T, *et al.* Local paclitaxel delivery after coronary stenting in an experimental animal model. *Thromb Haemost* 2007; 98: 674-80.
- [381] Scheller B, Hehrlein C, Bocksch W, *et al.* Treatment of coronary in-stent restenosis with a paclitaxel-coated balloon catheter. *N Engl J Med* 2006; 355: 2113-24.
- [382] Joner M, Byrne RA, Lapointe JM, *et al.* Comparative assessment of drug-eluting balloons in an advanced porcine model of coronary restenosis. *Thromb Haemost* 2011; 105.
- [383] Gray WA, Granada JF. Drug-coated balloons for the prevention of vascular restenosis. *Circulation* 2010; 121: 2672-80.

## Vasomotor Response to Different Endothelium-Dependent Vasodilators in an Animal Model

Armando Pérez de Prado, MD, Carlos Cuellas, MD, Alejandro Diego, MD, Jose M. Gonzalo-Orden, DVM, PhD, Claudia Pérez-Martínez, DVM, PhD, Marta Regueiro, DVM, PhD, Antonio de Miguel, MD, Jose M. Ajenjo, DVM, Beatriz Martínez-Fernández, DVM, Jose R. Altonaga, DVM, PhD, Felipe Fernández-Vázquez, MD, PhD

**ABSTRACT: Background and Objectives.** Incomplete re-endothelialization of stents can be revealed as paradoxical vasoconstriction with endothelium-dependent vasodilators. As no consensus exists about the best method or agent, our objective is to analyze the response to different drugs in a coronary swine model. **Methods.** Twenty-seven stents were implanted in 9 domestic swine. The vessel diameter of proximal and distal segments ( $\geq 5$  mm) was assessed immediately post implantation. Different endothelium-dependent vasodilators were used: intracoronary (IC) acetylcholine, 20  $\mu\text{g}$  (A2) and 40  $\mu\text{g}$  (A4), IC serotonin (S), 100  $\mu\text{g}$ , and isoproterenol (I), intravenous infusion. The results are presented as constriction (%) compared with maximal vasodilation with IC nitroglycerin (N, 200  $\mu\text{g}$ ). **Results.** In 10 vessels (37%), A4 provoked an occlusive spasm. Acetylcholine induced a higher degree of vasoconstriction (A4,  $42 \pm 39\%$ ; A2,  $16 \pm 14\%$ ) than the rest of the agonists (S,  $6 \pm 12\%$ ; I,  $6 \pm 11\%$ ;  $P < .01$ ). The constriction rate was not related to the induced hemodynamic changes. **Conclusions.** After focal endothelial denudation in a coronary swine model, the constriction rate induced by different endothelium-dependent vasodilators is highly variable. The highest value is observed after IC acetylcholine bolus. The constriction rate does not correlate with the observed hemodynamic changes.

J INVASIVE CARDIOL 2012;24(7):320-323

**Key words:** stent endothelialization, vasomotor response, animal model

Delayed healing and impaired re-endothelialization are distinctive findings of the vascular response to the implantation of drug-eluting stents (DES), both in animal models<sup>1-7</sup> and in the clinical field.<sup>8-10</sup> Nevertheless, an acceptable endothelialization rate for DESs has been reported in the swine model at 28 days.<sup>2,7,11-16</sup> A common feature in many of these studies is the immaturity of the observed endothelial cells. The main *in vivo* hallmark of dysfunctional endothelium is abnormal vasomotor function,<sup>13,17-22</sup> showing paradoxical vessel vasoconstriction in response to endothelium-dependent vasodilators. This discriminant behavior could be used in preclinical research to look for DESs

with better vascular healing profiles, but also in the clinical scenario to help assess the endothelialization of implanted DESs.<sup>19,20</sup>

Togni et al first reported in humans that exercise, a physiological endothelium-dependent vasodilator, induced paradoxical vessel vasoconstriction 6 months after DES implantation.<sup>23</sup> Subsequently, preclinical studies with different DES have replicated this response.<sup>13,18,21,24-26</sup> Different endothelium-dependent vasodilators have been used in preclinical research to evaluate vasomotor response: acetylcholine (ACh),<sup>26,27</sup> substance P,<sup>25,28</sup> bradykinin,<sup>21,29-31</sup> and serotonin.<sup>29-33</sup> Exercise and rapid atrial pacing were also used in human studies.<sup>23,34-36</sup> The wide variability in the methodology prompted us to compare the vasomotor responses of vessels with denuded endothelium after stent implantation to different endothelium-dependent vasodilators.

### Methods

**Animal model and procedures.** Nine animals (domestic pigs, Large White race) were selected from the experimental farm of our university. They were 2 months old with a mean weight of  $25 \pm 3$  kg. All experimental procedures and animal handling were conducted according to the European and local general directives for the protection of experimental animals (Directive 86/609/CE, R.D. 223/1988) and under the supervision of the bioethics committee of our university. The animals were pretreated with oral clopidogrel (300 mg) and aspirin (325 mg) mixed with food 1 day before the procedure. Anesthesia and surgical procedures were performed as described previously.<sup>12,14,37</sup> A 7 Fr introducer sheath was inserted into a carotid artery by surgical cut-down. Heparin (200 IU/kg) was administered intravenously. A 6 Fr, 40-cm long, modified AL1 guiding catheter (Iberhospitex S.A.) allowed the selective catheterization of both coronary ostia. Heart rate, blood pressure, and electrocardiogram (ECG) were monitored throughout the procedure.

Twenty-seven stents (3.5 mm diameter, 18 mm length) were implanted according to a predetermined scheme in each coronary artery. Every animal received 1 bare-metal stent (Apolo; Iberhospitex S.A.), 1 paclitaxel-eluting stent (Active; Iberhospitex S.A.), and 1 dual-drug eluting stent (simvastatin + paclitaxel, Irist-Duo; Iberhospitex S.A.) in the proximal segment of each coronary artery. All stents were deployed at nominal pressure (9 atm), allowing higher pressure in a second inflation if the relation to the vessel was less than 1.1 to obtain light-to-moderate overstretch (10%-20%). We have previously assessed

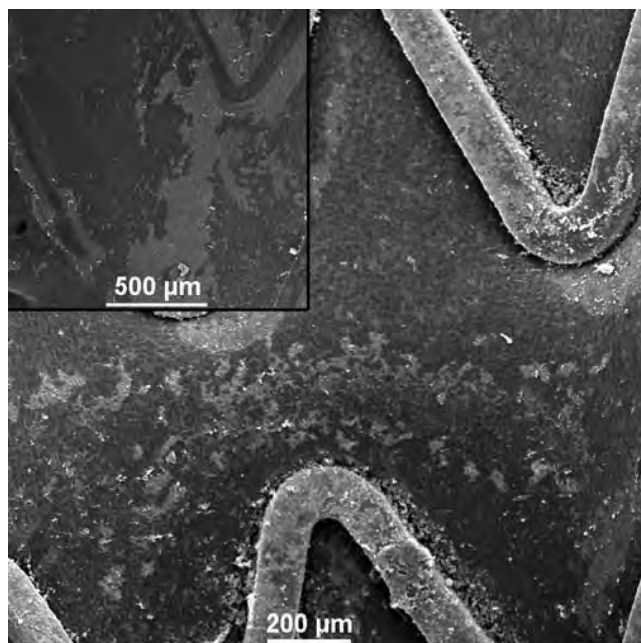
From the Fundación Investigación Sanitaria en León – HemoLeon and Institute of Biomedicine (IBIOMED), León, Spain.

Funding: This study was supported by a Research grant (GRS 403/A/09) from Consejería de Sanidad, Junta de Castilla y León, Spain.

Disclosure: The authors have completed and returned the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. The authors report no conflicts of interest regarding the content herein.

Manuscript submitted January 16, 2012, provisional acceptance given February 14, 2012, final version accepted February 27, 2012.

Address for correspondence: Armando Pérez de Prado, MD, S. Cardiología Intervencionista – Hospital de León, Altos de Nava SN – 24008 León, Spain. Email: aperez@secardiologia.es



**Figure 1.** Partial endothelial denudation immediately after direct stent implantation in normal swine coronary artery. Scanning electron microscopy images. Between the stent struts (with sparse fibrin and a few platelets and inflammatory cells), most of the vessel surface appears endothelialized (dark areas with confluent cobblestone appearance), with patchy areas of denuded endothelium (clear areas). Left upper corner shows detail of denuded endothelium between and under struts once the stent was removed.

that direct stent implantation in native swine coronary arteries only causes focal, partial endothelial denudation (Figure 1).

**Assessment of vasomotor response.** Angiographic images were obtained with a digital x-ray system (GE OEC 9900 Elite, GE Healthcare) and recorded as non-compressed DICOM films. The best angiographic view to avoid any overlapping of the stented segment, proximal, and distal reference segments ( $\geq 10$  mm) was selected for each coronary artery. The stent-to-artery ratio was analyzed in these postimplantation angiographic images. The vasomotor tests were performed immediately after stent implantation in the right coronary artery and after implantation of both stents (left anterior descending and left circumflex) in the left coronary artery.

The endothelium-dependent vasodilators were: (1) A2 = intracoronary ACh, 20  $\mu\text{g}$  infused during 2 minutes; (2) A4 = intracoronary ACh, 40  $\mu\text{g}$  infused during 2 minutes; (3) S = intracoronary serotonin, 100  $\mu\text{g}$  bolus; and (4) I = intravenous isoproterenol, incremental infusion rate until maximal heart rate is achieved without drop in mean blood pressure. Finally, maximal endothelium-independent vasodilation was induced with intracoronary nitroglycerin (N), 200  $\mu\text{g}$  bolus. A washout period of  $\geq 2$  minutes (or until heart rate returns to basal values) was allowed between every drug phase. Angiographic series were recorded at the end of the infusion in the A2 and A4 tests, at the point of maximal heart rate change in the S and I tests, and 1 minute after the nitroglycerin bolus. The vessel diameter was measured both proximal and distal to the stent at the same point (separated at least 5 mm from the stent edges) in each

angiographic run. Off-line quantitative coronary analysis was performed using validated software (Medis QCA-CMS 6.0). As baseline vasoreactivity status may vary between animals, we decided to use the maximal, endothelium-independent, vasodilation as the reference diameter to establish the comparisons. Changes in vessel diameter are presented, thus, as percent reduction as compared with the post-nitroglycerin vessel diameter.

**Statistical methods.** Continuous variables are presented as mean  $\pm$  standard deviation. Vessel diameter values and percentage changes are compared with paired t-test and correlation  $r$  coefficient. The potential influence of other co-variables in these parameters is assessed with the analysis of variance (ANOVA) test. Probability values of  $P < .05$  are considered significant.

## Results

All stents were implanted as defined per protocol. The mean stent-to-artery ratio was  $1.06 \pm 0.23$ , without significant differences between stent types or coronary arteries. The vasomotor tests were performed as planned without complications. Of note, occlusive vessel spasm was induced in 10 vessels (37%) after the infusion of ACh 40  $\mu\text{g}$  (A4). All these cases showed spontaneous flow recovery in the first minute after infusion, without further hemodynamic or arrhythmic consequences. In these cases, the washout phase was prolonged up to 5 minutes.

The animals showed the predicted hemodynamic changes after the vasodilators administration. ACh did not induce significant changes in heart rate and only a modest drop in mean blood pressure ( $16 \pm 14$  mm Hg with A4 dose;  $P < .05$ ). Conversely, serotonin was associated with a significant increase both in heart rate ( $54 \pm 42$  bpm;  $P < .01$ ) and mean blood pressure ( $36 \pm 23$  mm Hg;  $P < .01$ ). Isoproterenol was also associated with a significant increase in heart rate ( $82 \pm 33$  bpm;  $P < .001$ ) without significant change in blood pressure. Figure 2 illustrates these changes.

The observed diameters after each drug test are shown in Figure 3; all the measurements are separated by segment location (proximal and distal). Both ACh doses induced significant vasoconstriction: A2 induced  $16 \pm 14\%$  constriction (vs post-N diameter;  $P < .01$ ) and A4 induced  $42 \pm 39\%$  constriction ( $P < .001$ ). Serotonin and isoproterenol were also associated with diameter values slightly, but significantly, smaller than those observed after maximal vasodilation: S,  $6 \pm 12\%$  ( $P < .05$ ) and I,  $6 \pm 11\%$  ( $P < .05$ ). Correlations between maximal vasodilation values and the diameters measured after every endothelium-dependent agonist reveal similar findings: A2-N,  $r = 0.68$ ; A4-N,  $r = 0.64$ ; S-N,  $r = 0.82$ ; I-N,  $r = 0.81$ . As expected, distal diameters are significantly smaller than the proximal values. However, the changes observed after the administration of the different drugs were alike. No relationships were observed between the constriction rate and type of stent, artery, or segment location.

## Discussion

The main findings of this analysis are: (1) different endothelium-dependent vasodilators induce widely variable grades of paradoxical vasoconstriction in stented segments with denuded endothelium; (2) high doses of Ach frequently induce severe

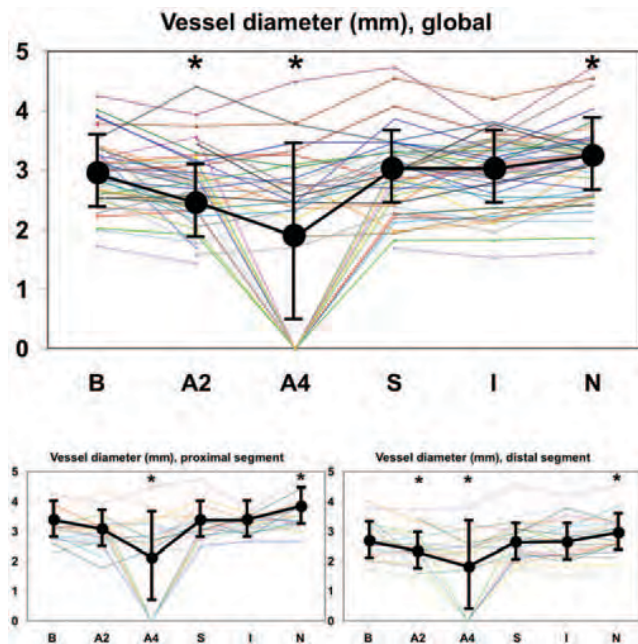


Figure 2. Hemodynamic changes after drug administration. Changes in heart rate (upper panel) and mean blood pressure (lower panel) induced by different drugs. B = baseline; A2 = acetylcholine, 20 µg; A4 = acetylcholine, 40 µg; S = serotonin, 100 µg; I = isoproterenol, maximal dose; N = nitroglycerin, 200 µg. \* $P < .01$  as compared with baseline values.

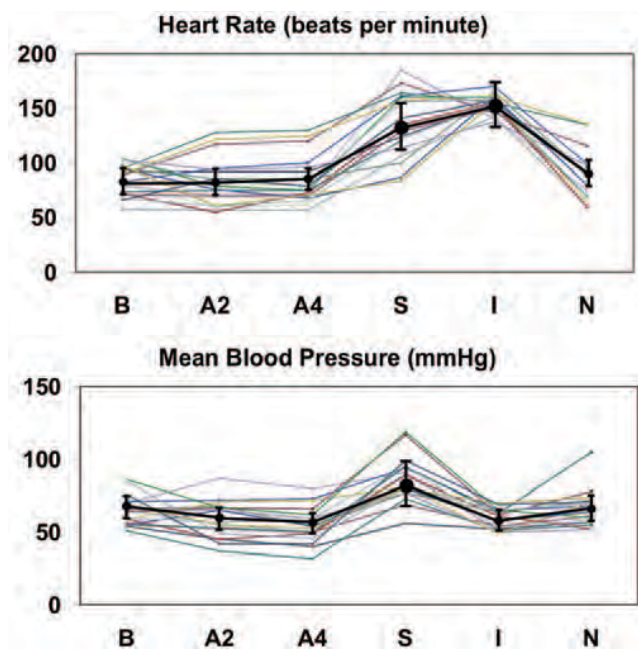


Figure 3. Vasomotor response to different drugs. Vessel diameter after each phase. Upper panel illustrates the measurements in all the segments, left lower panel shows only the values of the proximal segments, and right lower panel the values of distal segments. B = baseline; A2 = acetylcholine, 20 µg; A4 = acetylcholine, 40 µg; S = serotonin, 100 µg; I = isoproterenol, maximal dose; N = nitroglycerin, 200 µg. Asterisk (\*) =  $P < .01$  as compared with baseline values.

vasospasm; and (3) hemodynamic changes are not related with vessel diameter changes.

**Vasomotor dysfunction and DESs.** The abnormal vasomotor response to different endothelium-dependent vasodilators in animal models has been confirmed after sirolimus<sup>13,21,24</sup> and paclitaxel-eluting stents.<sup>13,18,21,25,26</sup> Zotarolimus<sup>35,38</sup> and biolimus-eluting stents<sup>35,36</sup> might show better results in terms of endothelial-dependent vasomotor function than first-generation DESs. Coronary arteries previously treated with DES show both abnormal vasomotor responses and morphological features of endothelial dysfunction, as reduced endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression<sup>13</sup> and markers of oxidative stress.<sup>25</sup> However, the link between morphological markers of mature endothelium, as eNOS expression, and functional assessment of vasomotor response to ACh is controversial.<sup>39</sup>

**Endothelium-dependent vasodilators.** Different methods have been used to provoke this paradoxical vasoconstriction. ACh is one of the most used agonists in human research.<sup>40-43</sup> Some debate exists over the adequacy of using this drug in the swine model as porcine arteries seem to have limited presence of muscarinic receptors and ACh therefore would not induce sufficient vasodilation.<sup>13,44,45</sup> Conversely, other authors have demonstrated significant differences in vasomotor response between different DESs using ACh.<sup>26,27</sup> Our present results and previous data<sup>39</sup> support the value of ACh as a trigger for the paradoxical vasoconstriction related to endothelial dysfunction. Although the higher ACh dose (40 µg) is lower than that used in human protocols,<sup>41,43</sup> it was related to a significant incidence of occlusive vasospasm (37%), suggesting a potential overdosing in this animal model. A potential non-specific spastic response of ACh could also be interpreted from these data, at least in the normal coronary swine model. Extrapolation to the clinical human scenario should be done with caution, as some authors have used ACh to induce coronary spasm in coronary arteries "without significant lesions."<sup>46,47</sup>

Serotonin has also been used as endothelium-dependent vasodilator<sup>29,31</sup> or in vasospasm models.<sup>32,33,47,48</sup> However, some conflicting results remark the preferential action of serotonin causing smooth muscle cell hypercontraction over the endothelium-mediated vasodilation.<sup>30</sup> Our data show inconclusive results, with vessel diameters not significantly different from basal values and slightly lower than those observed after maximal vasodilation. In this case, a suboptimal dose may explain these findings.

Exercise is a physiologic endothelium-dependent vasodilator and, therefore, it was used in some clinical studies.<sup>23,34</sup> Rapid atrial pacing has been used by other authors to reproduce (some of) the exercise-induced hemodynamic changes.<sup>35,36</sup> Isoproterenol, a  $\beta$ -mimetic agent, induces heart rate acceleration and endothelium-dependent vasodilation.<sup>49,50</sup> The observed results in our series are quite similar to those obtained after serotonin administration.

**Study limitations.** Although we have used validated methods, the drugs and doses used in this experiment do not cover the whole spectrum of possibilities that appear in the literature. We cannot rule out over- or under-dosing or missing the best drug. Direct stent implantation in normal swine coronary arteries is one of the most used animal models to test vasomo-

tor responses to DESs. As described in our methodology, we have observed that only focal, partial endothelial denudation is caused. While it could be perceived as a limitation, this situation may also mimic the long-term status of vascular healing after DES implantation with incomplete re-endothelialization.

## Conclusion

After focal endothelial denudation with direct stent implantation in a coronary swine model, the constriction rates induced by different endothelium-dependent vasodilators are highly variable. The highest vasoconstriction is obtained with IC ACh, especially with a 40 µg dose. The hemodynamic changes do not correlate with the constriction rate.

## References

- Farb A, Heller PF, Shroff S, et al. Pathological analysis of local delivery of paclitaxel via a polymer-coated stent. *Circulation*. 2001;104(4):473-479.
- Suzuki T, Kopia G, Hayashi S, et al. Stent-based delivery of sirolimus reduces neointimal formation in a porcine coronary model. *Circulation*. 2001;104(10):1188-1193.
- Finn AV, Kolodgie FD, Harnek J, et al. Differential response of delayed healing and persistent inflammation at sites of overlapping sirolimus- or paclitaxel-eluting stents. *Circulation*. 2005;112(2):270-278.
- Finn AV, Nakazawa G, Joner M, et al. Vascular responses to drug eluting stents: importance of delayed healing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(7):1500-1510.
- van Beusekom HM, Saia F, Zindler JD, et al. Drug-eluting stents show delayed healing: paclitaxel more pronounced than sirolimus. *Eur Heart J*. 2007;28(8):974-979.
- John MC, Wessely R, Kastrati A, et al. Differential healing responses in polymer- and nonpolymer-based sirolimus-eluting stents. *JACC Cardiovasc Interv*. 2008;1(5):535-544.
- Joner M, Nakazawa G, Finn AV, et al. Endothelial cell recovery between comparator polymer-based drug-eluting stents. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52(5):333-342.
- Farb A, Burke AP, Kolodgie FD, Virmani R. Pathological mechanisms of fatal late coronary stent thrombosis in humans. *Circulation*. 2003;108(14):1701-1706.
- Joner M, Finn AV, Farb A, et al. Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48(1):193-202.
- Finn AV, Joner M, Nakazawa G, et al. Pathological correlates of late drug-eluting stent thrombosis: strut coverage as a marker of endothelialization. *Circulation*. 2007;115(18):2435-2441.
- Wilson G, Polovick J, Huibregtse B, Poff B. Overlapping paclitaxel-eluting stents: long-term effects in a porcine coronary artery model. *Cardiovasc Res*. 2007;76(2):361-372.
- Perez de Prado A, Perez Martinez C, Cuellas Ramon C, et al. Endothelialization of nonapposed stent struts located over the origin of a side branch. *J Interv Cardiol*. 2009;22(3):222-227.
- van Beusekom HM, Sorop O, van den Heuvel M, et al. Endothelial function rather than endothelial restoration is altered in paclitaxel- as compared to bare-metal, sirolimus- and tacrolimus-eluting stents. *EuroIntervention*. 2010;6(1):117-125.
- Perez de Prado A, Perez-Martinez C, Cuellas-Ramon C, et al. Time course of reendothelialization of stents in a normal coronary swine model: characterization and quantification. *Vet Pathol*. 2011;48(6):1109-1117.
- Nakazawa G, Finn AV, John MC, et al. The significance of preclinical evaluation of sirolimus-, paclitaxel-, and zotarolimus-eluting stents. *Am J Cardiol*. 2007;100(8B):36M-44M.
- Nakazawa G, Nakano M, Otsuka F, et al. Evaluation of polymer-based comparator drug-eluting stents using a rabbit model of iliac artery atherosclerosis. *Circ Cardiovasc Interv*. 2011;4(1):38-46.
- Lerman A, Eckhout E. Coronary endothelial dysfunction following sirolimus-eluting stent placement: should we worry about it? *Eur Heart J*. 2006;27(2):125-126.
- van Beusekom HMM, Sorop O, van den Heuvel M, et al. Early endothelialization in paclitaxel eluting stents is similar to other drug eluting stents but shows transient endothelial dysfunction (Abstr). *EuroIntervention*. 2009;5:E65.
- Pendyala LK, Yin X, Li J, et al. The first-generation drug-eluting stents and coronary endothelial dysfunction. *JACC Cardiovasc Interv*. 2009;2(12):1169-1177.
- Muhlestein JB. Endothelial dysfunction associated with drug-eluting stents. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(22):2139-2140.
- van den Heuvel M, Sorop O, Batenburg WW, et al. Specific coronary drug-eluting stents interfere with distal microvascular function after single stent implantation in pigs. *JACC Cardiovasc Interv*. 2010;3(7):723-730.
- van Beusekom HM, Serruys PW. Drug-eluting stent endothelium: presence or dysfunction. *JACC Cardiovasc Interv*. 2010;3(1):76-77.
- Togni M, Windecker S, Cocchia R, et al. Sirolimus-eluting stents associated with paradoxical coronary vasoconstriction. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46(2):231-236.
- Li J, Jabara R, Pendyala L, et al. Abnormal vasomotor function of porcine coronary arteries distal to sirolimus-eluting stents. *JACC Cardiovasc Interv*. 2008;1(3):279-285.
- Pendyala LK, Li J, Shinke T, et al. Endothelium-dependent vasomotor dysfunction in pig coronary arteries with paclitaxel-eluting stents is associated with inflammation and oxidative stress. *JACC Cardiovasc Interv*. 2009;2(3):253-262.
- Farhan S, Hemetsberger R, Matiassek J, et al. Implantation of paclitaxel-eluting stent impairs the vascular compliance of arteries in porcine coronary stenting model. *Atherosclerosis*. 2009;202(1):144-151.
- Nakamura T, Brott BC, Brants I, et al. Vasomotor function after paclitaxel-coated balloon post-dilation in porcine coronary stent model. *JACC Cardiovasc Interv*. 2011;4(2):247-255.
- Shinke T, Li J, Chen JP, et al. High incidence of intramural thrombus after overlapping paclitaxel-eluting stent implantation: angiographic and histopathologic analysis in porcine coronary arteries. *Circ Cardiovasc Interv*. 2008;1(1):28-35.
- Shimokawa H, Vanhoutte PM. Impaired endothelium-dependent relaxation to aggregating platelets and related vasoactive substances in porcine coronary arteries in hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Circ Res*. 1989;64(5):900-914.
- Miyata K, Shimokawa H, Yamawaki T, et al. Endothelial vasodilator function is preserved at the spastic/inflammatory coronary lesions in pigs. *Circulation*. 1999;100(13):1432-1437.
- Jeanmart H, Malo O, Carrier M, et al. Comparative study of cyclosporine and tacrolimus vs newer immunosuppressants mycophenolate mofetil and rapamycin on coronary endothelial function. *J Heart Lung Transplant*. 2002;21(9):990-998.
- Shimokawa H, Seto M, Katsumata N, et al. Rho-kinase-mediated pathway induces enhanced myosin light chain phosphorylations in a swine model of coronary artery spasm. *Cardiovasc Res*. 1999;43(4):1029-1039.
- Kandabashi T, Shimokawa H, Miyata K, et al. Inhibition of myosin phosphatase by upregulated rho-kinase plays a key role for coronary artery spasm in a porcine model with interleukin-1beta. *Circulation*. 2000;101(11):1319-1323.
- Togni M, Raber L, Cocchia R, et al. Local vascular dysfunction after coronary paclitaxel-eluting stent implantation. *Int J Cardiol*. 2007;120(2):212-220.
- Hamilos M, Sarma J, Ostojic M, et al. Interference of drug-eluting stents with endothelium-dependent coronary vasomotion: evidence for device-specific responses. *Circ Cardiovasc Interv*. 2008;1(3):193-200.
- Hamilos MI, Ostojic M, Beleslin B, et al. Differential effects of drug-eluting stents on local endothelium-dependent coronary vasomotion. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(22):2123-2129.
- Perez de Prado A, Perez-Martinez C, Cuellas-Ramon C, et al. Scanning electron microscopy analysis of luminal inflammation induced by different types of coronary stent in an animal model. *Rev Esp Cardiol*. 2011;64(2):159-162.
- Kim JW, Seo HS, Park JH, et al. A prospective, randomized, 6-month comparison of the coronary vasomotor response associated with a zotarolimus- versus a sirolimus-eluting stent. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53(18):1653-1659.
- Perez de Prado A, Perez C, Cuellas C, et al. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity and vasomotor dysfunction of coronary arteries after DES: link or chance? (Abstr). *EuroIntervention*. 2011;5:M25.
- Hofma SH, van der Giessen WJ, van Dalen BM, et al. Indication of long-term endothelial dysfunction after sirolimus-eluting stent implantation. *Eur Heart J*. 2006;27(2):166-170.
- Obata JE, Kitta Y, Takano H, et al. Sirolimus-eluting stent implantation aggravates endothelial vasomotor dysfunction in the infarct-related coronary artery in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50(14):1305-1309.
- Shin DI, Kim PJ, Seung KB, et al. Drug-eluting stent implantation could be associated with long-term coronary endothelial dysfunction. *Int Heart J*. 2007;48(5):553-567.
- Kim JW, Suh SY, Choi CU, et al. Six-month comparison of coronary endothelial dysfunction associated with sirolimus-eluting stent versus paclitaxel-eluting stent. *JACC Cardiovasc Interv*. 2008;1(1):65-71.
- Cowan CL, McKenzie JE. Cholinergic regulation of resting coronary blood flow in domestic swine. *Am J Physiol*. 1990;259(1 Pt 2):H109-H115.
- Hata H, Egashira K, Fukui T, et al. The role of endothelium-derived nitric oxide in acetylcholine-induced coronary vasoconstriction in closed-chest pigs. *Coron Artery Dis*. 1993;4(10):891-898.
- Ong P, Athanasiadis A, Hill S, et al. Coronary artery spasm as a frequent cause of acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52(7):523-527.
- Kanazawa K, Suematsu M, Ishida T, et al. Disparity between serotonin- and acetylcholine-provoked coronary artery spasm. *Clin Cardiol*. 1997;20(2):146-152.
- Mongiardo R, Finocchiaro ML, Beltrame J, et al. Low incidence of serotonin-induced occlusive coronary artery spasm in patients with recent myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 1996;78(1):84-87.
- Dawes M, Chowienzyk PJ, Ritter JM. Effects of inhibition of the L-arginine/nitric oxide pathway on vasodilation caused by beta-adrenergic agonists in human forearm. *Circulation*. 1997;95(9):2293-2297.
- Garovic VD, Joyner MJ, Dietz NM, Boerwinkle E, Turner ST. Beta(2)-adrenergic receptor polymorphism and nitric oxide-dependent forearm blood flow responses to isoproterenol in humans. *Journal Physiol*. 2002;546(Pt 2):583-589.

## Comunicación breve

Análisis de la inflamación luminal inducida por distintos tipos de *stent* coronario en el modelo coronario animal mediante microscopía electrónica de barrido

Armando Pérez de Prado\*, Claudia Pérez-Martínez, Carlos Cuellas-Ramón, José M. Gonzalo-Orden, Marta Regueiro-Purriños, Beatriz Martínez-Fernández, Alejandro Diego-Nieto y Felipe Fernández-Vázquez

Grupo Cardiovascular de la Fundación Investigación Sanitaria en León e Instituto Universitario de Biomedicina IBIOMED, Hospital Universitario de León y Universidad de León, León, España

## INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

## Historia del artículo:

Recibido el 23 de febrero de 2010  
Aceptado el 24 de abril de 2010  
On-line el 30 de diciembre de 2010

## Palabras clave:

Inflamación  
Endotelio  
Stent coronario  
Microscopio electrónico de barrido  
Modelo animal

## Keywords:

Inflammation  
Endothelium  
Coronary stent  
Scanning electron microscopy  
Animal model

## RESUMEN

Los *stents* farmacoactivos se asocian con retraso en la endotelización y fenómenos inflamatorios persistentes demostrados histológicamente. En la superficie luminal, mediante microscopio electrónico de barrido se observan también cúmulos de células inflamatorias. Para cuantificar esta respuesta inflamatoria se implantaron un *stent* de acero y dos *stents* farmacoactivos con distintas dosis de vinblastina y el mismo polímero en las coronarias de 12 cerdos domésticos. Se analizó 3 y 7 días después la densidad de células inflamatorias por área representativa (100 x 100  $\mu\text{m}$ ). La endotelización del *stent* de acero fue más completa que en los *stents* farmacoactivos a los 3 días ( $p = 0,016$ ) y a los 7 días ( $p = 0,0001$ ). Los *stents* farmacoactivos indujeron un grado de inflamación mayor que los *stents* de acero a los 3 días ( $11,8 \pm 3,5\%$  frente al  $4,5 \pm 2\%$ ;  $p = 0,001$ ) y a los 7 días ( $26,3 \pm 4,4\%$  frente al  $1,2 \pm 1,5\%$ ;  $p = 0,0001$ ), con un patrón opuesto: la respuesta inflamatoria aumentaba con el tiempo en los *stents* farmacoactivos, al contrario de lo que sucedía con los *stents* de acero.

© 2010 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

## Scanning Electron Microscopy Analysis of Luminal Inflammation Induced by Different Types of Coronary Stent in an Animal Model

## ABSTRACT

There is histological evidence that drug-eluting stents are associated with delayed endothelialization and a persistent inflammatory state. Moreover, clusters of inflammatory cells have been observed on luminal surfaces by scanning electron microscopy. With the aim of quantifying this inflammatory response, we implanted one bare-metal stent and two drug-eluting stents containing different doses of vinblastine embedded in the same polymer into the coronary arteries of 12 domestic pigs. The density of inflammatory cells in a representative area (100 x 100  $\mu\text{m}$ ) was quantified at 3 and 7 days. Endothelialization was more complete in bare-metal stents than in drug-eluting stents at both 3 days ( $P = .016$ ) and 7 days ( $P = .0001$ ). The degree of inflammation induced by the drug-eluting stents was higher than that induced by the bare-metal stents at both 3 days ( $11.8 \pm 3.5\%$  vs.  $4.5 \pm 2\%$ ;  $P = .001$ ) and 7 days ( $26.3 \pm 4.4\%$  vs.  $1.2 \pm 1.5\%$ ;  $P = .0001$ ). In addition, the time sequence was inverted: the inflammatory response increased over time with the drug-eluting stents, while the opposite occurred with the bare-metal stents.

Full English text available from: [www.revespcardiologia.org](http://www.revespcardiologia.org)

© 2010 Sociedad Española de Cardiología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

## INTRODUCCIÓN

Los *stents* coronarios farmacoactivos (SFA) han demostrado su eficacia en la reducción de la reestenosis<sup>1,2</sup>. Sin embargo, bien sea por los efectos antiproliferativos de los fármacos empleados, bien por el propio polímero empleado para su liberación controlada, los SFA se asocian con retraso en la endotelización y fenómenos inflamatorios persistentes<sup>3-6</sup>. Ambos fenómenos se han relacio-

nado con la aparición de la complicación más grave relacionada con estos dispositivos: la trombosis del *stent*, incluso en fases muy tardías<sup>4</sup>.

Los datos referidos se basan en el análisis histológico de las piezas procedentes de experimentación animal y de necropsias humanas. Para el análisis de la endotelización de los *stents*, se ha empleado frecuentemente el microscopio electrónico de barrido (*Scanning Electron Microscopy* [SEM]), con el que se puede observar células inflamatorias en la pared arterial y el *stent*. El objetivo de este estudio es describir un método de análisis de la inflamación superficial (luminal) inducida por los *stents* coronarios que permita valorar su magnitud y la evolución en distintos tipos de dispositivo.

\* Autor para correspondencia: Servicio de Cardiología Intervencionista, Hospital de León, Altos de Nava, s/n. 24008 León, España.

Correo electrónico: [aperez@secardiologia.es](mailto:aperez@secardiologia.es) (A. Pérez de Prado).

## MÉTODOS

Los procedimientos experimentales se llevaron a cabo en 12 cerdos domésticos ( $25 \pm 3$  kg), siguiendo las directivas generales para la protección de los animales de experimentación (Directiva 86/609/CEE, RD 1201/2005), bajo la supervisión de nuestro comité bioético.

Los procedimientos de sedación, analgesia, anestesia y endovascular se han descrito previamente<sup>7</sup>. Se implantaron un *stent* de acero inoxidable (SA, Apolo® 3,5 x 18 mm, Iberhospitex S.A., España) y dos *stents* farmacoactivos con distintas dosis de vinblastina (SFA1, 0,18  $\mu\text{g}/\text{mm}^2$  y SFA2, 0,36  $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ ) y el mismo polímero liberador (polímero P5®, Iberhospitex S.A.-Palau Pharma S.A., España) en cada una de las tres coronarias de forma aleatoria para que la distribución por arterias (descendente anterior, circunfleja y coronaria derecha) de los *stents* fuese la misma. La presión de implantación se adecuó para obtener una sobredimensión del 10%.

La eutanasia de los animales a los 3 (n = 6) y 7 días (n = 6) tras la implantación se describió previamente<sup>7</sup>. El procesado para el estudio con SEM sigue la metodología descrita por Farb et al<sup>8</sup>. Las superficies lumbales de las hemisecciones se examinaron con microscopio electrónico de barrido JSM-6480 LV (JEOL, Japón). Cada hemisección se fotografió digitalmente y se analizó la superficie endotelizada en imágenes a 25 aumentos, empleando imágenes en detalle (150-250 aumentos) para diferenciar las células endoteliales de formaciones de fibrina u otros tipos celulares. Se determinó el porcentaje de endotelización midiendo el área total de la pieza, valor corregido por la relación metal/arteria (14%) y el área metálica no endotelizada mediante la siguiente fórmula:  $\% = 100 \times [1 - (\text{área no endotelizada} / \text{área total metálica})]$ . Se seleccionaron 3-5 áreas representativas (100 x 100  $\mu\text{m}$ ) (fig. 1) de

pared arterial adyacente al *stent* para estudiar la densidad de células inflamatorias, de mayor tamaño que el resto de los elementos formes sanguíneos. Tras el procesado de la imagen mediante la determinación automática de umbral con el *software* ImageJ-NIH Image 1.4 (National Institutes of Health, Estados Unidos), se cuantificó la densidad de leucocitos con respecto al área analizada (porcentaje del área total ocupada por células inflamatorias).

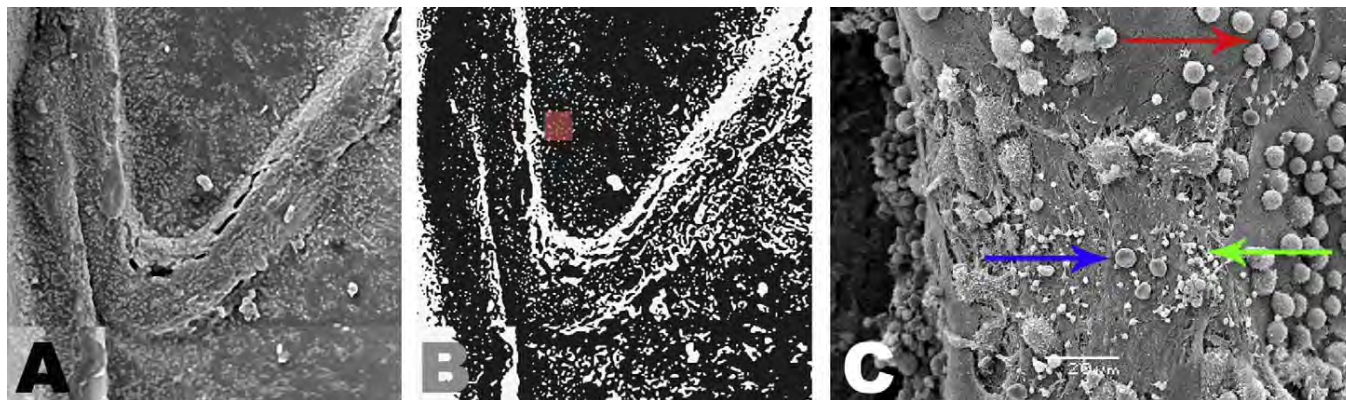
Se presentan los datos como media  $\pm$  desviación estándar. Se analizan las diferencias entre medias con el test de la t de Student y las correlaciones mediante la  $r^2$  de Pearson.

En la versión electrónica de este artículo se puede consultar material adicional asociado a este apartado.

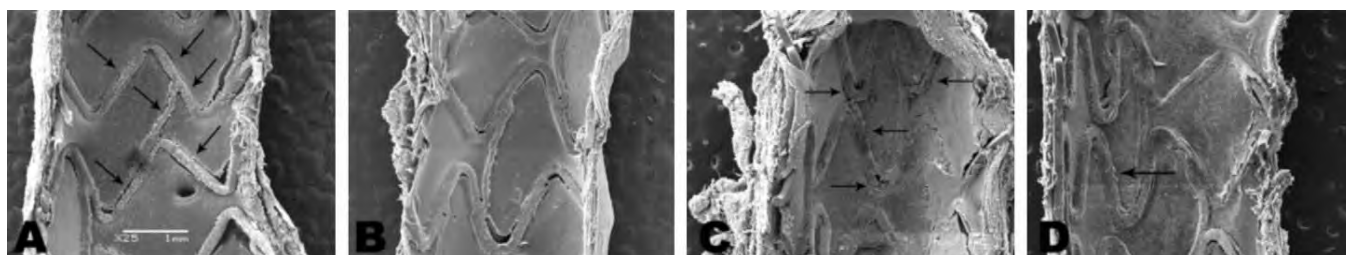
## RESULTADOS

La endotelización de los SA fue mayor que la de ambos SFA a los 3 días ( $82 \pm 18\%$  frente al  $28\% \pm 14\%$ ;  $p = 0,016$ ) y 7 días ( $97 \pm 3\%$  frente al  $44 \pm 15\%$ ;  $p = 0,0001$ ) (fig. 2). No se observaron diferencias en la endotelización entre los dos SFA, las distintas arterias (descendente anterior, circunfleja y coronaria derecha) ni relación con la razón *stent*/arteria (SA,  $1,17 \pm 0,1$ ; SFA1,  $1,07 \pm 0,07$ ; SFA2,  $1,13 \pm 0,16$ ;  $p = 0,4$ ).

Los SA mostraron menor densidad de células inflamatorias que los SFA tanto a los 3 días ( $4,5 \pm 2\%$  frente al  $11,8 \pm 3,5\%$ ;  $p = 0,001$ ) como a los 7 días ( $1,2 \pm 1,5\%$  frente al  $26,3\% \pm 4,4\%$ ;  $p = 0,0001$ ) (fig. 3). No se apreciaron diferencias significativas entre los dos SFA. En los SA disminuyó de forma significativa la densidad de células inflamatorias con el tiempo ( $4,5 \pm 2\%$  frente al  $1,2 \pm 1,5\%$ ;  $p = 0,0001$ ), mientras en los SFA el comportamiento fue inverso y aumentó de forma significativa a los 7 días ( $11,8 \pm 3,5\%$  frente al  $26,3 \pm 4,4\%$ ;  $p = 0,0001$ ).

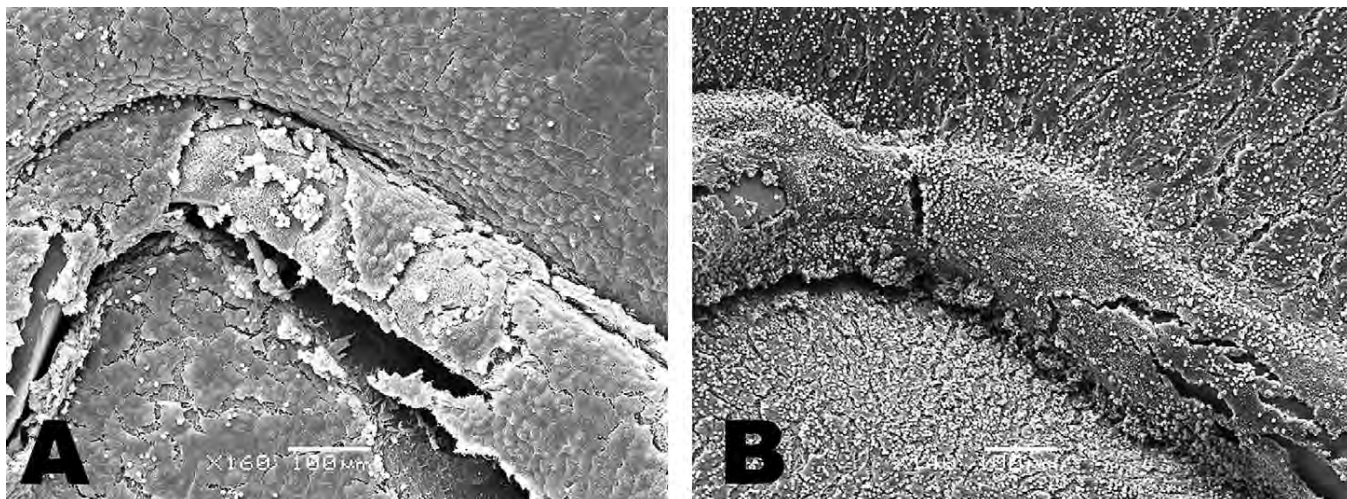


**Figura 1.** Procesado de las imágenes para análisis de la inflamación. A: respuesta inflamatoria al *stent* en zona adyacente de la pared. B: procesado del umbral de grises y selección de área representativa de 100 x 100  $\mu\text{m}$  (cuadro rojo). C: detalle del tamaño y la morfología de leucocitos (esféricos,  $\sim 10$   $\mu\text{m}$ ; flecha roja), hematíes (bicóncavos,  $\sim 5$   $\mu\text{m}$ ; flecha azul) y plaquetas (pequeños puntos  $< 1$   $\mu\text{m}$ ; flecha verde).

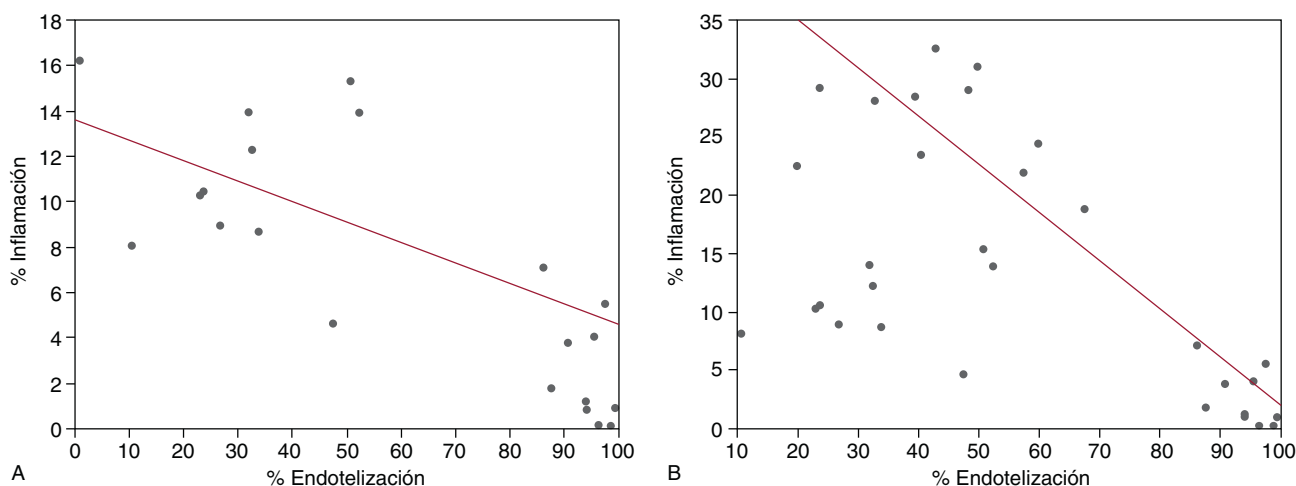


**Figura 2.** A y B: endotelización de *stent* de acero. A: a los 3 días, endotelización parcial del *stent*; áreas desnudas (flechas). B: a los 7 días, endotelización completa del *stent*. C y D: endotelización de *stent* farmacoactivo. C: a los 3 días, áreas desnudas (flechas) y el resto cubierto de fibrina. D: a los 7 días, endotelización irregular; presencia de células gigantes (flechas).





**Figura 3.** Grados de inflamación. A: stent de acero, a los 3 días, escasa presencia de células inflamatorias (pared y stent); endotelización parcial del stent; áreas con fibrina. B: stent farmacoadactivo, a los 7 días, intensa reacción inflamatoria alrededor del stent; cobertura de fibrina y plaquetas en el stent.



**Figura 4.** Correlación entre el grado de endotelización y el de inflamación. Resultados a los 3 días (A) y a los 7 días (B).

Se observaron correlaciones inversas entre el grado de inflamación y el porcentaje de endotelización, con valores de  $r^2 = -0,4$  ( $p < 0,011$ ) a los 3 días y  $r^2 = -0,84$  ( $p < 0,0001$ ) a los 7 días (fig. 4).

## DISCUSIÓN

En el reciente documento de consenso<sup>9</sup> para el análisis preclínico de los SFA, se recomienda la valoración semicuantitativa de la inflamación inducida como uno de los parámetros más relevantes. El método aquí descrito muestra escasa variabilidad y ofrece resultados en una escala cuantitativa, lo que permitiría comparar la respuesta a distintos dispositivos de forma más detallada.

Recientemente se ha publicado<sup>6</sup> la diferente respuesta a largo plazo que se observa entre los dos SFA de primera generación en modelo porcino: la respuesta inflamatoria en profundidad y la deposición de fibrina distinguen uno de otro stent. Aunque los autores reconocen la difícil extrapolación al terreno clínico, no es menos cierto que se trata de hallazgos no deseables. El análisis de la inflamación luminal completa el estudio de la respuesta a los SFA con los fenómenos que tienen lugar en la interfaz stent-luz arterial,

esencial para la posterior endotelización<sup>5</sup>. De hecho, hemos observado una significativa correlación inversa entre la intensidad de la respuesta inflamatoria y el porcentaje de superficie del stent endotelizada.

Un hallazgo reseñable es el patrón temporal de inflamación, decreciente en los stents metálicos y creciente en los SFA. En nuestros resultados la liberación del fármaco puede tener un papel relevante, al tratarse de análisis a corto plazo. Sin embargo, la persistencia de estos fenómenos a muy largo plazo en otros estudios<sup>5,6,9</sup> parecen confirmar el papel causal de los polímeros empleados. El papel que pudiera desempeñar el polímero P5<sup>®</sup> en un potencial aumento de la respuesta inflamatoria no puede determinarse con los datos aquí presentados, pero hallazgos preliminares<sup>10</sup> no sustentan esa relación.

La limitación más notable es la difícil extrapolación de los datos del modelo animal (joven y sano) al humano enfermo, aunque es lo recomendado por el documento de consenso<sup>9</sup>. El empleo de modelos de animales enfermos (diabéticos, hiperlipémicos por deficiencia genética o inducida) se está validando y aún no está recomendado. La falta de correlación de los hallazgos con otras técnicas de análisis (histopatología) puede percibirse como otra limitación. Sin embargo, creemos que el método descrito, más que sustituir, complementa la información obtenida por otros medios.

Queda por definir el papel que otros fármacos antiproliferativos pueden desempeñar en la respuesta inflamatoria.

En conclusión, los SFA liberadores de vinblastina utilizados en este estudio inducen un grado de inflamación mayor que los *stents* metálicos convencionales, con un patrón temporal opuesto: aumenta con el tiempo en los SFA y disminuye con los convencionales. Hay una correlación significativa entre la respuesta inflamatoria analizada y la endotelización del *stent* coronario.

### FINANCIACIÓN

Financiado por una ayuda no condicionada de Cordynamic-Iberhospitex, S.A. (Barcelona, España).

### CONFLICTO DE INTERESES

Ninguno.

### ANEXO. MATERIAL ADICIONAL



Se puede consultar material adicional asociado a este artículo en su versión electrónica disponible en [doi:10.1016/j.recesp.2010.04.001](https://doi.org/10.1016/j.recesp.2010.04.001).

### BIBLIOGRAFÍA

1. Stone GW, Moses JW, Ellis SG, Schofer J, Dawkins KD, Morice MC, et al. Safety and efficacy of sirolimus- and paclitaxel-eluting coronary stents. *N Engl J Med*. 2007;356:998-1008.
2. Spaulding C, Daemen J, Boersma E, Cutlip DE, Serruys PW. A pooled analysis of data comparing sirolimus-eluting stents with bare-metal stents. *N Engl J Med*. 2007;356:989-97.
3. Joner M, Finn AV, Farb A, Mont EK, Kolodgie FD, Ladich E, et al. Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48:193-202.
4. Finn AV, Joner M, Nakazawa G, Kolodgie F, Newell J, John MC, et al. Pathological correlates of late drug-eluting stent thrombosis: strut coverage as a marker of endothelialization. *Circulation*. 2007;115:2435-41.
5. Joner M, Nakazawa G, Finn AV, Quee SC, Coleman L, Acampado E, et al. Endothelial cell recovery between comparator polymer-based drug-eluting stents. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52:333-42.
6. Wilson GJ, Nakazawa G, Schwartz RS, Huijbregtse B, Poff B, Herbst TJ, et al. Comparison of inflammatory response after implantation of sirolimus- and paclitaxel-eluting stents in porcine coronary arteries. *Circulation*. 2009;120:141-9.
7. Pérez de Prado A, Pérez Martínez C, Cuellas Ramón C, Gonzalo Orden JM, Altonaga JR, García Iglesias MJ, et al. Endothelialization of nonapposed stent struts located over the origin of a side branch. *J Interv Cardiol*. 2009;22:222-7.
8. Farb A, Tang AL, Shroff S, Sweet W, Virmani R. Neointimal responses 3 months after (32)P beta-emitting stent placement. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2000;48:889-98.
9. Schwartz RS, Edelman E, Virmani R, Carter A, Granada JF, Kaluza GL, et al. Drug-eluting stents in preclinical studies: updated consensus recommendations for preclinical evaluation. *Circ Cardiovasc Interv*. 2008;1:143-53.
10. Pérez De Prado A, Pérez C, Cuellas C, Regueiro M, Diego A, De Miguel A, et al. Vascular healing response to simvastatin-eluting-stent (IRIST®) in a swine coronary model. *EuroInterven*. 2009;5:E103.

## Artículo original

La reestenosis en el *stent* depende del daño vascular inducido. ¿Son válidos los modelos experimentales actuales de análisis de los *stents* farmacoactivos?

Alejandro Diego<sup>a,\*</sup>, Armando Pérez de Prado<sup>a</sup>, Carlos Cuellas<sup>a</sup>, Claudia Pérez-Martínez<sup>a</sup>, Manuel Gonzalo-Orden<sup>a</sup>, Jose R. Altonaga<sup>a</sup>, Antonio de Miguel<sup>a</sup>, Marta Regueiro<sup>a</sup>, Jose Ajenjo<sup>a</sup>, Fernando Sánchez-Lasheras<sup>b</sup>, Ángel Álvarez-Arenal<sup>b</sup> y Felipe Fernández-Vázquez<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Fundación Investigación Sanitaria e Instituto de Biomedicina (IBIOMED) de León, Complejo Asistencial Universitario, León, España

<sup>b</sup>Universidad de Oviedo, Oviedo, Asturias, España

## Historia del artículo:

Recibido el 5 de noviembre de 2010

Aceptado el 17 de marzo de 2011

On-line el 22 de junio de 2011

## Palabras clave:

*Stent* farmacoactivo

Respuesta proliferativa

Reestenosis

Paclitaxel

Modelo porcino

## RESUMEN

**Introducción y objetivos:** Los *stents* farmacoactivos son una herramienta útil para prevenir la reestenosis, pero los mecanismos involucrados en la respuesta proliferativa tras su implante aún no son conocidos en su totalidad. El objetivo de este estudio es comparar la histomorfometría vascular coronaria tras el implante de *stents* sin recubrir o *stents* farmacoactivos en un modelo porcino.

**Métodos:** En 20 hembras de cerdos de la raza Large White de 2 meses de edad se implantó de forma aleatoria un total de 60 *stents* distribuidos en dos grupos: convencionales (n = 20) y farmacoactivos (paclitaxel) (n = 40). A los 28 días se procedió a eutanasia y análisis histomorfométrico. Se clasificó el grado de daño vascular en función de integridad o rotura de la túnica limitante elástica interna.

**Resultados:** En el grupo de integridad de lámina elástica interna no se encontraron diferencias significativas entre *stents* farmacoactivos y *stents* convencionales para las variables área de neointima y porcentaje de reestenosis (1,3 [1,1-2,2] frente a 2 [1,3-2,5] mm<sup>2</sup>; p = 0,6; y 14 [12,1-20,8] frente a 22,2 [14,1-23,3] %; p = 0,5). En cambio, en el grupo de rotura de la lámina elástica interna sí se encontraron diferencias significativas (área de neointima, 1,2 [0,8-2] frente a 2,9 [2,3-3,7] mm<sup>2</sup>; p = 0,001 y porcentaje de reestenosis, 16,63 [11,2-23,5] frente a 30,4 [26,4-45,7] %; p = 0,001).

**Conclusiones:** En el modelo porcino de coronarias sanas, la integridad de la lámina elástica interna no permite apreciar diferencias en la respuesta proliferativa entre *stent* farmacoactivo y convencional; la diferencia se establece sólo cuando el daño vascular es más profundo.

© 2010 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

### Instent Restenosis Related to Vessel Injury Score Degree. Are Current Experimental Models Valid for Drug-Eluting Stents Analysis?

## ABSTRACT

**Introduction and objectives:** Drug-eluting stents are useful for preventing restenosis, but the patho-physiological processes involved in the proliferative response after implantation are still not known in detail. The aim of this study is to compare the coronary vascular histomorphometry after implanting drug-eluting stents and bare metal stents in a swine model.

**Methods:** Sixty stents were randomly implanted in 20 Large White female pigs with a ratio of baremetal/drug-eluting stents of 1:2. After 28 days, euthanasia and histomorphometry were performed. We defined the vessel injury score in accordance to whether the internal elastic lamina was intact or ruptured.

**Results:** There were no differences between drug-eluting stents and bare metal stents in the intact internal elastic lamina group regarding neointimal area or % restenosis (1.3 [1.1-2.2]) vs 2.0 [1.3-2.5] mm<sup>2</sup>; P=.6; and 14.0 [12.1-20.8] vs 22.2 [14.1-23.3] %; P=.5). We assessed statistically significant differences for the ruptured internal elastic lamina group, (neointimal area 1.2 [0.8-2.0] vs 2.9 [2.3-3.7] mm<sup>2</sup>; P=.001 and % restenosis 16.63 [11.2-23.5] vs 30.4 [26.4-45.7] %; P=.001).

**Conclusions:** In our swine model, we did not find any differences between proliferative response of drug-eluting stents and bare metal stents when the internal elastic lamina is intact; differences are only found when vascular injury is deeper.

Full English text available from: [www.revespcardiol.org](http://www.revespcardiol.org)

© 2010 Sociedad Española de Cardiología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

## Keywords:

Drug-eluting stent

Proliferative response

Restenosis

Paclitaxel

Swine model

## VÉASE CONTENIDO RELACIONADO:

DOI: 10.1016/j.revesp.2011.05.010, Rev Esp Cardiol. 2011; 64:739-42.

\* Autor para correspondencia: Sección de Hemodinámica y Cardiología Intervencionista, Servicio de Cardiología, Hospital de León, Altos de Nava s/n, 24071 León, España. Correo electrónico: [alejandrodiego@secardiologia.es](mailto:alejandrodiego@secardiologia.es) (A. Diego).

### Abreviaturas

AL: área luminal  
 AN: área de neointima  
 IS: *Injury Score*  
 SC: *stent* convencional  
 SFA: *stent* farmacológico

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el modelo porcino de coronarias sanas es el modelo animal experimental considerado como estándar en la evaluación de las distintas plataformas, polímeros y principios de los *stents* liberadores de fármaco, tanto por la conocida similitud anatómica y fisiológica como por la rápida evolución de los procesos biológicos en este animal.

Esta similitud entre humanos y los modelos porcinos no se limita a la anatomía y la fisiología, sino que también se extiende al sistema de reparación tisular de las lesiones producidas a nivel miocárdico<sup>1-3</sup> y la respuesta proliferativa o reestenosis tras la implantación de un *stent* coronario<sup>3-5</sup>.

Esta respuesta proliferativa, principal determinante del resultado a largo plazo de los *stents*, ha sido considerablemente disminuida con la introducción de los *stents* farmacológicos (SFA). De todos modos, a pesar de los resultados alentadores de los ensayos clínicos<sup>6-10</sup>, durante los últimos años se ha planteado la posibilidad de que los SFA, por su mecanismo de acción, puedan presentar tasas superiores de trombosis tardía secundaria a problemas, como la retirada de terapia antiagregante<sup>11</sup>, la mala posición tardía<sup>12</sup>, la falta de endotelización<sup>13</sup> o la inflamación crónica<sup>14,15</sup>. Es por este motivo que la valoración en el modelo experimental de la reacción endotelial e intimal de los nuevos dispositivos antes de su salida al mercado ha experimentado un incremento de su relevancia.

En este sentido, el estudio histomorfológico de los *stents* a los 28 días de su implante es un capítulo obligatorio en la evaluación preclínica de estos dispositivos. Los factores que puedan modificar la respuesta biológica al implante de diferentes dispositivos intravasculares en este modelo experimental han de ser tenidos en cuenta muy cuidadosamente antes de trasladar las conclusiones de los estudios experimentales al humano.

Si bien la relación entre grado de daño vascular y reestenosis es un fenómeno descrito<sup>16</sup>, los estudios preclínicos no siempre aportan este dato por la dificultad que entraña su adquisición.

El objetivo de este estudio fue estudiar las diferencias observadas en un modelo de *stent* coronario porcino entre *stents* convencionales y SFA y relacionarlas con el grado de daño vascular inducido durante el implante.

## MÉTODOS

### Muestra

Se seleccionaron 20 animales hembra de la raza porcina Large White de 2 meses de edad para un peso de 25-30 kg. Todo su manejo se realizó cumpliendo la legislación vigente de la Unión Europea en materia de experimentación animal, siguiendo las directrices establecidas en el RD 223/98, de 14 de marzo, sobre protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Se realizó implante múltiple de *stents* en los segmentos proximales de las tres arterias coronarias para obtener un tamaño muestral total de 60 segmentos tratados.

Además, se realizaron 22 extracciones de segmentos arteriales no tratados para ser utilizados como grupo control de las variables histomorfológicas de arterias sanas.

### Procedimiento

#### Medicación y monitorización

El día previo al procedimiento los animales eran aislados y se iniciaba medicación antiagregante oral con 100 mg de ácido acetilsalicílico y dosis de carga de 300 mg de clopidogrel. Posteriormente, se mantuvo dosis de mantenimiento de 100 mg y 75 mg, respectivamente, cada 24 h durante todo el tiempo de seguimiento, así como 20 mg/kg de ciprofloxacino como profilaxis antibiótica.

El día del procedimiento, se premedicó a los animales con 0,35 mg/kg de midazolam, 5 mg/kg de ketamina y 0,02 mg/kg de atropina vía intramuscular. Una vez comprobado que el grado de sedación era el adecuado, se procedió a inducción anestésica con propofol, a dosis de 2 a 4 mg/kg vía intravenosa lenta, intubación endotraqueal y conexión a sistema de ventilación controlada por volumen y manteniendo la anestesia con isoflurano al 2%.

Durante todo el procedimiento se realizó monitorización de pulsioximetría, electrocardiografía y presión arterial invasiva. Como medicación intraoperatoria se administraron 5.000 UI de heparina sódica, 2,5 mg/kg de cefquinona vía intramuscular como antibioterapia profiláctica y 0,01 mg/kg de buprenorfina vía intramuscular como medida analgésica.

#### Implante

Tras acceso quirúrgico a la arteria carótida derecha, se procedió a canalizarla con introductor arterial de 6 F y cateterización selectiva de los *ostia* coronarios con catéter guía tipo Amplatz modificado específicamente diseñado para este estudio (Iberhospitex, S.A.), que permite la canalización adecuada de ambos *ostia* con el mismo catéter. Tras avance de la guía hacia el lecho distal, se procedió al implante de *stents* siguiendo una tabla de asignación aleatoria previamente diseñada.

Todos los *stents* implantados fueron de iguales calibre y longitud (3,5 × 18 mm) y se les aplicó una presión de inflado del balón suficiente para alcanzar una relación diámetro del *stent*:diámetro de la arteria de entre 1,2:1 y 1,3:1 (entre 12 y 16 atmósferas, siendo la presión nominal del dispositivo de 10 atmósferas). En total se implantaron 60 *stents* distribuidos en dos grupos:

- GRUPO SC: 20 segmentos arteriales con *stent* convencional.
- GRUPO SFA: 40 segmentos arteriales con *stent* recubierto de paclitaxel.

#### Eutanasia

Al cabo de 28 días de seguimiento se procedió al sacrificio mediante la administración intravenosa del agente T61® (0,3 ml/kg; Intervet, España), previa sedación con midazolam (0,35 mg/kg) y ketamina (5 mg/kg) administrados vía intramuscular. Se suministró una dosis de 10.000 UI de heparina sódica para facilitar la limpieza de los preparados.

Las arterias coronarias se perfundieron *in situ* con suero salino tamponado con fosfato a una presión aproximada de

100-110 mmHg. Tras ello, se realizó su disección de la superficie epicárdica, respetando los 5 mm proximales y distales al *stent*. A continuación, se procedió a su fijación en formol tamponado al 10% durante 24-48 h a temperatura ambiente.

#### Análisis histomorfométrico

Para su estudio histológico, las secciones se incluyeron en resina y, tras el corte con micrótopo, se tiñeron mediante la técnica de tricrómico de Masson y técnica de Verhoeff-Van-Gieson para fibras elásticas y posterior análisis histomorfométrico a un aumento fijo ( $\times 15$ ), mediante un microscopio estereoscópico trifocal (Olimpus SZ61) con cámara digital incorporada conectada a sistema de computación. Para la adquisición de las imágenes se utilizaron las herramientas proporcionadas por el programa de análisis de imágenes Image-Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics S.A.) (fig. 1).

Se obtuvieron las siguientes medidas directas o primarias:

- LEE: área incluida dentro de la lámina elástica externa.
- LEI: área delimitada por la lámina elástica interna.
- AL: área ocupada por la luz de la arteria.

A partir de estas áreas se calculaban cuatro nuevas medidas indirectas o secundarias:

- ATM: área de la túnica media (LEE-LEI).
- AN: área de la neointima (LEI-AL).
- Porcentaje de reestenosis por área:  $[1 - (AL / LEI)] \times 100$  (porcentaje de neointima que ocupa el área de la LEI).

- Índice AN/LEE (relación entre el AN y el área de LEE).

También para cada corte se calculó el grado de daño vascular o *Injury Score* (IS) de cada uno de los *struts* del *stent*, únicamente atendiendo a la integridad o no de la LEI (según el IS modificado de las clasificaciones de Schwartz et al<sup>16</sup> y Gunn et al<sup>17</sup>), de tal forma que se consideró IS-1 ante integridad de lámina limitante elástica interna e IS-2 ante su rotura.

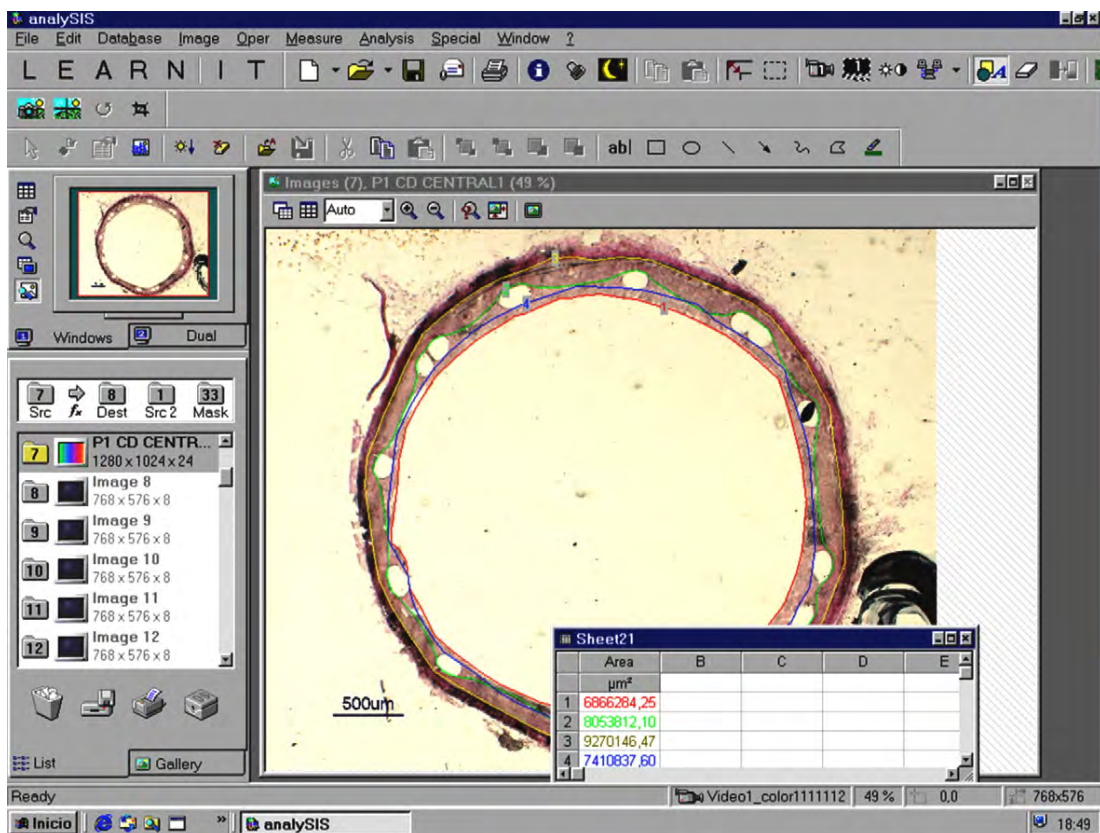
Toda la evaluación histomorfométrica fue realizada por un anatomopatólogo cualificado que en todo momento desconocía a qué tipo de *stent* correspondían los cortes.

#### Análisis estadístico

La estadística descriptiva univariable se resolvió con medidas de tendencia central y dispersión cuando los datos eran cuantitativos y con frecuencias/porcentajes cuando eran cualitativos.

La normalidad de las variables se determinó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov.

En la estadística analítica bivariable se emplearon pruebas paramétricas y no paramétricas según procedía. En las pruebas paramétricas para la comparación de las variables cualitativas se empleó el test de la  $\chi^2$  y para la comparación de variables cuantitativas, el test ANOVA con el test de comparaciones múltiples *a posteriori* de Tukey. La homogeneidad de las varianzas se determinó mediante el test de Barlett. Para todos los análisis se consideraron las diferencias como estadísticamente significativas si  $p = 0,05$ .



**Figura 1.** Ejemplo de análisis histomorfométrico, cuantificación computarizada de áreas. Captura de pantalla del programa Image-Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics S.A.) durante el análisis de una de las muestras con *stent* implantado.

## Análisis multivariable

Para añadir una mayor consistencia a los datos se comprobó a través de un modelo de regresión lineal la correlación y la significación de las diferentes variables histomorfológicas y su proporcionalidad al grado de daño vascular.

El estudio de la influencia de las variables discretas sobre el grado de reestenosis y de AN se realizó mediante la aplicación de modelos multivariables de *splines* adaptativos regresivos (MARS).

La explotación de los datos se llevó a cabo con el programa SPSS versión 15.0 (<http://www.spss.com/es/>) para Windows y el programa Minitab versión 15.0 (<http://www.minitab.com/es-ES/default.aspx>).

## RESULTADOS

### Procedimiento

La tasa de éxito primario del procedimiento fue del 100%. Fallecieron 2 animales (con 6 segmentos tratados con *stent* en total) a las pocas horas tras el procedimiento por causa arritmica y se completó el seguimiento de 4 semanas en los 18 animales restantes.

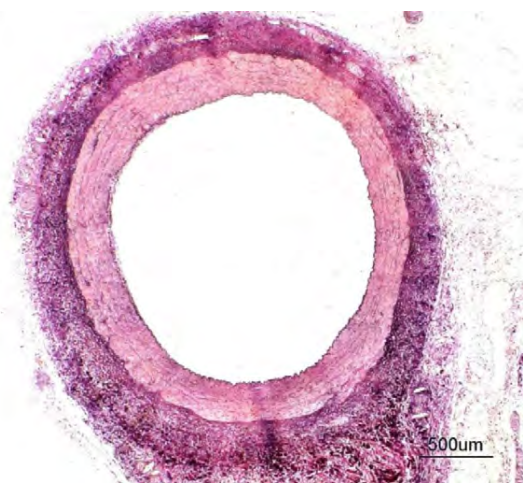
Además, se eliminaron del análisis 10 segmentos arteriales: 7 por sobreexpansión del *stent* que rompió la capa media (3 casos) y adventicia (4 casos) de la arteria, con una gran reacción granulomatosa. Otros 3 segmentos se destruyeron en el proceso de inclusión en resina.

Por lo tanto, el análisis final se realizó sobre 18 animales y 44 segmentos arteriales tratados, más 22 segmentos arteriales no tratados como controles sanos.

### Histomorfometría

Grupo control: se extrajeron 22 segmentos arteriales proximales a las zonas de implante para servir como grupo control (fig. 2). Al no presentar *stent*, las variables LEI y AL coinciden. Las características observadas se resumen en la tabla 1.

Grupo de estudio: en los segmentos tratados se encontró un incremento significativo del tamaño del vaso con respecto a los segmentos control. No se encontraron diferencias en el grado de



**Figura 2.** Corte histológico de una arteria coronaria porcina sana (segmento proximal)  $\times 10$  aumentos tras tinción con hematoxilina-eosina y tinción de Van-Gieson, que permite la visualización de las 3 capas arteriales, así como las láminas limitantes elástica interna y externa (en negro).

**Tabla 1**

Características histomorfológicas de una arteria coronaria porcina sana (n=22)

Variables	Mediana [intervalo intercuartílico]
LEE (mm <sup>2</sup> )	3,64 [2,94-4,45]
LEI (mm <sup>2</sup> )	2,44 [1,83-2,68]
ATM (mm <sup>2</sup> )	1,36 [1-1,76]
AL (mm <sup>2</sup> )	2,44 [1,83-2,68]

AL: área luminal; ATM: área de la túnica media; LEE: lámina elástica externa; LEI: lámina elástica interna.

**Tabla 2**

Tabla de contingencia de daño vascular en función de la arteria tratada

	Arteria circunfleja	Coronaria derecha	Descendente anterior	Total
IS-1	6	12	6	24
IS-2	8	4	8	20
Total	14	16	14	44

IS: Injury Score.  
 $\chi^2=4,243$ ;  $p=0,12$ .

daño vascular en función de la arteria tratada (tabla 2) y se graduó como IS-1, con integridad de la LEI en el 55% de los casos e IS-2 en el 45%.

Al comparar los SC con los SFA, independientemente del grado de daño vascular, los *stents* liberadores de paclitaxel presentaron significativamente menor AN y reestenosis y mayor AL que los *stents* sin recubrir (AN, 1,26 [0,99-2,09] frente a 2,54 [2,26-3,14] mm<sup>2</sup>;  $p < 0,001$ . Reestenosis, 15,4 [12,13-21,44] frente a 29 [23,54-38,66] %;  $p < 0,001$ ; AL, 7,84 [6,87-8,24] frente a 5,96 [5,14-6,94];  $p = 0,006$ ).

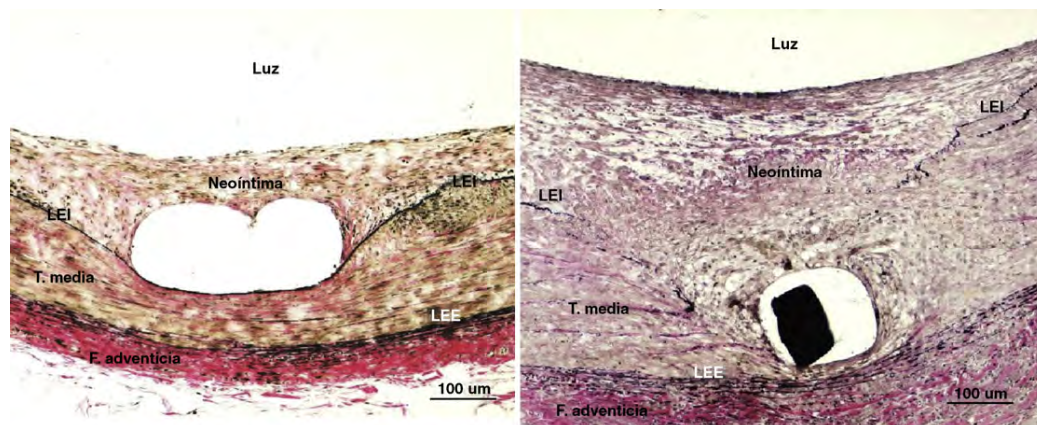
Analizados en función del grado de daño vascular (fig. 3), los segmentos con daño vascular más profundo (IS-2) presentaron un menor tamaño de luz vascular y un mayor porcentaje de reestenosis con respecto al grupo de IS-1 (tabla 3). En cuanto al tipo de *stent* implantado, en el grupo de IS-1 no se encontraron diferencias significativas en los parámetros de proliferación neointimal, mientras que estas diferencias sí aparecieron, y de forma estadísticamente significativa, dentro del grupo de IS-2 (tabla 4).

### Análisis multivariable

Se realizó un modelo de regresión lineal de la variable reestenosis calculado en función de las variables LEI, LEE, ATM, AN, AL, AN/LEE y presión de inflado (PI). Una vez eliminadas las variables que presentaban valor más elevado del coeficiente  $p$ , se adquirió un modelo óptimo formado por las variables ATM, AL y AN/LEE, con un  $R^2$  del 98,9% (el mismo valor que el modelo realizado con las siete variables).

Al analizar cómo la presencia o ausencia de paclitaxel influía en la variable reestenosis, se observó que la presencia de paclitaxel, de forma independiente, disminuyó el grado de reestenosis, si bien este efecto era más apreciable a mayor grado de daño vascular, como queda reflejado en la figura 4.

Se efectuó, a su vez, un modelo MARS de la variable «reestenosis» en función de LEE, LEI, AL, ATM, AN, AN/LEE, PI, tipo de *stent*, IS y arteria tratada. Este modelo permite no sólo incluir las variables continuas, sino también las discretas, que este tipo de modelos puede procesar de forma adecuada. Tras la etapa inicial de descarte de variables, el modelo MARS resultante sólo encontró como significativas las variables AN/LEE, LEI, AN, ATM e IS.



**Figura 3.** Histología. Cortes  $\times 100$  aumentos con tinción con hematoxilina-eosina más tinción de Van-Gieson sobre la zona de aposición de uno de los *struts* para la identificación de la lámina elástica interna. A la izquierda, daño vascular tipo 1 (integridad de la lámina elástica interna). A la derecha, daño vascular tipo 2 (rotura de lámina elástica interna). LEE: lámina elástica externa; LEI: lámina elástica interna.

**Tabla 3**

Características histomorfométricas de los segmentos tratados en función del daño vascular

	IS-1 (n=24)	IS-2 (n=20)	p
LEE (mm <sup>2</sup> )	11,04 [10,24-12,27]	10,99 [9,48-12,13]	0,005
LEI (mm <sup>2</sup> )	9,4 [8,69-10,35]	8,57 [7,54-9,36]	0,01
ATM (mm <sup>2</sup> )	1,81 [1,47-2,07]	1,61 [1,43-1,7]	0,044
AN (mm <sup>2</sup> )	1,37 [1,13-2,32]	2,3 [1,24-3,06]	0,062
AL (mm <sup>2</sup> )	8,03 [7,29-8,36]	6,03 [4,98-7,18]	0,001
PI (atm)	14 [12,25-15,75]	14 [13-16]	0,461
AN/LEE	0,13 [0,1-0,19]	0,22 [0,14-0,31]	0,003
Reestenosis (%)	15,27 [12,09-22,34]	26,38 [17,33-35,17]	0,003

AL: área luminal; AN: área de neointima; AN/LEE: índice entre área de neointima y área de lámina elástica externa; ATM: área de la túnica media; IS: *Injury Score*; LEE: lámina elástica externa; LEI: lámina elástica interna; PI: presión de implante. Los resultados de las variables se expresan como mediana [intervalo intercuartílico].

## DISCUSIÓN

### Modelo

En la actualidad no existe un modelo animal ideal de enfermedad cardiovascular humana, aunque el daño vascular y la respuesta proliferativa neointimal en el modelo porcino de lesión de la arteria coronaria y en el modelo de lesión de la arteria iliaca de conejo son similares a los procesos que ocurren durante la reestenosis humana<sup>16,18</sup>. A pesar de que el daño vascular provocado en las arterias de ambos modelos difiere del provocado en las arterias ateroscleróticas humanas, los estudios experimentales señalan una importante relación entre inflamación, daño vascular y crecimiento neointimal, al igual que sucede en las

arterias coronarias humanas<sup>19,20</sup>. Los resultados histológicos de este estudio confirman que la respuesta proliferativa observada es proporcional al daño vascular provocado por la sobreexpansión del *stent*.

### Daño vascular

El hallazgo más interesante de este estudio es la relación encontrada entre la profundidad del daño vascular durante el implante del *stent* y la reacción proliferativa de la íntima o, lo que es lo mismo, entre el IS y la reestenosis.

En nuestra muestra el daño vascular se graduó como IS-1 en un 55% de los casos y como IS-2 en un 45%. En esta línea, nuestros datos están de acuerdo con los datos publicados por Gunn et al<sup>17</sup> que mostraron, en modelos porcinos, que la compresión de la capa media con integridad de la LEI era incluso más frecuente que daños vasculares más profundos.

Según esta teoría, esta compresión de la túnica media debe considerarse como el «estímulo global» más importante tras el daño vascular de grado moderado y, lo que es más trascendente, tiene una correlación positiva con la intensidad de la respuesta de formación de neointima. Nuestros resultados confirman, pues, que la variabilidad de la respuesta proliferativa es proporcional al grado de daño vascular, a pesar de que en el grupo de SFA esta respuesta se encuentre atenuada.

La explicación a los posibles mecanismos por los que la compresión de la capa túnica media induce proliferación neointimal se centra en que el impacto del *stent* comprime las células musculares lisas alrededor de cada *strut*, pudiendo llegar a causar atrofia de la media y las células muertas, ya sea por necrosis o por apoptosis, entonces pueden desencadenar los procesos biológicos de cicatrización que conducen a la formación de neointima. Otra posibilidad es que la compresión sea transmitida

**Tabla 4**

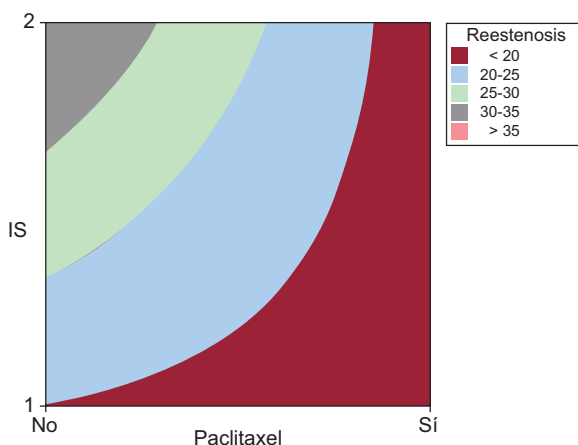
Características histomorfométricas de los segmentos tratados en función del daño vascular y el tipo de *stent* implantado

	IS-1		p	IS-2		p
	SFA (n=20)	SC (n=4)		SFA (n=9)	SC (n=11)	
AN (mm <sup>2</sup> )	1,32 [1,1-2,15]	2,02 [1,26-2,49]	0,6	1,22 [0,8-1,95]	2,9 [2,27-3,66]	0,001
AL (mm <sup>2</sup> )	7,91 [7,29-8,35]	8,21 [6,51-8,6]	0,99	7,26 [5,17-8,15]	5,4 [4,93-6,48]	0,054
Reestenosis (%)	13,96 [12,09-20,8]	22,23 [14,07-23,27]	0,45	16,63 [11,16-23,47]	30,44 [26,38-45,74]	0,001

AL: área luminal; AN: área de neointima; IS: *Injury Score*; SC: *stent* convencional; SFA: *stent* farmacoactivo. Los resultados de las variables se expresan como mediana [intervalo intercuartílico].

750

A. Diego et al/Rev Esp Cardiol. 2011;64(9):745-751



**Figura 4.** Gráfico de contorno realizado mediante el software estadístico Minitab15.0 de las variables *Injury Score* y paclitaxel frente a la variable reestenosis, que muestra la relación proporcional de influencia del daño vascular durante el implante y la presencia o ausencia de fármaco en el *stent* sobre el grado de respuesta proliferativa neointimal. Se observa que los valores más altos de reestenosis pertenecen a los *stents* sin fármaco y con IS cualitativo igual a 2. Nótese que si bien para *stents* sin fármaco el valor de la reestenosis puede tener cualquier valor dentro del rango, los *stents* con fármaco sólo presentan los valores más bajos de reestenosis. IS: *Injury Score*.

célula a célula por moléculas de adhesión o integrinas intracitoplasmáticas que pueden activar quinasas o metaloproteasas que conducen a la proliferación neointimal y/o a la formación de tejido conectivo<sup>21-23</sup>.

### Eficacia de los *stents* farmacoactivos

El grupo de SFA tuvo una respuesta proliferativa significativamente menor que el grupo de SC, referido a un incremento de la luz del vaso y una reducción en el AN y de la reestenosis. No obstante, al comparar los *stents* con o sin paclitaxel en función del grado de daño vascular, las diferencias significativas en las variables de proliferación se mantienen exclusivamente en el subgrupo de mayor daño vascular. Así, al comparar independientemente cada grupo en función del daño vascular, el grupo de SC mostró diferencias significativas en las variables de proliferación, pero no así el grupo con fármaco.

Un estudio recientemente publicado por Eshthardi et al<sup>24</sup>, realizado en humanos tras implante de SFA, mostró precisamente una ausencia de relación entre el grado de daño vascular analizado mediante ultrasonografía intravascular y la respuesta proliferativa al utilizar este tipo de *stents*. Esto refuerza la conclusión de que la presencia de fármaco en el dispositivo implantado inhibe eficazmente la respuesta proliferativa desencadenada por la agresión vascular, de manera que tras el implante de SFA no se encuentran diferencias en cuanto a reestenosis entre los grupos con o sin rotura de la LEI, ya que esta se encuentra muy atenuada.

Según esto, en nuestro estudio podemos afirmar que el *stent* recubierto de paclitaxel es significativamente superior al *stent* sin recubrir en términos globales de eficacia antiproliferativa, con una reducción del 55% de la hiperplasia neointimal y del 52% de reestenosis; sin embargo, cuando existe integridad de la LEI, no se aprecia un beneficio significativo con respecto al SC.

Al aplicar los modelos de análisis multivariable a los datos obtenidos en este modelo, comprobamos que la respuesta proliferativa de los SFA en función del daño vascular no guarda el mismo grado de proporcionalidad que los *stents* convencionales, pues a partir de un punto de corte definido por la rotura de la LEI la

respuesta proliferativa está marcada no por el grado de daño vascular, sino por la eficacia antiproliferativa del fármaco. Esta observación, aparentemente obvia, conlleva implicaciones clínicas y de eficiencia considerables, pues aunque en la práctica clínica no es una situación frecuente, cuando existe integridad de la LEI no existiría un beneficio adicional significativo con el uso de SFA.

Teniendo en cuenta estos datos a la hora de diseñar los estudios experimentales preclínicos, el grado de daño vascular durante el implante debe ser minuciosamente evaluado para tener en cuenta su posible modificación de la reacción proliferativa de la íntima.

Algunos autores señalan que la integridad de la LEI ejerce de barrera y previene la migración de las células musculares lisas o sus progenitoras y que con su rotura se perdería esta función<sup>25,26</sup>. Hasta hace poco se admitía que la reestenosis condicionaba un cambio fenotípico de las células musculares lisas, desde células contráctiles hacia células con capacidad de síntesis. Sin embargo, se está incrementando la evidencia de que los componentes celulares de la neointima se originan desde los miofibroblastos adventiciales<sup>26-29</sup> o de células madre derivadas de la médula ósea que migran a través de la adventicia a las capas media e íntima<sup>30,31</sup>, por lo que parece lógico suponer que, a mayor proximidad de la agresión vascular a esta zona, mayor será el estímulo proliferativo.

Es posible que en el futuro estas observaciones lleven la investigación sobre SFA hacia la búsqueda de distintos mecanismos de liberación del fármaco que puedan hacerlo más efectivo.

### Limitaciones del estudio

Este trabajo presenta las limitaciones propias de los modelos experimentales de reestenosis en mamífero grande, como son el relativamente escaso número de animales de experimentación, la utilización exclusivamente de animales hembras para evitar la mortalidad arrítmica y el hecho de inducir una lesión sobre una arteria sana. Si bien la respuesta proliferativa obtenida permite evaluar la actividad del fármaco, desconocemos si este efecto sería el mismo en coronarias con alto contenido de material ateroesclerótico y en las que, por lo tanto, aparecen ya de forma espontánea zonas de fragmentación de la LEI como parte del proceso global de inflamación de la placa, especialmente en caso de placa vulnerable<sup>32</sup>, y presentan participación de otros mediadores bioquímicos en el proceso de reparación vascular. Además, otros factores moleculares o genéticos de los pacientes con aterosclerosis como la mayor presencia de lipoproteínas de baja densidad oxidadas, la hiperglucemia o la hipertensión arterial, pueden intervenir directamente en el proceso. A pesar de ello, el modelo coronario porcino sigue siendo el recomendado por consenso para la evaluación de este tipo de dispositivos.

### CONCLUSIONES

Los *stents* coronarios recubiertos de paclitaxel disminuyen de forma significativa la reestenosis con respecto a los *stents* sin recubrir en un modelo experimental porcino. Esta diferencia en la intensidad de la respuesta proliferativa se establece en los casos de daño vascular profundo con rotura de la LEI durante el implante. Sin embargo, este beneficio no es objetivable en el caso de que la LEI permanezca íntegra.

Estos datos deberán ser tenidos en cuenta a la hora de plantear el diseño y análisis de futuros estudios experimentales dirigidos a evaluar la capacidad antiproliferativa de los diferentes fármacos citostáticos utilizados en la prevención de la reestenosis de dispositivos intracoronarios.



**CONFLICTO DE INTERESES**

Ninguno.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Bloor BC, Frankland M, Alper G, Raybould D, Weitz J, Shurtliff M. Hemodynamic and sedative effects of dexmedetomidine in dog. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992;263:690-7.
- Gal D, Chokshi SK, Mosseri M, Clarke RH, Isner JM. Percutaneous delivery of low-level laser energy reverses histamine-induced spasm in atherosclerotic Yucatan microswine. *Circulation*. 1992;85:756-68.
- Swindle MM, Smith AC, Goodrich JA. Chronic cannulation and fistulization procedures in swine: a review and recommendations. *J Invest Surg*. 1998;11:7-20.
- White FC, Bloor CM. Coronary vascular remodeling and coronary resistance during chronic ischemia. *Am J Cardiovasc Pathol*. 1992;4:193-202.
- Stanley WC. In vivo models of myocardial metabolism during ischemia: application to drug discovery and evaluation. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2000;43:133-40.
- Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, Fajadet J, Ban Hayashi E, Perin M, et al. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med*. 2002;346:1773-80.
- Colombo A, Drzewiecki J, Banning A, Grube E, Hauptmann K, Silber S, et al. Randomized study to assess the effectiveness of slow- and moderate-release polymer-based paclitaxel-eluting stents for coronary artery lesions. *Circulation*. 2003;108:788-94.
- Grube E, Silber S, Hauptmann KE, Mueller R, Buellesfeld L, Gerckens U, et al. TAXUS I: six- and twelve-month results from a randomized, double-blind trial on a slow-release paclitaxel-eluting stent for de novo coronary lesions. *Circulation*. 2003;107:38-42.
- Moses JW, Leon MB, Popma JJ, Fitzgerald PJ, Holmes DR, O'Shaughnessy C, et al. Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med*. 2003;349:1315-23.
- Stone GW, Ellis SG, Cox DA, Hermiller J, O'Shaughnessy C, Mann JT, et al. One-year clinical results with the slow-release, polymer-based, paclitaxel-eluting TAXUS stent: the TAXUS-IV trial. *Circulation*. 2004;109:1942-7.
- McFadden EP, Stabile E, Regar E, Cheneau E, Ong AT, Kinnaird T, et al. Late thrombosis in drug-eluting coronary stents after discontinuation of antiplatelet therapy. *Lancet*. 2004;364:1519-21.
- Kozuma K, Costa MA, Sabate M, Serrano P, Van der Giessen WJ, Ligthart JM, et al. Late stent malapposition occurring after intracoronary beta-irradiation detected by intravascular ultrasound. *J Invasive Cardiol*. 1999;11:651-5.
- Jakabcin J, Bystron M, Spacek R, Veselka J, Kvasnak M, Kala P, et al. The lack of endothelialization after drug-eluting stent implantation as a cause of fatal late stent thrombosis. *J Thromb Thrombolysis*. 2008;26:154-8.
- Farb A, Heller PF, Shroff S, Cheng L, Kolodgie FD, Carter AJ, et al. Pathological analysis of local delivery of paclitaxel via a polymer-coated stent. *Circulation*. 2001;104:473-9.
- Van der Giessen WJ, Lincoff AM, Schwartz RS, Van Beusekom HM, Serruys PW, Holmes Jr DR, et al. Marked inflammatory sequelae to implantation of biodegradable and nonbiodegradable polymers in porcine coronary arteries. *Circulation*. 1996;94:1690-7.
- Schwartz RS, Huber KC, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vlietstra RE, et al. Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model. *J Am Coll Cardiol*. 1992;19:267-74.
- Gunn J, Arnold N, Chan KH, Shepherd L, Cumberland DC, Crossman DC. Coronary artery stretch versus deep injury in the development of in-stent neointima. *Heart*. 2002;88:401-5.
- Kornowski R, Hong MK, Tio FO, Bramwell O, Wu H, Leon MB. In-stent restenosis: contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31:224-30.
- Schwartz RS, Henry TD. Pathophysiology of coronary artery restenosis. *Rev Cardiovasc Med*. 2002;3Suppl5:S4-9.
- Farhan S, Hemetsberger R, Matiasek J, Strehlow C, Pavo N, Khorsand A, et al. Implantation of paclitaxel-eluting stent impairs the vascular compliance of arteries in porcine coronary stenting model. *Atherosclerosis*. 2009;202:144-51.
- Garasic JM, Edelman ER, Squire JC, Seifert P, Williams MS, Rogers C. Stent and artery geometry determine intimal thickening independent of arterial injury. *Circulation*. 2000;101:812-8.
- Yang LX, Zhu J, Wang HJ, Holton RA. Enhanced apoptotic effects of novel paclitaxel analogs on NCI/ADR-RES breast cancer cells. *Anticancer Res*. 2003;23:3295-301.
- Zou Y, Dietrich H, Hu Y, Metzler B, Wick G, Xu Q. Mouse model of venous bypass graft arteriosclerosis. *Am J Pathol*. 1998;153:1301-10.
- Eshtehardi P, Cook S, Wandel S, Räber L, Wenaweser P, Togni M, et al. Impact of arterial injury on neointimal hyperplasia after implantation of drug-eluting stents in coronary arteries: an intravascular ultrasound study. *EuroIntervention*. 2010;6:467-74.
- Bauters C, Lablanche JM, Van Belle E, Niculescu R, Meurice T, Mc Fadden EP, et al. Effects of coronary stenting on restenosis and occlusion after angioplasty of the culprit vessel in patients with recent myocardial infarction. *Circulation*. 1997;96:2854-8.
- Hu Y, Zhang Z, Torsney E, Afzal AR, Davison F, Metzler B, et al. Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice. *J Clin Invest*. 2004;113:1258-65.
- Li G, Chen SJ, Oparil S, Chen YF, Thompson JA. Direct in vivo evidence demonstrating neointimal migration of adventitial fibroblasts after balloon injury of rat carotid arteries. *Circulation*. 2000;101:1362-5.
- Scott NA, Cipolla GD, Ross CE, Dunn B, Martin FH, Simonet L, et al. Identification of a potential role for the adventitia in vascular lesion formation after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries. *Circulation*. 1996;93:2178-87.
- Shi Y, O'Brien JE, Fard A, Mannion JD, Wang D, Zalewski A. Adventitial myofibroblasts contribute to neointimal formation in injured porcine coronary arteries. *Circulation*. 1996;94:1655-64.
- Fukuda D, Shimada K, Tanaka A, Kawarabayashi T, Yoshiyama M, Yoshikawa J. Circulating monocytes and in-stent neointima after coronary stent implantation. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:18-23.
- Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhisa T, et al. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med*. 2002;8:403-9.
- Chatzizisis YS, Jonas M, Coskun AU, Beigel R, Stone BV, Maynard C, et al. Prediction of the localization of high-risk coronary atherosclerotic plaques on the basis of low endothelial shear stress: an intravascular ultrasound and histopathology natural history study. *Circulation*. 2008;117:993-1002.

# Time Course of Reendothelialization of Stents in a Normal Coronary Swine Model: Characterization and Quantification

Veterinary Pathology  
48(6) 1109-1117  
© The American College of  
Veterinary Pathologists 2011  
Reprints and permission:  
sagepub.com/journalsPermissions.nav  
DOI: 10.1177/0300985811400446  
http://vet.sagepub.com



A. Pérez de Prado<sup>1</sup>, C. Pérez-Martínez<sup>1</sup>, C. Cuellas-Ramón<sup>1</sup>,  
J. Manuel Gonzalo-Orden<sup>1</sup>, M. Regueiro-Purriños<sup>1</sup>, B. Martínez<sup>1</sup>,  
M. J. García-Iglesias<sup>1</sup>, J. M. Ajenjo<sup>1</sup>, J. R. Altónaga<sup>1</sup>, A. Diego-Nieto<sup>1</sup>,  
A. de Miguel<sup>1</sup>, and F. Fernández-Vázquez<sup>1</sup>

## Abstract

Late thrombosis of coronary drug-eluting stents is an infrequent but serious complication of percutaneous transluminal coronary angioplasty. The best predictor of this event is the lack of endothelialization of stent struts. The objective of this study is to characterize and quantify the time course of endothelialization of different stents implanted in nonatherosclerotic swine coronary arteries. Thirty-three Carbofilm-coated stents were implanted percutaneously in 11 anesthetized domestic, crossbred pigs (weight  $25 \pm 3$  kg, 2 months old). Each animal received 1 stainless steel stent (SS), 1 cobalt-chromium stent (CCS), and 1 tacrolimus-eluting stent (TES) in each coronary artery. Follow-up periods were 1 day ( $n = 9$  stents), 3 days ( $n = 9$  stents), and 7 days ( $n = 15$  stents). Longitudinal sections of the stented vessels were examined using scanning electron microscopy. At 1 day, there was scarce, patchy endothelialization with areas of fibrin; the endothelialization rate was similar for all the stents (SS,  $29\% \pm 23\%$ ; CCS,  $29\% \pm 24\%$ ; TES,  $31\% \pm 25\%$ ;  $P = .9$ ). At 3 days, there were more endothelial cells but with immature features and giant cells over fibrin; the endothelialization was greater in SS and CCS than in TES (SS,  $79\% \pm 14\%$ ; CCS,  $81\% \pm 17\%$ ; TES,  $46\% \pm 9\%$ ;  $P = .007$ ). At 7 days, arteries showed better endothelialization with few giant cells; the endothelialization was greater in SS and CCS than in TES (SS,  $95\% \pm 4\%$ ; CCS,  $98\% \pm 4\%$ ; TES,  $79\% \pm 9\%$ ;  $P = .01$ ). In conclusion, the described model is useful for the analysis of endothelialization of coronary stents and facilitates measurement of its rate of formation and characterization of the involved cell types.

## Keywords

coronary stent, endothelialization, scanning electron microscopy, animal model, percutaneous transluminal coronary angioplasty

Coronary stents are universally used in the percutaneous treatment of coronary artery disease. The major limitation of these devices is the development of a hyperproliferative response to vessel injury, causing restenosis in up to one third of the cases. The use of drug-eluting stents (DES) has reduced this rate of restenosis to single-digit figures.<sup>22,45,47</sup> Nevertheless, DES have revived the fear of stent thrombosis, a potentially lethal complication,<sup>17,31</sup> that had been previously reduced to rates below 2% after the generalized use of dual antiplatelet treatment.<sup>4,25</sup> After the widely publicized controversy over a higher rate of stent thrombosis with DES, particularly regarding late (30 days to 1 year) and very late (1 year and beyond) stent thrombosis,<sup>7,36</sup> different causal factors have been identified. One of these causal factors is a significant delay in the normal reendothelialization of DES-implanted arteries.<sup>10,11,19,21,28</sup> The high antiproliferative power of the selected drugs eluted from current DES (eg, sirolimus, paclitaxel, everolimus, and zotarolimus) and their relative lack of cellular specificity may explain this issue. In addition, the polymers used in many of these devices may play an important role, being implicated

as the cause of hypersensitivity reactions, delamination, and endothelial dysfunction.<sup>12,19,29,48</sup>

DES have undergone a thorough efficacy analysis in different animal models.<sup>34</sup> The swine coronary arteries are the preferred model because of their similarity to the human anatomy and their suitability to analyze the restenosis induced by overstretch injury.<sup>40,41</sup> One month after the implantation, the swine arteries show a restenosis response similar to that observed in humans at 6 months.

However, there is disparity between nonclinical and clinical rates of reendothelialization. Although 1 month after the

<sup>1</sup>HemoLeon, Grupo Cardiovascular—Fundación Investigación Sanitaria en León, Hospital de León, e Instituto de Biomedicina IBIOMED, Universidad de León, León, Spain

## Corresponding Author:

Armando Pérez de Prado, S. Cardiología Intervencionista, Hospital de León, Altos de Nava SN, 24008 León, Spain  
Email: aperez@secardiologia.es

implantation, the stent endothelialization may be complete in animals,<sup>2,12,21</sup> observations from human necropsies show these stents may not fully endothelialized even several years after implantation.<sup>10,19,28</sup>

These differences between the animal model and humans led us to carry out this study with the following objectives: to create an endothelialization calendar for the struts of different stents in a swine model with normal coronary arteries and to characterize the cellular response that these devices trigger using scanning electron microscopy (SEM).

## Methods

### Animal Model and Procedure

Eleven animals were used to assess the progress of endothelialization, selecting 3 different follow-up periods: 1 day (3 animals), 3 days (3 animals), and 7 days (5 animals). The animals (domestic pigs, Large White race) were selected from the experimental farm of our university. They were 2 months old with a mean weight of  $25 \pm 3$  kg. All the experimental procedures and animal handling were conducted according to the European and local general directives for the protection of experimental animals (Directive 86/609/CE, R.D. 223/1988) and under the supervision of the bioethics committee of our university. The animals were pretreated with clopidogrel (300 mg) and aspirin (325 mg) 1 day before the procedure. After the procedure, the animals received aspirin (100 mg) and clopidogrel (75 mg) throughout the study period. This dual antiplatelet treatment is the recommended protocol used in humans.

The surgical and intravascular procedures were performed as described previously:<sup>32</sup> the animals were sedated with a combination of ketamine (5 mg/kg), midazolam (0.5 mg/kg), and atropine (0.04 mg/kg) by intramuscular injection. Subsequently, propofol (4 mg/kg), atracurium besylate (0.5 mg/kg), and fentanyl (2 mg/kg) were administered intravenously to achieve the appropriate grade of anesthesia verified by the absence of a limb withdrawal reflex. After the intubation, the anesthesia was maintained with isoflurane 1.5 to 3.0% (1.5 L/min). A 7F introducer sheath was inserted into a carotid artery by surgical cut down. Heparin (200 IU/kg) was administered intravenously. A 40-cm, 6F-modified AL1 guiding catheter (Cordynamic-Iberhospitex S.A., Barcelona, Spain) was placed into both coronary ostia under fluoroscopic guidance. Heart rate, blood pressure, and electrocardiogram (ECG) were monitored throughout the procedure.

### Implantation of Stents

The premounted, balloon-expandable stents were supplied by the manufacturer (CID Carbostent & Implantable Devices [formerly Sorin Vascular Therapy] s.r.l., Saluggia, Italy), and the implantation was performed at our institution.

Three different stents were used: (1) stainless steel stent (SS; Tecnic), 100- $\mu$ m strut thickness; (2) cobalt-chromium alloy stent (CCS; Chrono), closed-cell design, 80- $\mu$ m strut thickness; and (3) tacrolimus-eluting stent (TES; Carbostent DES), based

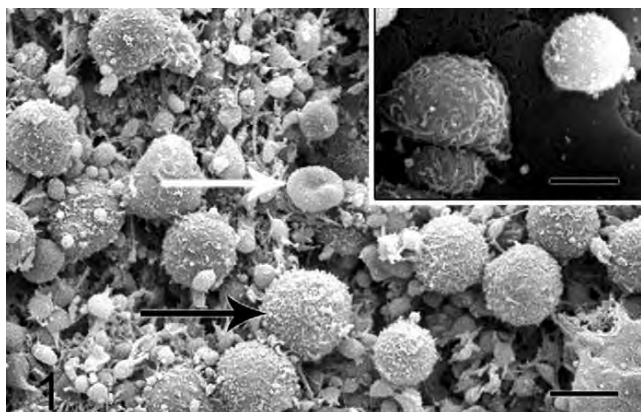
on the stainless steel stent with 110- $\mu$ m strut thickness, polymer free, with abluminal reservoirs loaded with 2.3  $\mu$ g/mm<sup>2</sup> tacrolimus. All the stents were coated with a high-density turbostratic carbon film (Carbofilm coating) and were highly biocompatible and thrombo-resistant.<sup>3,32,37</sup> Tacrolimus is a macrolide produced by *Streptomyces tsukubaensis* with strong immunosuppressive actions.<sup>24</sup> It is highly lipophilic and traverses the cell membrane without dependence on cell surface receptors. The intracellular receptors or immunophilins are the FK binding proteins (FKBP, including FKBP12). The T-immunophilin complex binds with high affinity to inhibit the calcineurin-calmodulin complex.<sup>15</sup> It inhibits platelet and neutrophil recruitment, expression of endothelial adhesion molecules, and free radical and inflammatory cytokine release.<sup>46</sup>

The stents were implanted according to a predetermined scheme (random block design) in each coronary artery: right coronary, left anterior descending, and left circumflex. Every animal received a SS (3.5 mm diameter, 15 mm length), a CCS (3.5 mm diameter, 16 mm length), and a TES (3.5 mm diameter, 15 mm length) in the proximal segment (at less than 5 mm away from the origin) of each coronary artery. All stents were deployed at nominal pressure (9 atm), allowing a higher pressure in a second inflation if the relation to the vessel was less than 1.1 to obtain light-to-moderate injury (10–20% overstretch). The stent-to-artery ratio was analyzed in the post-implantation angiographic images.

### Analysis and Sample Processing

Euthanasia was performed according to the follow-up protocol. The animals were sedated with a single intramuscular dose of azaperone (2 mg/kg), with subsequent intravenous administration of heparin (400 IU/kg) and euthanasia agent T-61 (InterVet, Salamanca, Spain) with embutramide, mebezonium iodide, and tetracaine at a dose of 0.3 ml/kg. Immediately after euthanasia, the hearts were harvested and the coronary arteries were perfused in situ with phosphate-buffered saline (PBS) and then fixed with 10% neutral-buffered formalin at 60 to 80 mm Hg. After 24 hours, the vessels were carefully excised from the heart and bisected longitudinally under a dissecting microscope.

Both halves were processed for scanning electron microscopy to analyze the endothelialization as described elsewhere.<sup>9</sup> The luminal surfaces of the bisected halves of each stent were examined en face in a JSM-6480 LV (JEOL, Tokyo, Japan) scanning electron microscope, obtaining low-power digital images (25 $\times$ ) and details of characteristic areas with higher magnification (200–1000 $\times$ ). The adequate discrimination of endothelial cells was based on morphological features: polygonal cells with distinctive limits between them, prominent nuclei and irregular size, highly orientated and exhibiting a cobblestone-like phenotype, and appearing as a confluent flattened monolayer.<sup>30</sup> Other cell types were characterized regarding their size and morphological aspects (Fig. 1). Lymphocytes (7–8  $\mu$ m) have numerous microvilli on their surface; monocytes (15  $\mu$ m) are covered by a number of



**Figure 1.** Characterization of the overlying material: on a mat of fibrin and platelets (small rounded cell fragments), presence of lymphocytes ( $<8 \mu\text{m}$  with surface microvilli, black arrow) and red blood cells (characteristic concavity, white arrow). Neutrophils (left in the inset) show shallow surface folds and are bigger ( $10\text{--}12 \mu\text{m}$ ) than lymphocytes (right in the inset). Bars =  $5 \mu\text{m}$ .

surface folds and projections of variable size; neutrophils ( $10\text{--}12 \mu\text{m}$ ) show a number of shallow surface folds. Nevertheless, the accurate discrimination of the cellular type can be hard because, in some cases, monocytes closely resemble neutrophils,<sup>6</sup> and even neutrophils and at least some monocytes are not readily distinguishable from lymphocytes by SEM.<sup>1,50,51</sup> The referred cellular size is orientative because the critical-point drying procedure for SEM can reduce the cellular diameter.<sup>39</sup>

The ImageJ 1.4 software (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland) was used to quantify the endothelial coverage of the stent. To calculate the total stent area, the whole luminal surface of the artery was measured in each sample and then corrected by the ratio of metal to artery supplied by the manufacturer (SS 14.3%, CCS 12.5%, TES 17.5%; Fig. 2). The nonendothelialized area over the struts was measured. We calculated the rate of endothelialization (%E) using

the following formula:  $\%E = 100 \times [1 - (\text{nonendothelialized area} / \text{total stent area})]$ .

### Statistical Analysis

The variables are presented as mean  $\pm$  standard deviation. Data were analyzed for overall differences among different stents and follow-up periods using one-way analysis of variance (ANOVA). Probability values of  $P < .05$  were considered significant.

### Results

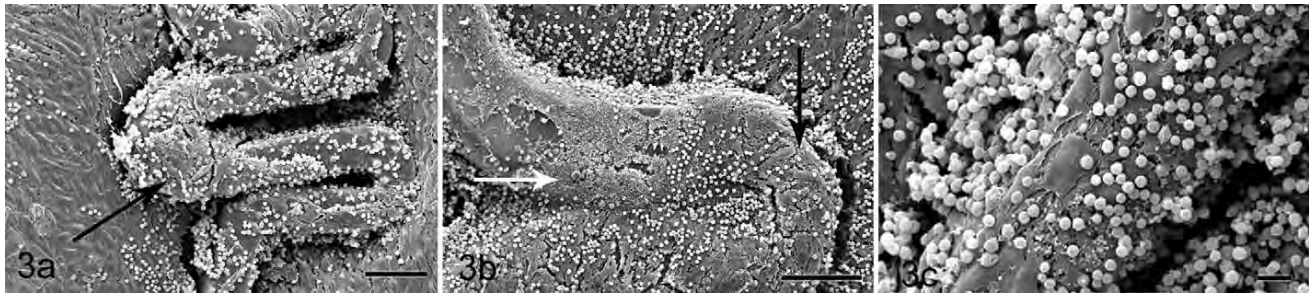
All the animals survived the stent implantation procedure and completed the scheduled follow-up period. In total, 33 stents were deployed (9 in the 1-day group, 9 in the 3-day group, and 15 in the 7-day group), achieving a final stent-to-artery ratio of  $1.16 \pm 0.06$  without differences between stents (SS,  $1.17 \pm 0.06$ ; CCS,  $1.16 \pm 0.07$ ; TES,  $1.16 \pm 0.07$ ;  $P = .87$ ). The mean deployment pressure (atm.) was also similar for the 3 groups: SS,  $9.4 \pm 1.8$ ; CCS,  $9.3 \pm 0.9$ ; and TES,  $9.4 \pm 1.8$  ( $P = .97$ ). There were no episodes of subacute stent thrombosis. One animal developed infection of the surgical wound without further consequences. All samples were adequately analyzed except one stent (7-day group) showing a drying artifact that precluded the characterization of the different cellular types over the stent. Although the endothelialization of the stent struts in the edges (both proximal and distal) seemed to be better than those in the middle part, no significant differences were detected. No relation was found between the endothelialization rate and the treated artery, the deployment pressure, or the stent-to-artery ratio.

### Results at 1 Day (Fig. 3)

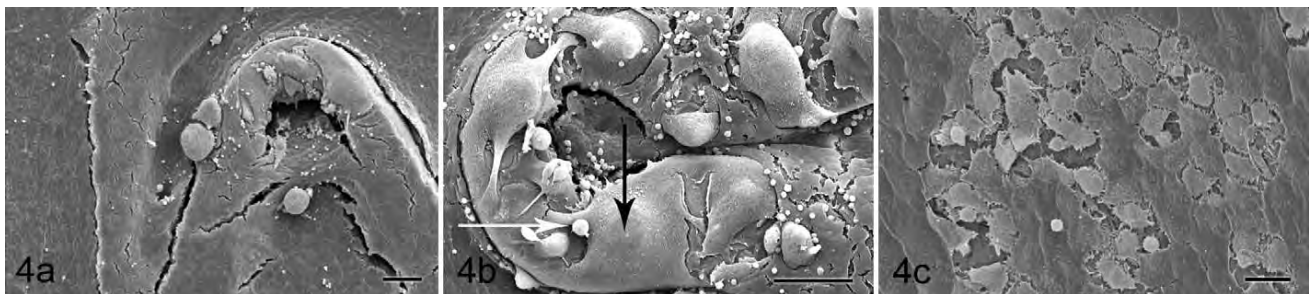
The greater part of the stent structure appeared naked or covered by a thin layer of fibrin, platelets, and inflammatory cells. The latter were also present in a moderate amount around



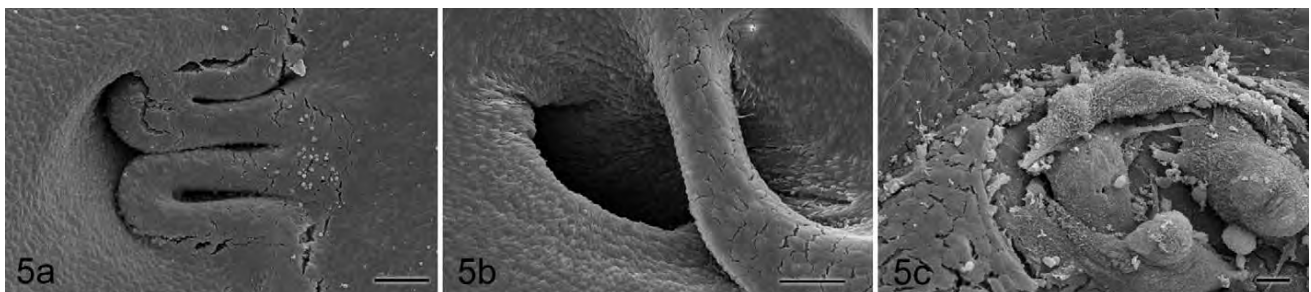
**Figure 2.** To calculate the stent area in each specimen, the whole luminal surface covered by the stent was measured (area enclosed with the black outline) corrected for the metal-to-artery ratio. The nonendothelialized area over the struts includes white areas (uncovered struts) + black areas (struts covered by fibrin/giant cells). Bar =  $1 \text{ mm}$ .



**Figure 3.** Day 1. (a) Sparse endothelial cells begin to cover the stent struts from the edges (black arrow). Bar = 100  $\mu$ m. (b) The metallic surface of the stent appears mostly naked, with some areas covered by fibrin (white arrow). Bar = 100  $\mu$ m. (c) Abundant inflammatory cell component. Bar = 20  $\mu$ m.



**Figure 4.** Day 3. (a) The endothelial layer covers a wider area with less inflammation. Bar = 100  $\mu$ m. (b) Giant cells of different sizes and shapes are present over areas lacking endothelial cells (white and black arrows). Bar = 100  $\mu$ m. (c) The intercellular connections appear loose. Bar = 20  $\mu$ m.



**Figure 5.** Day 7. (a) The endothelial layer is almost complete. Bar = 100  $\mu$ m. (b) Endothelial cells are present even over stent struts not apposed to the vessel wall, floating over the origin of small side branches. Bar = 100  $\mu$ m. (c) Wherever the endothelial cells do not cover the struts, giant cells and some fibrin can be observed. Bar = 20  $\mu$ m.

the stent struts. The vessel surface between struts showed preserved endothelium. The stent reendothelialization showed a patchy distribution: isolated endothelial cells began to cover the struts from the edges to the center. There were no differences ( $P = .9$ ) in the endothelialization rate between the SS ( $29 \pm 23\%$ ), CCS ( $29 \pm 24\%$ ), and the TES ( $31 \pm 25\%$ ).

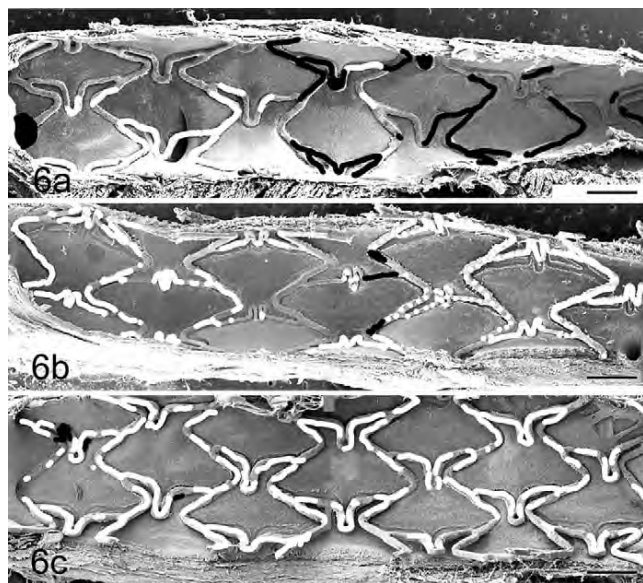
#### Results at 3 Days (Fig. 4)

More struts showed coverage by endothelial cells, but features consistent with immaturity (eg, loose intercellular connections) were still present. Giant cells and other inflammatory cells and

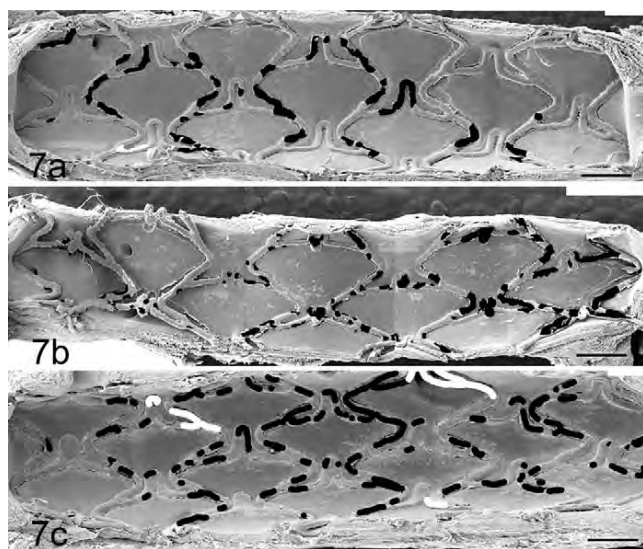
microthrombi were variably evident. The endothelialization rate of the SS ( $79 \pm 14\%$ ) and CCS ( $81 \pm 17\%$ ) was significantly higher than endothelialization of the TES ( $46 \pm 9\%$ ,  $P = .007$ ).

#### Results at 7 Days (Fig. 5)

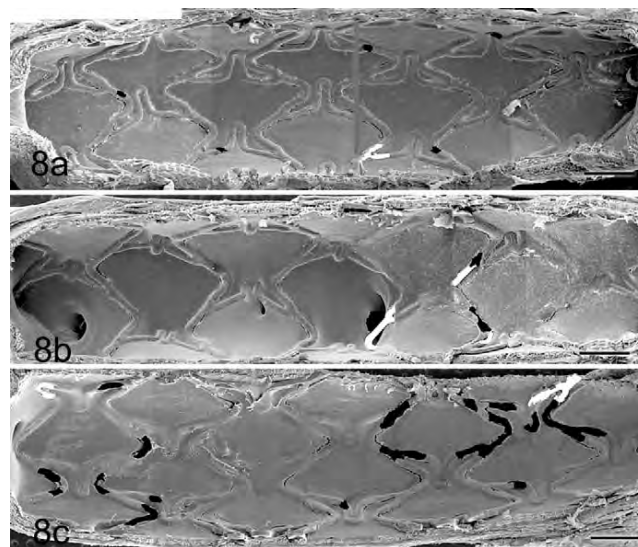
A homogeneous endothelial layer was observed covering most of the metallic structure of each device. Fibrin clusters or giant cells were observed over the few struts not covered by endothelial cells. The endothelialization rate of the SS ( $95 \pm 4\%$ ) and CCS ( $98 \pm 4\%$ ) was almost complete, whereas the TES



**Figure 6.** Comparison of endothelialization of the different stents at 1 day. (a) Stainless steel stents, (b) cobalt-chromium stents, and (c) tacrolimus-eluting stents. The endothelialization assessment is depicted with black and white areas over the images (white areas: uncovered struts; black areas: struts covered by fibrin/giant cells). All the stents are oriented in the same way: proximal segment to the left, distal segment to the right. Bars = 1 mm.



**Figure 7.** Comparison of endothelialization of the different stents at 3 days. (a) Stainless steel stents, (b) cobalt-chromium stents, and (c) tacrolimus-eluting stents. The endothelialization assessment is depicted with black and white areas over the images (white areas: uncovered struts; black areas: struts covered by fibrin/giant cells). All the stents are oriented in the same way: proximal segment to the left, distal segment to the right. Bars = 1 mm.



**Figure 8.** Comparison of endothelialization of the different stents at 7 days. (a) Stainless steel stents, (b) cobalt-chromium stents, and (c) tacrolimus-eluting stents. The endothelialization assessment is depicted with black and white areas over the images (white areas: uncovered struts; black areas: struts covered by fibrin/giant cells). All the stents are oriented in the same way: proximal segment to the left, distal segment to the right. Bars = 1 mm.

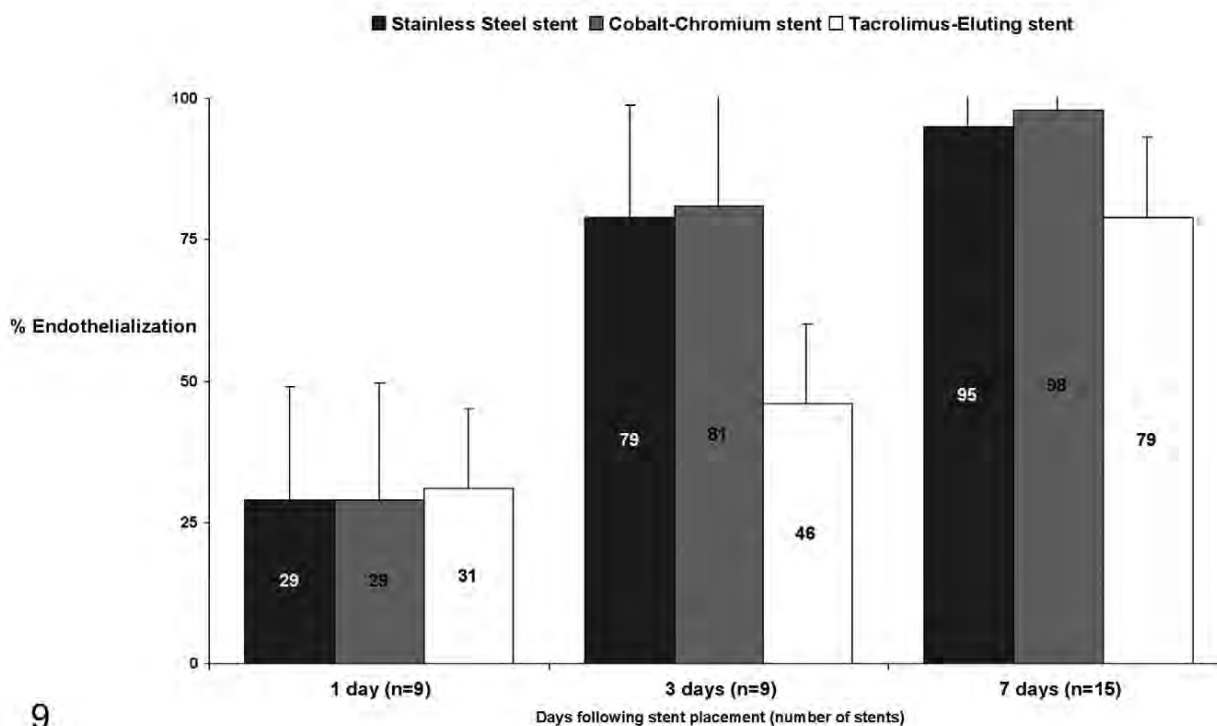
showed a quite high rate ( $79 \pm 9\%$ ) but significantly lower than the SS and the CCS ( $P = .01$ ).

Figures 6 to 9 depict and summarize the global endothelialization results at different time points.

## Discussion

The results of this study prove the described model as a useful tool to construct an endothelialization calendar for different stents and to characterize the elicited cellular response. Our key findings are the complete endothelialization of the bare metal stents in 7 days (without differences between the SS and the CCS, although they clearly differ in the strut thickness), the acceptable but significantly lower endothelialization rate of the TES, and the gradual decrease of the inflammatory response.

In our model, the bare metal stents (SS and CCS) show almost complete endothelialization at 7 days. Finn et al<sup>12</sup> have found a similar rate of endothelialization after 14 days in a swine model with different cobalt-chromium stents. A complete endothelialization of these stents was not observed until 28 days after the implantation in the rabbit iliac artery model.<sup>12,21</sup> Different susceptibility and reactivity to vascular injury between animal species and structural differences between iliac and coronary arteries may explain the differences between the results obtained in swine and rabbits.<sup>40,41,49</sup> The discrepancy between our results and previous data in swine<sup>12,21,27</sup> could be explained by some methodological differences such as greater endothelial denudation caused by previous balloon inflation and by the potential “pro-healing”



**Figure 9.** Bar chart. % Endothelialization of the stents at different time points.

role of the Carbofilm coating.<sup>3,32,37</sup> The achieved stent-to-artery ratio could also be a key factor in the different studies. Finn et al<sup>12</sup> do not detail the achieved ratio in their swine group. Higher overstretching causes greater vessel injury and, consequently, more restenosis;<sup>13,42</sup> it is not clear if greater injury also correlates with faster reendothelialization.<sup>40,41</sup> To avoid a potential hyperproliferative reaction, only light-to-moderate oversizing of the stents was performed.

The endothelialization rate of the TES (Carbostent DES) at 7 days ( $79 \pm 9\%$ ) compares favorably with previous results, although methodological differences render this comparison quite difficult.<sup>35</sup> Joner et al<sup>21</sup> described the endothelialization rates of different DES at 14 days in the rabbit iliac model:  $64 \pm 27.5\%$  (everolimus-eluting stent),  $30.2 \pm 14.2\%$  (zotarolimus-eluting stent),  $26.8 \pm 15.8\%$  (paclitaxel-eluting stent), and  $6.4 \pm 4.2\%$  (sirolimus-eluting stent). Only at 28 days did they observe endothelialization rates more than 60% in the sirolimus, paclitaxel, or zotarolimus stents. Nevertheless, other authors have demonstrated complete endothelialization in the swine coronary model with paclitaxel-eluting stents at 20 days, with a high endothelialization rate at 10 days.<sup>2</sup> Therefore, the different animal models and methodologies make it difficult to establish direct comparison between the results.

A principal objective of this study is the characterization of the cellular response that the stents elicit. One day after the implantation, the stent is mainly uncovered or covered by a thin

layer of fibrin and platelets, with a moderate inflammatory reaction. At 3 days, the predominant cell type is inflammatory, including lymphocytes, macrophages, and few multinucleated giant cells. The presence of giant cells in particular has been previously reported, but their role in the endothelialization process remains unclear.<sup>2</sup> Nevertheless, the amount of giant cells is similar in the 3 groups. At 7 days, the nonendothelialized areas are covered by giant cells with sparse lymphocytes, monocytes, and neutrophils. Two aspects of the arterial response arise from these findings: (1) the evolution of the inflammatory response and (2) the contribution of different cellular and noncellular (eg, fibrin) structures to coverage of the stent struts.

The inflammatory response has been typically described in depth, surrounding the stent struts in the cross-sectional analysis of the artery.<sup>11,52</sup> The luminal inflammation can also be assessed using SEM: bare metal stents show a decreasing inflammatory reaction with time, while DES show a persistent (even increasing) inflammatory reaction.<sup>33</sup> Nevertheless, the Carbostent DES showed an evolution of the acute to subacute inflammatory response to be similar to the bare metal stents. The absence of a polymer as drug vehicle and the high biocompatibility of the Carbofilm coating could explain this finding. The presence of nonendothelial structures over the stent implies some practical considerations. Different studies have used image techniques, such as optical coherence tomography (OCT)<sup>8,26</sup> or angiography,<sup>44</sup> to analyze

the endothelialization of the stent *in vivo*. All of them have focused the analysis on the detection of the uncovered struts. In light of our results and other previous data,<sup>43</sup> it is obvious that the presence of covered struts does not entail an adequate endothelialization.

Although the use of a young, healthy animal can be considered a limitation, it is the recommended model by the different consensus documents.<sup>40,41</sup> The experts' recommendations suggest time periods shorter than 14 days to evaluate the endothelialization in the swine model. However, it is stated that "if confluent endothelium is present within 28 days of treatment of stent placement, this finding does not necessarily assure favorable human endothelial reaction. However, if the porcine model suggests substantial or long-term endothelial toxicity as manifested by incomplete endothelialization of the stent, this observation suggests but does not prove potential problems with vascular biological compatibility."<sup>40</sup> Different models of disease (eg, diabetes, hyperlipidemia) are becoming increasingly popular for the evaluation of DES.<sup>5,20,35,38</sup> They could provide vascular responses closer to human patients, but they are still not validated. Another potential limitation of the study is the lack of functional assessment of the endothelium. As some morphological features (loose intercellular connections) observed at 3 days suggest endothelial immaturity, endothelial function in addition to form is an important consideration in addressing DES safety. Different studies are evaluating endothelial functionality using immunohistochemical techniques<sup>12,18,20,27,38,52</sup> or analyzing the *in vivo* vascular reactivity to different vasodilators, endothelium dependent or independent.<sup>14,16,23</sup> However, the clear illustration and correlation of these results regarding endothelial form and function from a preclinical to a clinical setting have not been established. This is a critical deficit and emphasizes the importance of studies as the one presented herein to allow for better assessment of the safety of interventional devices for the treatment of coronary artery disease.

## Conclusions

The described swine model with normal coronary arteries is useful to measure and compare the endothelialization of coronary stents, assessing their evolution and characterizing the involved cellular types. Future studies using this model should complete the information with the analysis of elicited inflammation, the assessment of the functionality of the observed endothelium, and the translation of preclinical results to clinical relevance.

## Declaration of Conflict of Interest

The author(s) declared that they had no conflicts of interests with respect to their authorship or the publication of this article.

## Financial Disclosure/Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research and/or authorship of this article: Unrestricted research grant from CID Carbostent & Implantable Devices s.r.l., Saluggia, Italy.

## References

- Alexander EL, Wetzel B: Human lymphocytes: similarity of B and T cell surface morphology. *Science* **188**:732–734, 1975.
- Bailey S, Seifert P, Huibregtse B, Poff B: Early healing following TAXUS stent implantation: endothelial cell coverage is similar in overlapped TAXUS Express stents and bare metal stents in swine coronary arteries. *Cardiovasc Revasc Med* **7**:90–92, 2006.
- Bartorelli AL, Trabattoni D, Fabbiochi F, Montorsi P, de Martini S, Calligaris G, Teruzzi G, Galli S, Ravagnani P: Synergy of passive coating and targeted drug delivery: the tacrolimus-eluting Janus CarboStent. *J Interv Cardiol* **16**:499–505, 2003.
- Bertrand ME, Rupprecht HJ, Urban P, Gershlick AH: Double-blind study of the safety of clopidogrel with and without a loading dose in combination with aspirin compared with ticlopidine in combination with aspirin after coronary stenting: the Clopidogrel Aspirin Stent International Cooperative Study (CLASSICS). *Circulation* **102**:624–629, 2000.
- Brasselet C, Durand E, Addad F, Vitry F, Chatellier G, Demerens C, Lemitre M, Garnotel R, Urbain D, Bruneval P, Lafont A: Effect of local heating on restenosis and in-stent neointimal hyperplasia in the atherosclerotic rabbit model: a dose-ranging study. *Eur Heart J* **29**:402–412, 2008.
- Burkhardt E: Scanning electron microscopy of peripheral blood leukocytes of the chickens. *Cell Tissue Res* **204**:147–153, 1979.
- Camenzind E, Steg PG, Wijns W: Stent thrombosis late after implantation of first-generation drug-eluting stents: a cause for concern. *Circulation* **115**:1440–1455; discussion 1455, 2007.
- Chen BX, Ma FY, Wei L, Ruan JH, Xie WL, Zhao XZ, Sun SH, Guo XM, Wang F, Tian T, Chu XW: Neointimal coverage of bare metal and sirolimus-eluting stents evaluated with optical coherence tomography. *Heart* **94**:566–570, 2008.
- Farb A, Tang AL, Shroff S, Sweet W, Virmani R: Neointimal responses 3 months after (32)P beta-emitting stent placement. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **48**:889–898, 2000.
- Finn AV, Joner M, Nakazawa G, Kolodgie F, Newell J, John MC, Gold HK, Virmani R: Pathological correlates of late drug-eluting stent thrombosis: strut coverage as a marker of endothelialization. *Circulation* **115**:2435–2441, 2007.
- Finn AV, Kolodgie FD, Harnek J, Guerrero LJ, Acampado E, Tefera K, Skorija K, Weber DK, Gold HK, Virmani R: Differential response of delayed healing and persistent inflammation at sites of overlapping sirolimus- or paclitaxel-eluting stents. *Circulation* **112**:270–278, 2005.
- Finn AV, Nakazawa G, Joner M, Kolodgie FD, Mont EK, Gold HK, Virmani R: Vascular responses to drug eluting stents: importance of delayed healing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**:1500–1510, 2007.
- Gunn J, Arnold N, Chan KH, Shepherd L, Cumberland DC, Crossman DC: Coronary artery stretch versus deep injury in the development of in-stent neointima. *Heart* **88**:401–405, 2002.
- Hamilos MI, Ostojic M, Beleslin B, Sagic D, Mangovski L, Stojkovic S, Nedeljkovic M, Orlic D, Milosavljevic B, Topic D, Karanovic N, Wijns W: Differential effects of drug-eluting stents on local endothelium-dependent coronary vasomotion. *J Am Coll Cardiol* **51**:2123–2129, 2008.



15. Ho S, Clipstone N, Timmermann L, Northrop J, Graef I, Fiorentino D, Nourse J, Crabtree GR: The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clin Immunol Immunopathol* **80**:S40–S45, 1996.
16. Hofma SH, van der Giessen WJ, van Dalen BM, Lemos PA, McFadden EP, Sianos G, Ligthart JM, van Essen D, de Feyter PJ, Serruys PW: Indication of long-term endothelial dysfunction after sirolimus-eluting stent implantation. *Eur Heart J* **27**:166–170, 2006.
17. Iakovou I, Schmidt T, Bonizzoni E, Ge L, Sangiorgi GM, Stankovic G, Airoldi F, Chieffo A, Montorfano M, Carlino M, Michev I, Corvaja N, Briguori C, Gerckens U, Grube E, Colombo A: Incidence, predictors, and outcome of thrombosis after successful implantation of drug-eluting stents. *JAMA* **293**:2126–2130, 2005.
18. Joner M, Farb A, Cheng Q, Finn AV, Acampado E, Burke AP, Skorija K, Creighton W, Kolodgie FD, Gold HK, Virmani R: Pioglitazone inhibits in-stent restenosis in atherosclerotic rabbits by targeting transforming growth factor-beta and MCP-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**:182–189, 2007.
19. Joner M, Finn AV, Farb A, Mont EK, Kolodgie FD, Ladich E, Kutys R, Skorija K, Gold HK, Virmani R: Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk. *J Am Coll Cardiol* **48**:193–202, 2006.
20. Joner M, Morimoto K, Kasukawa H, Steigerwald K, Merl S, Nakazawa G, John MC, Finn AV, Acampado E, Kolodgie FD, Gold HK, Virmani R: Site-specific targeting of nanoparticle prednisolone reduces in-stent restenosis in a rabbit model of established atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**:1960–1966, 2008.
21. Joner M, Nakazawa G, Finn AV, Quee SC, Coleman L, Acampado E, Wilson PS, Skorija K, Cheng Q, Xu X, Gold HK, Kolodgie FD, Virmani R: Endothelial cell recovery between comparator polymer-based drug-eluting stents. *J Am Coll Cardiol* **52**:333–342, 2008.
22. Kastrati A, Mehilli J, Pache J, Kaiser C, Valgimigli M, Kelbaek H, Menichelli M, Sabate M, Suttrop MJ, Baumgart D, Seyfarth M, Pfisterer ME, Schomig A: Analysis of 14 trials comparing sirolimus-eluting stents with bare-metal stents. *N Engl J Med* **356**:1030–1039, 2007.
23. Kim JW, Suh SY, Choi CU, Na JO, Kim EJ, Rha S-W, Park CG, Seo HS, Oh DJ: Six-month comparison of coronary endothelial dysfunction associated with sirolimus-eluting stent versus paclitaxel-eluting stent. *J Am Coll Cardiol Intv* **1**:65–71, 2008.
24. Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, Nishiyama M, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, Imanaka H: FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces: I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *J Antibiot (Tokyo)* **40**:1249–1255, 1987.
25. Leon MB, Baim DS, Popma JJ, Gordon PC, Cutlip DE, Ho KK, Giambartolomei A, Diver DJ, Lasorda DM, Williams DO, Pocock SJ, Kuntz RE: A clinical trial comparing three antithrombotic-drug regimens after coronary-artery stenting. Stent Anticoagulation Restenosis Study Investigators. *N Engl J Med* **339**:1665–1671, 1998.
26. Matsumoto D, Shite J, Shinke T, Otake H, Tanino Y, Ogasawara D, Sawada T, Paredes OL, Hirata K, Yokoyama M: Neointimal coverage of sirolimus-eluting stents at 6-month follow-up: evaluated by optical coherence tomography. *Eur Heart J* **28**:961–967, 2007.
27. Nakazawa G, Finn AV, John MC, Kolodgie FD, Virmani R: The significance of preclinical evaluation of sirolimus-, paclitaxel-, and zotarolimus-eluting stents. *Am J Cardiol* **100**:36M–44M, 2007.
28. Nakazawa G, Finn AV, Joner M, Ladich E, Kutys R, Mont EK, Gold HK, Burke AP, Kolodgie FD, Virmani R: Delayed arterial healing and increased late stent thrombosis at culprit sites after drug-eluting stent placement for acute myocardial infarction patients: an autopsy study. *Circulation* **118**:1138–1145, 2008.
29. Nebeker JR, Virmani R, Bennett CL, Hoffman JM, Samore MH, Alvarez J, Davidson CJ, McKoy JM, Raisch DW, Whisenant BK, Yarnold PR, Belknap SM, West DP, Gage JE, Morse RE, Gligoric G, Davidson L, Feldman MD: Hypersensitivity cases associated with drug-eluting coronary stents: a review of available cases from the Research on Adverse Drug Events and Reports (RADAR) project. *J Am Coll Cardiol* **47**:175–181, 2006.
30. Papadimitriou JM, Finlay-Jones JM, Walters MN: Surface characteristics of macrophages, epithelioid and giant cells using scanning electron microscopy. *Exp Cell Res* **76**:353–362, 1973.
31. Park DW, Park SW, Park KH, Lee BK, Kim YH, Lee CW, Hong MK, Kim JJ, Park SJ: Frequency of and risk factors for stent thrombosis after drug-eluting stent implantation during long-term follow-up. *Am J Cardiol* **98**:352–356, 2006.
32. Pérez de Prado A, Perez Martinez C, Cuellas Ramon C, Gonzalo Orden JM, Altonaga JR, Garcia Iglesias MJ, Regueiro M, Orden MA, Garcia Marin JF, Fernandez-Vazquez F: Endothelialization of nonapposed stent struts located over the origin of a side branch. *J Interv Cardiol* **22**:222–227, 2009.
33. Pérez de Prado A, Pérez-Martínez C, Cuellas-Ramón C, Gonzalo-Orden JM, Regueiro-Purriños M, Martínez-Fernández B, Diego-Nieto A, Fernández-Vázquez F: Analysis of luminal inflammation elicited by different coronary stents in an animal model with scanning electron microscopy. *Rev Esp Cardiol* **64**:159–162, 2011.
34. Perkins LE: Preclinical models of restenosis and their application in the evaluation of drug-eluting stent systems. *Vet Pathol* **47**:58–76, 2010.
35. Perkins LE, Chin Quee S, Coleman LA, Lui MJ, Joner M, Virmani R, Acampado E, Kolodgie F: Three in vivo preclinical models to assess re-endothelialization following coronary stent implantation. *Am J Cardiol* **100**:S176, 2007 [Abstract].
36. Pfisterer M, Brunner-La Rocca HP, Buser PT, Rickenbacher P, Hunziker P, Mueller C, Jeger R, Bader F, Osswald S, Kaiser C: Late clinical events after clopidogrel discontinuation may limit the benefit of drug-eluting stents: an observational study of drug-eluting versus bare-metal stents. *J Am Coll Cardiol* **48**:2584–2591, 2006.
37. Prunotto M, Vignolini C, Lolli V, Black A, Gaggianesi S, Santarelli A, Galloni M: Short-, mid-, and long-term effects of a polymer-free tacrolimus-eluting stent in a porcine coronary model. *J Biomed Mater Res A* **88**:872–879, 2009.
38. Ribichini F, Joner M, Ferrero V, Finn AV, Crimins J, Nakazawa G, Acampado E, Kolodgie FD, Vassanelli C, Virmani R: Effects of oral prednisone after stenting in a rabbit model of established atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* **50**:176–185, 2007.

39. Schneider GB: The effects of preparative procedures for scanning electron microscopy on the size of isolated lymphocytes. *Am J Anat* **146**:93–100, 1976.
40. Schwartz RS, Edelman E, Virmani R, Carter A, Granada JF, Kaluza GL, Chronos NAF, Robinson KA, Waksman R, Weinberger J, Wilson GJ, Wilensky RL: Drug-eluting stents in preclinical studies: updated consensus recommendations for pre-clinical evaluation. *Circ Cardiovasc Intervent* **1**:143–153, 2008.
41. Schwartz RS, Edelman ER, Carter A, Chronos N, Rogers C, Robinson KA, Waksman R, Weinberger J, Wilensky RL, Jensen DN, Zuckerman BD, Virmani R: Drug-eluting stents in preclinical studies: recommended evaluation from a consensus group. *Circulation* **106**:1867–1873, 2002.
42. Schwartz RS, Huber KC, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vlietstra RE, Holmes DR: Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model. *J Am Coll Cardiol* **19**:267–274, 1992.
43. Sheehy A, Murata A, Wallace-Bradley D, Coleman L, Kaluza GL, Perkins L, Kolodgie F, Nakazawa G, Virmani R, Granada JF: Biological evaluation of vascular response to drug eluting stents using optical coherence tomography in a porcine coronary artery model. *Am J Cardiol* **102**:27i, 2008 [Abstract].
44. Shinke T, Li J, Chen JP, Pendyala L, Goodchild T, Jabara R, Geva S, Ueno T, Chronos N, Robinson K, Hou D: High incidence of intramural thrombus after overlapping paclitaxel-eluting stent implantation: angioscopic and histopathologic analysis in porcine coronary arteries. *Circ Cardiovasc Intervent* **1**:28–35, 2008.
45. Spaulding C, Daemen J, Boersma E, Cutlip DE, Serruys PW: A pooled analysis of data comparing sirolimus-eluting stents with bare-metal stents. *N Engl J Med* **356**:989–997, 2007.
46. St Peter SD, Moss AA, Mulligan DC: Effects of tacrolimus on ischemia-reperfusion injury. *Liver Transpl* **9**:105–116, 2003.
47. Stone GW, Moses JW, Ellis SG, Schofer J, Dawkins KD, Morice MC, Colombo A, Schampaert E, Grube E, Kirtane AJ, Cutlip DE, Fahy M, Pocock SJ, Mehran R, Leon MB: Safety and efficacy of sirolimus- and paclitaxel-eluting coronary stents. *N Engl J Med* **356**:998–1008, 2007.
48. Virmani R, Guagliumi G, Farb A, Musumeci G, Grieco N, Motta T, Mihalsik L, Tsepili M, Valsecchi O, Kolodgie FD: Localized hypersensitivity and late coronary thrombosis secondary to a sirolimus-eluting stent: should we be cautious? *Circulation* **109**:701–705, 2004.
49. Virmani R, Kolodgie FD, Farb A, Lafont A: Drug eluting stents: are human and animal studies comparable? *Heart* **89**:133–138, 2003.
50. Wetzel B, Cannon GB, Alexander EL, Erickson BW, Westbrook EW: A critical approach to the scanning electron microscopy of cells in suspension. *In: Scanning Electron Microscopy 1974*, ed. Johari O and Corvin I, pp. 581–588. Illinois Institute of Technology Research Institute, Chicago, IL, 1974.
51. Wetzel B, Erickson BW, Levis WR: The need for positive identification of leucocytes examined by scanning electron microscopy. *In: Scanning Electron Microscopy 1973*, ed. Johari O and Corvin I, pp. 535–542. Illinois Institute of Technology Research Institute, Chicago, IL, 1973.
52. Wilson GJ, Nakazawa G, Schwartz RS, Huibregtse B, Poff B, Herbst TJ, Baim DS, Virmani R: Comparison of inflammatory response after implantation of sirolimus- and paclitaxel-eluting stents in porcine coronary arteries. *Circulation* **120**:141–149, 2009.

## CORONARY ARTERY DISEASE

**Endothelialization of Nonapposed Stent Struts Located over the Origin of a Side Branch: Results with Different Carbofilm-Coated Stents**

ARMANDO PEREZ DE PRADO, M.D., F.E.S.C.,<sup>1</sup> CLAUDIA PEREZ MARTINEZ, D.V.M., PH.D.,<sup>2</sup>  
CARLOS CUELLAS RAMON, M.D., F.E.S.C.,<sup>1</sup> J. MANUEL GONZALO ORDEN, D.V.M., PH.D.,<sup>2</sup>  
JOSE R. ALTONAGA, D.V.M., PH.D.,<sup>2</sup> MARIA J. GARCIA IGLESIAS, D.V.M., PH.D.,<sup>2</sup>  
MARTA REGUEIRO PURRIÑOS, D.V.M., PH.D.,<sup>2</sup> M. ASUNCION ORDEN, D.V.M., PH.D.,<sup>2</sup>  
JUAN F. GARCIA MARIN, D.V.M., PH.D.,<sup>2</sup> and FELIPE FERNANDEZ-VAZQUEZ, M.D., F.E.S.C.<sup>1</sup>

From the <sup>1</sup>Interventional Cardiology, Hospital de Leon, Leon, Spain; and <sup>2</sup>Facultad de Veterinaria, Universidad de Leon, Leon, Spain

**Objective:** To evaluate the degree of endothelialization of the nonapposed struts located at the ostia of side branches.

**Background:** Endothelialization of coronary stents has got considerable relevance because of the phenomenon of late thrombosis. Bifurcation location and incomplete stent apposition have been linked to this complication.

**Methods:** Domestic pigs ( $n = 11$ ; weight:  $25 \pm 3$  kg) were anesthetized and had one stent per coronary artery implanted: one stainless steel (Tecniv<sup>®</sup>), one cobalt-chromium (Chrono<sup>®</sup>), and one tacrolimus-eluting stent (Janus<sup>®</sup>), all of them being Carbofilm<sup>®</sup>-coated (Sorin). One, three, or seven days postprocedure, the pigs were sacrificed, the hearts explanted, and longitudinal sections examined by surface electron microscopy to quantify the percentage of the strut endothelialized over the branches and in the total surface.

**Results:** Forty-four side branches (25 stents) that had stent struts over their origin were evaluated. Different patterns of endothelialization were observed, from the total absence to the complete endothelialization. There were no significant differences in relation to type of stent or to the artery treated. The predictors of higher percentage of endothelialization were the ratio of metal to branch diameter ( $P = 0.04$ ) and better endothelialization in the rest of the stent ( $P = 0.0002$ ), only this parameter maintaining significant correlation ( $P = 0.03$ ) in multivariate analysis.

**Conclusions:** Carbofilm<sup>®</sup>-coated stent struts located over the origin of side branches follow the pattern of endothelialization for the rest of the stent, even in the case of tacrolimus-eluting stent. (J Intervent Cardiol 2009;22: 222–227)

**Introduction**

First-generation drug-eluting stents (DESs) have demonstrated a marked reduction in restenosis rates

and a need for repeated revascularization after a long-term follow-up.<sup>1</sup> However, several histopathological data<sup>1,2</sup> evidenced a potential drawback of these stents; the decrease in neointimal formation can be associated with delayed vessel wall healing. This phenomenon has been linked to a severe clinical adverse event, such as the late stent thrombosis (LST).<sup>1</sup> Although some authors do not find an increase of LST after DES implantation,<sup>2</sup> others do.<sup>3,4</sup> Furthermore, the data from observational studies, including a wider population than the restrictive randomized clinical trials, support this hypothesis.<sup>5,6</sup> First-generation DESs elute the drug from

This study was supported by a research grant from Sorin Biomedica Cardio s.r.l., Saluggia, Italy. All contents are solely the responsibility of the authors.

Address for reprints: Armando Perez de Prado, M.D., F.E.S.C., S. Cardiología Intervencionista, Hospital de Leon, Altos de Nava SN, 24008 Leon, Spain. Fax: (+34) 987 237683; e-mail: aperez@secardiologia.es

## ENDOTHELIALIZATION OF NONAPPOSED STENT STRUTS

a nonbiodegradable polymer matrix, which remains indefinitely in apposition to the arterial wall. Hypersensitivity reactions to the drug or the polymer<sup>7,8</sup> may induce and perpetuate inflammation and could contribute to the occurrence of LST. To reduce the incidence of these negative events, different approaches to a nonpolymeric DES have been tested. Janus<sup>®</sup> stent (Sorin Biomedica Cardio s.r.l., Saluggia, Italy) is a nonpolymeric system based on a Carbofilm<sup>®</sup>-coated stainless-steel stent (Tecnica<sup>®</sup>) that elutes tacrolimus. The absence of the polymer and the highly thromboresistant coating could offer a better safety profile in terms of LST reduction.

In addition, bifurcation lesions<sup>3,9-11</sup> and incomplete stent apposition to the vessel wall<sup>10-13</sup> have been associated with a higher incidence of LST. Both factors are part of everyday practice; many of the implanted stents lie over the ostia of side branches, most of them not requiring further treatment so stent struts are placed covering their origin. These low-shear and low-flow sites are, theoretically, more prone to develop atherosclerosis progression and thrombus formation.<sup>14</sup> Little is known about the endothelialization process of the struts placed over the origin of side branches. The potential relevance of this process could be even greater when DESs are used, given their delayed healing time.

The purpose of this study was to evaluate the endothelialization rate of the stent struts located over the origin of side branches in porcine coronary arteries treated with different Carbofilm<sup>®</sup>-coated coronary stents: stainless-steel stent (Tecnica<sup>®</sup>), cobalt-chromium stent (Chrono<sup>®</sup>), and tacrolimus-eluting stent (TES, Janus<sup>®</sup>).

### Materials and Methods

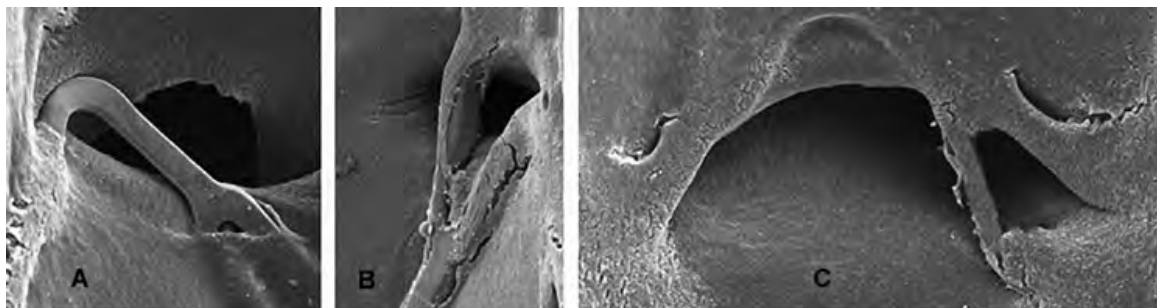
Premounted stents were supplied by the manufacturer, and the implantation was performed at our institution. Eleven swine were used. To assess the evolution of reendothelialization, different time points were selected: 5 animals were scheduled to complete a follow-up period of 7 days, 3 animals were used in the group of 3-day follow-up, and 3 animals in the group of 1-day follow-up. The animals (large white pigs) were selected from our experimental animal farm. They were 2 months old with a mean weight of  $25 \pm 3$  kg. All the investigation procedures and animal care were performed in accordance with the European and local general directives for the protection of experimental animals (Directive 86/609/CE, R.D. 223/1988) and under

the supervision of the bioethics committee of our university. All animals were pretreated with clopidogrel (300 mg) and aspirin (325 mg) 1 day before the procedure. After the procedure, animals received aspirin (100 mg) and clopidogrel (75 mg) throughout the study period.

The swine were sedated with a combination of ketamine (5 mg/kg), midazolam (0.5 mg/kg), and atropine (0.04 mg/kg) as needed, by intramuscular injection. Fifteen minutes later, propofol (4 mg/kg), atracurium besilate (0.5 mg/kg), and fentanyl (2  $\mu$ g/kg) were administered intravenously to achieve the appropriate grade of anesthesia that was verified by the absence of a limb withdrawal reflex. They were subsequently intubated and ventilated with oxygen (2 L/min) and isoflurane 1.5–3.0% (1.5 L/min). A 7F introducer sheath was inserted into a carotid artery by surgical cut down. Heparin (200 IU/kg) was administered intravenously. Under fluoroscopic guidance, a guiding catheter was positioned in the coronary ostium. Heart rate, blood pressure, and the electrocardiogram were monitored throughout the procedure.

**Stent Implantation.** Coronary angiography was performed under fluoroscopic guidance (GE STENOSCOPI<sup>®</sup>, GE Medical Systems, Salt Lake City, UT). Stents were deployed in each animal following a randomization chart that allocated one stainless-steel stent (Tecnica<sup>®</sup>) 3.5 mm diameter / 15 mm length, one cobalt-chromium stent (Chrono<sup>®</sup>) 3.5 mm diameter / 16 mm length, and one TES (Janus<sup>®</sup>) 3.5 mm diameter / 15 mm length. The stents were implanted in the proximal portion (at least 5 mm distal to the ostium with diameter  $\geq 3$  mm) of each coronary artery, left anterior descending, left circumflex, and right coronary artery. All stents were deployed at nominal pressure (9 atm), allowing a higher pressure in a second inflation if the relation to the vessel was less than 1.1 to obtain light-to-moderate injury (10–20% overstretch). The stent-to-artery ratio was analyzed in the postimplantation coronary angiography images.

**Tissue Harvest and Analysis.** Euthanasia was performed according to the follow-up protocol. The animals were sedated with a single intramuscular dose of azaperone (2 mg/kg), with subsequent intravenous administration of heparin (400 IU/kg) and euthanasia agent T-61<sup>®</sup> (InterVet, Salamanca, Spain) with embutramide, mebezonium iodide, and tetracaine at a dose of 0.3 mL/kg. Immediately after euthanasia, the hearts were harvested and the coronary arteries were perfused



**Figure 1.** Scanning electron microscopy of porcine coronary stent struts over the ostium of a side branch 7 days after implantation. Panel A (Cobalt-chromium, Chrono<sup>®</sup> stent): absence of endothelialization of stent struts. Panel B (Tacrolimus-eluting, Janus<sup>®</sup> stent): partial endothelialization of struts. Panel C (Stainless steel, Tecnic<sup>®</sup> stent): complete endothelialization of multiple struts over the ostium of a side branch.

in situ with phosphate-buffered saline (PBS) and then fixed with 10% neutral-buffered formalin at 60–80 mm Hg. After 24 hours, the vessels were bisected longitudinally under a dissecting microscope. Both halves were processed for scanning electron microscopy for evaluation of endothelialization as described elsewhere.<sup>15</sup>

The luminal surfaces of the bisected halves of each stent were examined enface in a JSM-6480 LV (JEOL, Tokyo, Japan) scanning electron microscope and low-power and high-power images were digitally acquired. The adequate discrimination of endothelial cells was based on morphological features: cells highly oriented and exhibiting a cobblestone-like phenotype, appearing as a confluent flattened monolayer. To measure the rate of endothelialization, the images were processed and analyzed with NIH-Image software (National Institutes of Health, Bethesda, MD). The origin of side branches was identified and those in which at least one stent strut was placed over the ostia were selected for analysis. The total metallic surface of the stent and its endothelialized portion were measured both in the whole stent and in the struts over the ostia of the side branches. The areas of the origin of the side branches were also quantified in these images to calculate the ratio between the area of the strut over the ostium and the area of the ostium of the side branch.

**Sample Size and Statistical Analysis.** Based on our own previous results,<sup>16</sup> sample size has been calculated with a power of 80% and Type I ( $\alpha$ ) error of 5% to demonstrate a 17% difference in stent surface endothelialization between different stents at 7 days; assuming a standard deviation (SD) of 10%, 5 animals are needed.

The variables are presented as mean  $\pm$  SD and absolute numbers (percentages) where applicable. Data were analyzed for overall differences among different stents and follow-up periods using one-way ANOVA; correlations between quantitative variables were analyzed using linear regression analysis. A logistic regression multivariate analysis was carried out to determine the predictors of endothelialization of stent struts located over the origin of side branches; all variables that, in univariate analysis, showed a relationship with this variable at a probability value of  $P \leq 0.10$  were included. Probability values of  $P < 0.05$  were considered significant.

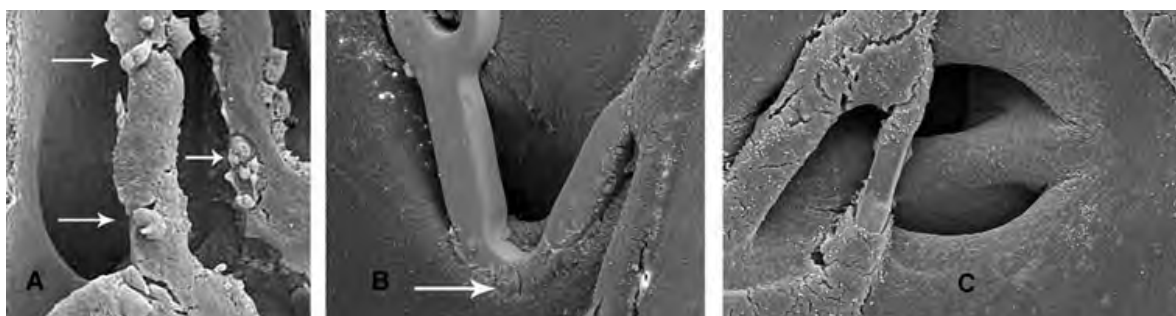
## Results

All the animals survived the stent implantation procedure and completed the scheduled follow-up period. In total, 33 stents were deployed (15 stents in the 7-day group, 9 in the 3-day group, and 9 in the 1-day group), achieving a final stent-to-artery ratio of  $1.16 \pm 0.06$  without differences between stents ( $P = 0.87$ ). There were no episodes of subacute stent thrombosis.

Out of the 33 stents, 25 showed at least one strut over the origin of a side branch; 44 branches (mean area of the ostium,  $0.8 \pm 0.6 \text{ mm}^2$ ; range, 0–4 branches per stent) were found partially covered by struts. The presence of covered branches was more common in the stents placed in the left anterior descending artery (73%) than in the other arteries (41%,  $P = 0.014$ ), reflecting the higher number of side branches of this coronary artery.

Different patterns of endothelialization were observed, from the total absence of endothelial cells over the struts (Fig. 1, panel A) to the complete

ENDOTHELIALIZATION OF NONAPOSED STENT STRUTS



**Figure 2.** Samples of partial endothelialization 3 days after implantation. Panel A (Cobalt-chromium, Chrono<sup>®</sup> stent): high rate of endothelialization, presence of giant cells (arrows). Panel B (Tacrolimus-eluting, Janus<sup>®</sup> stent): endothelial coverage begins at the borders of the struts (arrow). Panel C (Stainless steel, Tecnic<sup>®</sup> stent): partial endothelialization of struts over the ostium of a side branch.

endothelialization of all the struts (Fig. 1, panel C). Most of the samples showed a partial coverage of the struts by endothelial cells (Fig. 1, panel B and Fig. 2). No strut over side branches was endothelialized at 1-day follow-up; 35 ± 23% of the surface of struts over side branches was endothelialized at 3 days, and this rate of endothelialization was 73 ± 41% at 7 days (P = 0.023). Although TES showed a lower degree of endothelialized struts over side branches (35 ± 46%) than stainless-steel stent or cobalt-chromium stent (55 ± 43%), the global difference was not significant (P = 0.2). The rates of endothelialization in the 3 groups of follow-up for the whole stents and for the struts covering the origin of the side branches are summarized in Table 1.

No relationship between stent-to-artery ratio, or coronary artery location, and endothelialization was observed (Table 2). Other factors were related to the endothelialization rate of stent struts lying over the origin of side branches: the ratio of strut-to-ostium area (r<sup>2</sup> 0.12, P = 0.04) and the rate of endothelialization of the whole stent (r<sup>2</sup> 0.58, P = 0.0002). The multivariate analysis showed that the only predictor of the strut endothelialization rate, over the origin of side branches, was the endothelialization of the whole stent (P = 0.03).

**Discussion**

The results of this study confirm the strut endothelialization of Carbofilm<sup>®</sup>-coated stents lying over the origin of side branches. The endothelialization rate was time-dependent, as the global stent rate. The best predictor of strut endothelialization was the rate of endothelial lining of the whole stent.

Results from the literature demonstrated that the fate of side branches covered by DESs is similar to those covered by bare metal stents, with a high rate of spontaneous recanalization.<sup>17</sup> However, the clinical significance of the initial damage of these unprotected small branches could be reflected in a higher incidence of myocardial infarction at 30 days (8.3% vs. 3.3%, P = 0.047) as TAXUS V<sup>18</sup> showed in patients requiring multiple DESs; a similar, although nonsignificant, trend was observed in the small-vessel subgroup. Angiographic analysis in the multiple stent cohort demonstrated more frequent occurrence of progressive side branch narrowing to more than 70% diameter stenosis or to total occlusion with the paclitaxel-eluting stent versus the bare metal stent (42.6% vs. 30.6%;

**Table 1.** Rate of Endothelialization (%) of the Surface of Stent Struts Lying over the Origin of Side Branches and in the Whole Stent

	Struts over Side Branches	Whole Stent
1-day follow-up		
Stainless-steel stent	0	31 ± 30%
Cobalt-chromium stent	0	31 ± 30%
Tacrolimus-eluting stent	0	27 ± 23%
3-day follow-up		
Stainless-steel stent	39 ± 10%	79 ± 17%
Cobalt-chromium stent	49 ± 27%	81 ± 18%
Tacrolimus-eluting stent	9 ± 13%	46 ± 10%*
7-day follow-up		
Stainless-steel stent	88 ± 30%	95 ± 5%
Cobalt-chromium stent	76 ± 43%	98 ± 1%
Tacrolimus-eluting stent	57 ± 50%	79 ± 9%*

\*P < 0.05 (tacrolimus-eluting stent vs. stainless-steel/cobalt-chromium stents).

**Table 2.** Variables Associated with the Rate of Endothelialization (%) of Stent Struts Lying over the Origin of Side Branches

Variable	Endothelialization of the Struts (%)	P (Univariate)	P (Multivariate)
Coronary artery	LAD 42 ± 11%	0.7	–
	LCX 57 ± 14%		
	RCA 50 ± 16%		
Stent implanted	Cobalt-chromium stent 53 ± 14%	0.44	–
	Stainless-steel stent 57 ± 12%		
	Tacrolimus-eluting stent 35 ± 13%		
Ratio of stent to artery	$r^2 = 0.003$	0.7	–
Ratio of % strut endothelialization to branch area	$r^2 = 0.1$	0.06	–
% Endothelialization in the rest of the stent	$r^2 = 0.58$	0.0002	0.03
Ratio of metal to branch area	$r^2 = 0.12$	0.04	0.52

$P = 0.03$ ); only TAXUS stent has been related to this complication. Hypersensitivity reactions to the drug or polymer<sup>7,8</sup> and a thicker polymer-coated stent strut<sup>18</sup> have been suggested as the underlying mechanisms. Carbofilm<sup>®</sup> (turbostratic carbon film) coated stents have demonstrated an excellent safety profile in coronary interventions, without stent thrombosis even in patients taking aspirin alone after stent implantation.<sup>19</sup> The absence of polymer coating allows thinner stent struts and avoids adverse hypersensitivity reactions. The observed endothelialization of the struts of Janus<sup>®</sup> stent covering the origin of side branches could offer an advantage in terms of reduction of thrombotic events at these sites.

The role of incomplete stent apposition in the genesis of LST remains controversial: some published data suggest a link between them,<sup>12,13</sup> while other authors do not find a clear relationship.<sup>20,21</sup> Some relevant differences have been highlighted between initial and late incomplete stent apposition,<sup>22</sup> the first being dependent on technical aspects and the latter related to positive remodeling or resorption of thrombus or plaque.<sup>23,24</sup> In any case, stent struts that lie over the origin of unprotected side branches are considered to be non-apposed to the vessel wall and remain indefinitely if these branches do not require further treatment. Unfortunately, little knowledge of the healing process of these struts is available, since in vivo studies with powerful technologies such as optical coherence tomography have excluded those struts over side branches from the analysis, maybe considering them as nonendothelialized.<sup>13,25,26</sup> Apart from the human histopathological data, linking malapposition to LST,<sup>10</sup> only one experimental study showed some data on the endothelialization of nonapposed struts. Morton et al.<sup>27</sup> analyzed the free metal “septum” that could be observed after the implantation of 2 simultaneous kissing stents

in the left main coronary artery in 4 swine (2 samples were analyzed with scanning electron microscopy, 2 with cross-sectional histology). At 28 days, the free struts in the lumen showed some nonendothelialized areas with adherent platelets, while at 90 days, the “metal septum” was covered by a smooth, thin layer of regular neointima. In addition to these findings, our results confirm that stent struts not apposed to the vessel wall can have a healing process similar to the rest of the stent.

Some limitations must be acknowledged. Although the sample size calculation supports the adequate power of the study, comparisons between different stents must be interpreted with caution. The porcine coronary model and the human coronary arteries critically differ: stents are implanted into normal nonatherosclerotic arteries of young animals, whereas in humans stents are deployed on atherosclerotic plaques of aged patients. Current animal models<sup>28,29</sup> are based both on rabbit iliac and on swine coronary arteries. Until more complex models,<sup>30</sup> like double injury rabbits, can prove its superiority, the porcine coronary model is accepted by consensus<sup>31</sup> as adequate. The temporal course of healing differs between species and protocols. Finn et al.<sup>9</sup> have suggested a 14-day period to complete the endothelialization of cobalt–chromium stents in their swine model. We<sup>16</sup> have observed full endothelialization of bare metal stents at 7 days in our model. Therefore, we decide to analyze earlier periods of the healing process, just before detecting the complete endothelial lining. It remains to be determined the specific role of Carbofilm<sup>®</sup> coating in the observed endothelialization process as far as no uncoated metal stent was used as control in our study.

The results of this animal test demonstrate that the struts of different Carbofilm<sup>®</sup>-coated stents, placed over the origin of side branches, showed an acceptable

## ENDOTHELIALIZATION OF NONAPOSED STENT STRUTS

rate of endothelialization that mimics the healing of the rest of the stent. Despite the elution of tacrolimus, Janus<sup>®</sup> stent showed fairly well endothelialized struts over the origin of side branches. The clinical relevance of these findings should be tested in further clinical trials.

## References

1. Finn AV, Joner M, Nakazawa G, et al. Pathological correlates of late drug-eluting stent thrombosis: Strut coverage as a marker of endothelialization. *Circulation* 2007;115:2435–2441.
2. Stone GW, Moses JW, Ellis SG, et al. Safety and efficacy of sirolimus- and paclitaxel-eluting coronary stents. *N Engl J Med* 2007;356:998–1008.
3. Iakovou I, Schmidt T, Bonizzoni E, et al. Incidence, predictors, and outcome of thrombosis after successful implantation of drug-eluting stents. *JAMA* 2005;293:2126–2130.
4. Camenzind E, Steg PG, Wijns W. Stent thrombosis late after implantation of first-generation drug-eluting stents: A cause for concern. *Circulation* 2007;115:1440–1455; discussion 1455.
5. Lagerqvist B, James SK, Stenestrand U, et al. Long-term outcomes with drug-eluting stents versus bare-metal stents in Sweden. *N Engl J Med* 2007;356:1009–1019.
6. Pfisterer M, Brunner-La Rocca HP, Buser PT, et al. Late clinical events after clopidogrel discontinuation may limit the benefit of drug-eluting stents: An observational study of drug-eluting versus bare-metal stents. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:2584–2591.
7. Nebeker JR, Virmani R, Bennett CL, et al. Hypersensitivity cases associated with drug-eluting coronary stents: A review of available cases from the research on adverse drug events and reports (RADAR) project. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:175–181.
8. Virmani R, Guagliumi G, Farb A, et al. Localized hypersensitivity and late coronary thrombosis secondary to a sirolimus-eluting stent: Should we be cautious? *Circulation* 2004;109:701–705.
9. Finn AV, Nakazawa G, Joner M, et al. Vascular responses to drug eluting stents: Importance of delayed healing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1500–1510.
10. Joner M, Finn AV, Farb A, et al. Pathology of drug-eluting stents in humans: Delayed healing and late thrombotic risk. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:193–202.
11. Luscher TF, Steffel J, Eberli FR, et al. Drug-eluting stent and coronary thrombosis: Biological mechanisms and clinical implications. *Circulation* 2007;115:1051–1058.
12. Cook S, Wenaweser P, Togni M, et al. Incomplete stent apposition and very late stent thrombosis after drug-eluting stent implantation. *Circulation* 2007;115:2426–2434.
13. Siqueira DA, Abizaid AA, Costa Jde R, et al. Late incomplete apposition after drug-eluting stent implantation: Incidence and potential for adverse clinical outcomes. *Eur Heart J* 2007;28:1304–1309.
14. Farb A, Burke AP, Kolodgie FD, et al. Pathological mechanisms of fatal late coronary stent thrombosis in humans. *Circulation* 2003;108:1701–1706.
15. Farb A, Tang AL, Shroff S, et al. Neointimal responses 3 months after (32)P beta-emitting stent placement. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;48:889–898.
16. Perez de Prado A, Perez C, Cuellas C, et al. Time pattern of stent endothelialization in a swine coronary model: Characterization and quantification [Abstr]. *Am J Cardiol* 2007;100:177L.
17. Tanabe K, Serruys PW, Degertekin M, et al. Fate of side branches after coronary arterial sirolimus-eluting stent implantation. *Am J Cardiol* 2002;90:937–941.
18. Stone GW, Ellis SG, Cannon L, et al. Comparison of a polymer-based paclitaxel-eluting stent with a bare metal stent in patients with complex coronary artery disease: A randomized controlled trial. *JAMA* 2005;294:1215–1223.
19. Bartorelli AL, Trabattoni D, Montorsi P, et al. Aspirin alone antiplatelet regimen after intracoronary placement of the carbostent: The ANTARES study. *Catheter Cardiovasc Interv* 2002;55:150–156.
20. Hong MK, Mintz GS, Lee CW, et al. Impact of late drug-eluting stent malapposition on 3-year clinical events. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:1515–1516.
21. Hoffmann R, Morice MC, Moses JW, et al. Impact of late incomplete stent apposition after sirolimus-eluting stent implantation on 4-year clinical events: Intravascular ultrasound analysis from the multicentre, randomised, RAVEL, E-SIRIUS and SIRIUS trials. *Heart* 2008;94:322–328.
22. Mintz GS. What to do about late incomplete stent apposition? *Circulation* 2007;115:2379–2381.
23. Hong MK, Mintz GS, Lee CW, et al. Incidence, mechanism, predictors, and long-term prognosis of late stent malapposition after bare-metal stent implantation. *Circulation* 2004;109:881–886.
24. Nakazawa G, Finn AV, Joner M, et al. Delayed arterial healing and increased late stent thrombosis at culprit sites after drug-eluting stent placement for acute myocardial infarction patients: An autopsy study. *Circulation* 2008;118:1138–1145.
25. Matsumoto D, Shite J, Shinke T, et al. Neointimal coverage of sirolimus-eluting stents at 6-month follow-up: Evaluated by optical coherence tomography. *Eur Heart J* 2007;28:961–967.
26. Chen BX, Ma FY, Wei L, et al. Neointimal coverage of bare metal and sirolimus-eluting stents evaluated with optical coherence tomography. *Heart* 2007.
27. Morton AC, Siotia A, Arnold ND, et al. Simultaneous kissing stent technique to treat left main stem bifurcation disease. *Catheter Cardiovasc Interv* 2007;69:209–215.
28. Nakazawa G, Finn AV, John MC, et al. The significance of pre-clinical evaluation of sirolimus-, paclitaxel-, and zotarolimus-eluting stents. *Am J Cardiol* 2007;100:36M–44M.
29. Joner M, Nakazawa G, Finn AV, et al. Endothelial cell recovery between comparator polymer-based drug-eluting stents. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:333–342.
30. Joner M, Morimoto K, Kasukawa H, et al. Site-specific targeting of nanoparticle prednisolone reduces in-stent restenosis in a rabbit model of established atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:1960–1966.
31. Schwartz RS, Edelman E, Virmani R, et al. Drug-eluting stents in preclinical studies: Updated consensus recommendations for preclinical evaluation. *Circ Cardiovasc Intervent* 2008;1:143–153.



**TITULO:**

Análisis de la eficacia y seguridad de distintos balones liberadores de paclitaxel en modelo animal

**TITLE:**

Safety and efficacy of different paclitaxel-eluting balloons in a preclinical swine model

**AUTORES:** Armando Pérez de Prado<sup>1</sup>, Claudia Pérez-Martínez<sup>1</sup>, Carlos Cuellas<sup>1</sup>, Marta Regueiro<sup>1</sup>, Alejandro Diego<sup>1</sup>, José M. Gonzalo-Orden<sup>1</sup>, María Molina<sup>2</sup>, Álex Gómez<sup>2</sup>, Luis Duocastella<sup>2</sup>, Felipe Fernández-Vázquez<sup>1</sup>.

**AFILIACIONES:**

<sup>1</sup>Grupo Cardiovascular (HemoLeon) de la Fundación Investigación Sanitaria en León y del Instituto de Biomedicina (IBIOMED); Universidad y Hospital de León.

<sup>2</sup>Life Vascular Devices (LVD) Biotech, iVascular, Barcelona.

**FUENTE DE FINANCIACION:** Desarrollado parcialmente con ayuda CDTI (Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial, Ministerio de Economía y Competitividad) IDI-20111025.

**DIRECCION PARA CORRESPONDENCIA:**

Armando Pérez de Prado

S. Cardiología Intervencionista, Hospital de León, Complejo Asistencial Universitario de León, Altos de Nava SN, 24008, León, España

Tfno. y fax: +34 987237683

Email: [aperez@secardiologia.es](mailto:aperez@secardiologia.es)

**NUMERO TOTAL DE PALABRAS (excepto Tablas):** 4987

## RESUMEN ESTRUCTURADO

**Introducción y objetivos:** Los balones liberadores de paclitaxel han demostrado su eficacia en el tratamiento y prevención de la reestenosis. Sin embargo, no todos los dispositivos comercializados son igualmente efectivos; por ello es importante comparar los resultados en un modelo preclínico. Nuestro objetivo es analizar la seguridad y eficacia preclínica de distintos dispositivos.

**Métodos:** En 17 cerdos domésticos ( $25\pm 3$  kg) se implantaron 51 stents metálicos (Architect®, iVascular), uno en cada rama coronaria principal, sobredilatándose con distintos balones de control ( $n=10$ ) o liberadores de paclitaxel: BLP1, iVascular ( $n=15$ ); BLP2, iVascular ( $n=16$ ); In.Pact Falcon®, Medtronic ( $n=10$ ). Tras 28 días se analizan los resultados de reestenosis (angiografía e histomorfometría) y de reparación vascular: daño vascular, endotelización, persistencia de fibrina e inflamación.

**Resultados:** Los distintos balones liberadores de paclitaxel mostraron valores de estenosis al seguimiento similares, significativamente menores que los controles: angiografía,  $9\pm 12$  vs  $34\pm 18\%$  ( $p<0.0001$ ); histomorfometría,  $22\pm 8$  vs  $51\pm 18\%$  ( $p<0.0001$ ). Los grados de daño vascular ( $0.6\pm 0.5$ ) e inflamación ( $0.8\pm 0.3$ ) fueron bajos, sin diferencias entre los grupos. Los marcadores del efecto farmacológico fueron significativamente distintos en los dispositivos liberadores de paclitaxel (sin diferencias entre ellos) que en los controles: superficie endotelizada,  $87\pm 10$  vs  $99\pm 2\%$  ( $p=0.0007$ ); grado de fibrina,  $2.1\pm 0.7$  vs  $0.4\pm 0.5$  ( $p<0.0001$ ).

**Conclusiones:** En este modelo preclínico, los balones liberadores de paclitaxel analizados muestran una reducción significativa de la reestenosis. Aunque no se observan datos de daño vascular o inflamación persistentes, sí se aprecian los efectos de acción farmacológica en forma de endotelización retrasada y acumulación de fibrina.

**PALABRAS CLAVE:** Modelo animal; Stent; Balón liberador de paclitaxel; Reestenosis; Reparación vascular.

## ABSTRACT

**Introduction and objectives:** The drug-eluting balloons have demonstrated a high antiproliferative efficacy in the treatment and prevention of restenosis. Nevertheless, not all the available devices are equally effective; so, the comparison of the results in a preclinical model is relevant. Our objective is to assess the preclinical efficacy and safety of different devices.

**Methods:** In 17 domestic swine ( $25\pm 3$  kg), we implanted 51 metallic stents (Architect®, iVascular), one stent per major coronary artery. Stent postdilatation was performed with different control balloons ( $n=10$ ) or drug-eluting balloons: BLP1, iVascular ( $n=15$ ); BLP2, iVascular ( $n=16$ ); In.Pact Falcon®, Medtronic ( $n=10$ ). Restenosis rate (by angiography and histomorphometry) and vascular healing parameters (injury score, endothelialization rate, fibrin and inflammation scores) were analyzed at 28 days.

**Results:** All the drug-eluting balloons showed similar stenosis values at follow-up, significantly lower than control: angiographic,  $9\pm 12$  vs  $34\pm 18\%$  ( $p<0.0001$ ); histomorphometric,  $22\pm 8$  vs  $51\pm 18\%$  ( $p<0.0001$ ). The injury ( $0.6\pm 0.5$ ) and inflammation scores ( $0.8\pm 0.3$ ) were uniformly low in all the groups. As a marker of the pharmacologic effect, we observed lower values of endothelialization rate ( $87\pm 10$  vs  $99\pm 2\%$ ,  $p=0.0007$ ) and higher fibrin scores ( $2.1\pm 0.7$  vs  $0.4\pm 0.5$ ,  $p<0.0001$ ) in all the drug-eluting balloon groups than in controls.

**Conclusions:** In this preclinical model, the analyzed drug-eluting balloons showed a significant reduction in restenosis as compared with control balloons after stent implantation. No data of increased injury score or persistent inflammation was observed, but the delayed endothelialization and fibrin accumulation suggest a response to the drug deposition.

**KEYWORDS:** Animal model; Stent; Drug-eluting balloon; Restenosis; Vascular healing.

## ABREVIATURAS

**BLP** – Balón liberador de paclitaxel  
**DLM** – Diámetro luminal mínimo  
**LEI** – Lámina elástica interna

## ABBREVIATIONS

**DEB** – Drug Eluting Balloon  
**MLD** – Minimal Luminal Diameter  
**IEL** – Internal Elastic Lamina

## INTRODUCCION

Los stents coronarios proporcionan un recubrimiento y soporte luminal que elimina prácticamente el fenómeno de recuperación elástica y el posterior remodelado negativo del vaso, reduciendo la incidencia de reestenosis respecto a la angioplastia con balón en un 30%<sup>1,2</sup>. Sin embargo, los stents metálicos no solo no disminuyen la hiperplasia intimal, sino que asocian un comportamiento hiperproliferativo. Los stents farmacoactivos han eliminado prácticamente la aparición de reestenosis causada por proliferación neointimal<sup>3,4</sup>. A cambio, se ha demostrado un marcado enlentecimiento y deterioro de la reparación vascular<sup>5-8</sup> que puede traducirse clínicamente en la aparición de trombosis del stent<sup>5-7</sup> y desarrollo de neoaterosclerosis<sup>9,10</sup>. La presencia de un recubrimiento polimérico permanente se ha relacionado con fenómenos de inflamación persistente, hipersensibilidad y reparación vascular deficiente tanto en modelos experimentales<sup>11,12</sup> como en estudios necrópsicos humanos<sup>5,6,13</sup>.

Para evitar estos efectos indeseables se han propuesto sistemas alternativos para la administración de fármacos antiproliferativos como los balones liberador de paclitaxel (BLP), que han demostrado su eficacia en la prevención y tratamiento de la reestenosis tanto en modelos animales<sup>14,15</sup> como en estudios clínicos<sup>16,17</sup>. Sin embargo, no todos los BLP disponibles actualmente ofrecen los mismos resultados<sup>18-22</sup>, por lo que parece pertinente realizar análisis comparativos de distintos dispositivos. Los objetivos de este estudio son comparar los resultados en seguridad y eficacia de distintos BLP en el recomendado<sup>23,24</sup> modelo animal porcino de arterias coronarias sanas, así como determinar la cinética de liberación y depósito arterial del fármaco.

## METODOLOGÍA

**Modelo animal.-** Para la realización de este estudio experimental, aleatorizado, controlado y ciego en el análisis de las muestras finales se emplearon 17 cerdos domésticos (raza Large White) de 2-3 meses de edad y peso  $25 \pm 3$  kg, procedentes de la Granja Experimental de nuestro centro. Todos los procedimientos se llevaron a cabo según la normativa legal vigente española (Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia) y europea (Directiva 2010/63/UE) y tras la aprobación por parte del comité ético local del protocolo del estudio.

Todos los animales se pretrataron 24 horas antes del procedimiento, con ácido acetilsalicílico 325 mg y clopidogrel 300 mg. El protocolo anestésico y la preparación quirúrgica de los animales se ha descrito previamente<sup>25,26</sup>. En breve, tras la preparación de los animales y la administración de 5000 UI de heparina IV, se realizó abordaje de la arteria carótida izquierda para realizar angiografía de ambas coronarias tras la administración de nitroglicerina intracoronaria.

**Procedimiento coronario.-** Con el objetivo de implantar los dispositivos con una relación de tamaños stent : arteria de 1.1 a 1.2, se localizó el mejor segmento en cada una de las 3 coronarias mayores. Tras el paso de la guía de angioplastia, en cada coronaria mayor se implantó un stent de Cromo-Cobalto (Architect®, iVascular) de 14 mm de longitud y 3.5 mm (en DA y CD) o 3 mm (en Cx) de calibre. La presión de hinchado se ajustó para alcanzar la sobredimensión deseada. Tras el implante de los stents se realizó post-dilatación con distintos balones del mismo calibre que el stent implantado y de 20 mm de longitud, según tabla de asignación aleatorizada. El hinchado se realizó a la presión nominal que marcan los fabricantes durante 1 minuto (26 balones) o 2 minutos (25 balones) de forma aleatorizada para el análisis de posibles diferencias en la liberación del fármaco por los dispositivos.

**Dispositivos analizados.-** Los balones empleados y su número fueron los siguientes:

1. Balón convencional de angioplastia, sin fármaco, **control** (n=10): Xperience®, iVascular.
2. **BLP1** (n=15): Formulación experimental 1, iVascular. Sobre la base del balón Xperience® se aplica paclitaxel ( $3 \mu\text{g}/\text{mm}^2$  de superficie) en formulación nanocristalina combinada con un plastificante biocompatible mediante tecnología de deposición ultrasónica TransferTech® que proporciona un fino recubrimiento homogéneo. El tiempo de liberación del fármaco se calcula por el fabricante *a priori* en 30-60 segundos, de modo que el inflado del balón por encima de 60 segundos no proporcionaría liberación adicional de fármaco.
3. **BLP2** (n=16): Formulación experimental 2, iVascular. Similar al BLP1, con matriz transportadora del fármaco más hidrofílica. La combinación de los grupos hidrofílicos de esta nueva matriz con los grupos hidrofóbicos ya presentes en la cadena principal, proporcionan un aumento de la polaridad en el recubrimiento, lo que potencialmente incrementa la solubilidad del propio fármaco.

4. **BLP3** (n=10): BLP comercial In.Pact Falcon® (Medtronic). La formulación de paclitaxel ( $3 \mu\text{g}/\text{mm}^2$  de superficie) también es cristalina, empleando como excipiente urea y aplicándose al balón mediante la tecnología FreePac®.

Todos los materiales fueron suministrados por iVascular, incluyendo BLP1 y BLP2, dispositivos aún no comercializados. Tras la aplicación del tratamiento se conservaron los balones para analizar la cantidad de paclitaxel remanente en los balones mediante cromatografía líquida, HPLC.

**Análisis angiográfico.**- Al finalizar el procedimiento descrito en cada arteria se realizó una nueva coronariografía tras la administración de nitroglicerina intracoronaria para determinar el diámetro luminal mínimo (DLM) intrastent. A los 28 días, se realizó coronariografía de control para la determinación del DLM al seguimiento. Para las mediciones de ambas variables, así como los diámetro de referencia (DRef) de la arteria tratada (valor promedio de los segmentos arteriales situados 5 mm proximal y distalmente a los bordes del stent), se empleó el software de cuantificación automática Medis QCA-CMS®, versión 6.1. Se calculan los parámetros de reestenosis angiográficos:

1. Pérdida tardía ("*late loss*") = DLM inicial – DLM seguimiento.
2. % estenosis por angiografía =  $[1 - (\text{DLM seguimiento} / \text{DRef})] \times 100$ .

**Análisis histopatológico.**- Tras completar el estudio angiográfico de control se realizó la eutanasia de los animales, procediéndose al estudio anatómico-patológico completo. Tras el explante del corazón y la perfusión a presión – fijación inicialmente con PBS y a continuación con paraformaldehído al 4% de las arterias coronarias, se disecaron los segmentos arteriales tratados respetando al menos 5 mm proximales y distales. La inclusión en resina de estas muestras permitió realizar secciones circunferenciales representativas de los segmentos proximal, central y distal de cada una de las muestras para ofrecer así valores medios en cada segmento estudiado. Tras la desplastificación de las secciones se procedió a la tinción mediante técnicas rutinarias de hematoxilina – eosina (H-E) y elastina de van Gieson. Con el fin de determinar una potencial toxicidad farmacológica a distancia, se realizó el estudio microscópico de distintos órganos (pulmón, riñones, hígado, bazo) así como del miocardio suplido por las arterias tratadas.

El análisis histomorfométrico se realizó sobre imágenes digitalizadas de las arterias recogidas con un microscopio Olympus PRovis AX70® (Tokio, Japón) con cámara digital Nikon DXM 1200® incorporada, empleando el *software* ImageJ - NIH Image 1.4 (National Institutes of Health, Estados Unidos). La planimetría de las áreas luminal y de lámina elástica interna (LEI) permite calcular las 2 variables de reestenosis derivadas de la histología:

1. Área de neointima = área LEI – área luminal.
2. % estenosis por histología =  $[1 - (\text{área luminal} / \text{área LEI})] \times 100$ .

El análisis histopatológico de la seguridad de los tratamientos se basa en el análisis semicuantitativo de cuatro parámetros fundamentales<sup>27</sup>, Tabla 1: el grado de daño vascular (*injury score*) según Schwartz et al<sup>28</sup>, la intensidad de la inflamación según Kornowski et al<sup>29</sup>, la acumulación de fibrina persistente según Suzuki et al<sup>30</sup> y el grado de (re-)endotelización mediante el cálculo del porcentaje aproximado de cobertura de la superficie luminal por células endoteliales. Dada la elevada cantidad de superficie recubierta por células endoteliales a los 28 días del tratamiento, se realiza una valoración adicional estimando la re-endotelización como TOTAL cuando la cobertura de la superficie por células endoteliales es  $\geq 95\%$ <sup>27</sup>.

**Estudio farmacocinético.**- Para comprobar la tasa de transferencia del paclitaxel a la arteria, la remanencia de fármaco en el balón y la liberación al torrente sanguíneo se realizó una fase experimental sobre 3 animales adicionales con el siguiente protocolo: tras obtener canulación selectiva de coronarias izquierda y derecha según la metodología descrita previamente, se implantaron stents de Cromo-Cobalto en los segmentos proximal o medio cada una de las ramas coronarias mayores que se usaron como marcadores. Distalmente a cada uno de los stents se realizó una dilatación con balones BLP1 durante 60 segundos a presiones entre 7 y 10 atmósferas para obtener ratios balón : arteria de 1.1 – 1.2. Se programaron distintos tiempos de seguimiento (15-30 minutos, n=2 balones; 60-90 minutos, n=2; 2 horas, n=2; 24 horas, n=3) tras los cuales se extrajeron las arterias tratadas para su inmediata congelación y posterior análisis. En los mismos plazos temporales se extrajeron muestras de sangre periférica.

La determinación de paclitaxel se realizó mediante cromatografía líquida (HPLC). Las zonas arteriales tratadas se procesaron mediante digestión de la muestra, concentrándose los extractos a sequedad y redisolviéndose con 1 ml de acetonitrilo. Tras la inyección de la muestra en el equipo de HPLC (1260 Infinity HPLC-Chip/MS System, Agilent Technologies) se cuantificó la cantidad de paclitaxel por interpolación a una

recta de calibrado, expresando los resultados en  $\mu\text{g}$  de paclitaxel / g de tejido. El flujo de trabajo fue de 0,8 ml/min, a través de una columna Zorbax Eclipse Plus, C18, 5  $\mu\text{m}$ , 4.6 x 100mm, y detección a 227nm.

**Metodología estadística.**- Los valores se expresan como proporciones y como media  $\pm$  desviación estándar, según corresponde al tipo de variable. Las variables semicuantitativas, como las escalas de las variables de seguridad analizadas por histopatología, se presentan como media  $\pm$  desviación estándar (la forma más habitual en las publicaciones previas) y como proporciones (como se recomienda en los documentos de consenso<sup>23,24</sup>).

Se analizan las diferencias de las medias de los grupos con un test t de Student y análisis de las varianzas ANOVA; para comparaciones múltiples se utilizan los métodos *post hoc* de Dunnett (comparación con control) y de Tukey (comparación de todos los pares). Las variables semicuantitativas se analizan mediante el test  $\chi^2$  y test exacto de Fisher. Para valorar la potencial influencia que distintas variables (ratio stent : arteria tratada, tiempo de hinchado, *injury score*) pueden tener en los resultados finales, se realizan análisis multivariado de regresión logística. Se consideran significativas las diferencias con  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

Todos los stents se implantaron y sobredilataron con los balones asignados según el protocolo. Durante los procedimientos se produjeron 4 complicaciones transitorias sin relación con los dispositivos analizados: 1 embolia aérea en coronaria izquierda por insuficiente purgado del catéter que se resolvió con infusión de aminos y oxígeno al 100% y 3 casos (1 caso con BLP1, 1 caso con BLP2 y otro caso con balón control) de trombosis coronarias distales provocadas por retraso en la administración de heparina o dosis insuficiente de ésta que se resolvieron con trombectomía. En ninguno de los casos se observó afectación final del dispositivo implantado y sobredilatado, conservándose permeables con buen flujo. La ratio de sobredilatación stent : arteria obtenida en estas fases alcanzó el objetivo programado,  $1.21 \pm 0.14$ , sin diferencias significativas entre arterias o los distintos grupos de tratamiento. En los balones extraídos tras el tratamiento se midieron muy pequeñas cantidades de paclitaxel respecto al cargado inicialmente: BLP1,  $1.04 \pm 1.47\%$ ; BLP2,  $0.46 \pm 0.56\%$ ; y BLP3,  $4.79 \pm 3.40\%$ , sin diferencias significativas entre ellos.

Los animales completaron el seguimiento según lo previsto, realizándose los controles angiográficos y análisis histológicos programados sin incidencias. En el análisis angiográfico final todos los segmentos tratados estaban permeables. En la necropsia se observaron pequeñas zonas de infarto no transmural en los 4 animales que presentaron complicaciones durante el procedimiento; el resto de las muestras cardiacas no presentó alteraciones relevantes. Los análisis microscópicos de los órganos a distancia no mostraron datos de toxicidad, hipersensibilidad o efecto alguno de la droga empleada.

**Análisis de eficacia anti-reestenótica.**- Se observan diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ) entre el balón control y los distintos BLP, tanto en la pérdida tardía (*late loss*,  $1.33 \pm 0.5$  vs.  $0.4 \pm 0.42$  mm) como en el porcentaje de estenosis por angiografía ( $33.5 \pm 17.8$  vs.  $9.4 \pm 11.8\%$ ). Las diferencias entre los distintos sistemas BLP o según el tiempo de hinchado (1 o 2 minutos) NO son significativas (Tabla 2).

Se analizan adecuadamente por histomorfometría todos los segmentos arteriales para un total de 153 secciones. De forma concordante con los resultados angiográficos, se aprecian mejores resultados de reestenosis ( $p < 0.0001$ ) con los distintos BLP que con el control. No se detectan diferencias entre los distintos BLP ni en función del tiempo de hinchado (Tabla 3 y Figura 1).

Se repiten los análisis estadísticos excluyendo las arterias que habían presentado los eventos mencionados previamente, sin variación significativa en los resultados. Se realizan análisis multivariados para valorar la potencial contribución de distintos factores conocidos en los valores observados. De forma independiente, se observa menor grado de reestenosis en CD que en DA ( $p < 0.02$ ) y, consistentemente en todos los modelos, con cualquier BLP que con el control ( $p < 0.01$ ), sin diferencias entre los distintos BLP.

**Análisis de la seguridad.**- El análisis histológico demuestra de forma global un grado de daño vascular (*injury score*) bajo, sin diferencias significativas entre los grupos (control  $0.88 \pm 0.56$  vs. todos los BLP  $0.58 \pm 0.46$ ;  $p = 0.07$ ). El mismo fenómeno se observa en el grado de inflamación, globalmente muy bajo (control  $0.89 \pm 0.16$  vs. todos los BLP  $0.80 \pm 0.31$ ;  $p = 0.4$ ). No se observa ningún caso de necrosis de la túnica media. Sin embargo, se detectan 2 diferencias significativas, características de la liberación de paclitaxel (Figura 2): 1) la acumulación persistente de fibrina es significativamente mayor en los BLP ( $2.09 \pm 0.73$ , sin diferencias entre ellos) que en el control ( $0.43 \pm 0.47$ ),  $p = 0.0001$ ; y 2) el porcentaje de superficie luminal endotelizada es significativamente inferior en los BLP ( $87 \pm 10\%$ , sin diferencias significativas entre ellos) que en el control ( $99 \pm$

1%),  $p=0.0007$ . Se observa re-entotelización TOTAL (cobertura endotelial  $\geq 95\%$ ) en el 100% de los balones control frente a un 40% de los BLP1, un 12.5% de los BLP2 y un 20% de los BLP3.

**Protocolo farmacocinético.**- Las cantidades de paclitaxel detectadas en las arterias tratadas en este grupo de animales muestran un descenso progresivo de las concentraciones desde las primeras determinaciones a los 15-30 minutos con  $212 \pm 32 \mu\text{g/g}$  de tejido hasta las observadas a las 24 horas en las que aún se detecta,  $78 \pm 9 \mu\text{g/g}$  de tejido (Figura 3). No se observaron niveles detectables de paclitaxel en sangre periférica en ningún punto.

## DISCUSION

Los principales resultados de este ensayo son: 1) los BLP empleados en este modelo preclínico reducen de forma equivalente y significativa la reestenosis provocada por el implante de stent, tanto desde el punto de vista angiográfico como histológico; 2) no se observa una reacción inflamatoria persistente ni un mayor grado de daño vascular en comparación con los balones control; y 3) la liberación efectiva de paclitaxel desde estos dispositivos se caracteriza por causar un retraso en la reparación vascular respecto al control, objetivable en forma de menor grado de re-entotelización y mayor persistencia de fibrina en profundidad alrededor del stent.

Todos los parámetros de eficacia anti-reestenótica analizados demuestran de forma consistente la superioridad de los distintos BLP frente al control sin fármaco. Estudios previos ya han demostrado la superior eficacia de distintos BLP comerciales sobre el balón control<sup>14,15</sup>, aunque en algunos casos las diferencias no eran evidentes en todos los parámetros analizados<sup>20,21</sup>. El modelo empleado es muy similar a otros anteriores con seguimiento de 28 días (equiparables a 6 meses en humanos), con valores de sobredimensión (ratio stent : arteria  $1.21 \pm 0.14$ ) y valores de estenosis porcentual por angiografía ( $33.5 \pm 17.8\%$ ) y por histología ( $51 \pm 17.9\%$ ) en el grupo control similares a los citados previamente<sup>14,15,20,26</sup>. En nuestra serie no hay diferencias entre los distintos BLP empleados ni en función de los tiempos de hinchado, que fue igual o superior al recomendado por los fabricantes. Estos resultados se corroboran en los análisis multivariados que limitan la influencia de posibles factores de confusión.

A pesar de la importante sobredimensión, el grado de daño vascular inducido no es muy elevado, con un valor medio de  $0.64 \pm 0.49$  (12 de los 51 stents presentaban *injury score* medio superior a 1, pero ninguno alcanzó el valor de 2). No hay diferencias entre los grupos de los distintos BLP, pero se aprecia una tendencia a mayor daño vascular en el grupo control. Esta relación no se confirma en el análisis multivariado en el que sólo se aprecia relación entre el *injury score* y la ratio stent : arteria, ligeramente mayor en los controles ( $1.25 \pm 0.16$ ) que en los BLP ( $1.20 \pm 0.14$ ). No se observan diferencias en el grado de inflamación persistente entre ninguno de los grupos, con valores bajos en todos los casos (media de  $0.82 \pm 0.29$ ). Este hallazgo descarta fenómenos de toxicidad, en consonancia con la ausencia de necrosis significativa de la media, o de hipersensibilidad / alergia. La ausencia de los polímeros que se emplean en muchos de los stents liberadores de fármacos y que pueden perpetuar estos fenómenos anormales de reparación vascular<sup>5,6,11-13</sup> explicaría esta respuesta.

Sin embargo, sí se observan 2 fenómenos asociados con retraso en la reparación vascular, muy directamente relacionados con el efecto antiproliferativo del paclitaxel: la re-entotelización es ligera pero significativamente menor con los BLP que con el control; la presencia de fibrina alrededor del stent también es significativamente mayor con los BLP que con el control. Esta observación coincide plenamente con lo descrito previamente: Joner et al<sup>20</sup> demuestran que sólo los BLP eficaces en la reducción de reestenosis muestran menor grado de re-entotelización y mayor grado de fibrina. Estas observaciones deben interpretarse como prueba de concepto de la transferencia efectiva de paclitaxel a la arteria. Algunos estudios previos refieren en forma descriptiva una adecuada endotelización de los stents sobredilatados con BLP a los 28 días<sup>14,15</sup>, si bien es cierto que la valoración de la re-entotelización de la arteria tras estos tratamientos es compleja como refleja la ausencia de una única clasificación para su evaluación<sup>27</sup>. En cualquier caso, la superficie endotelizada de los stents sobredilatados con BLP oscila entre  $84 \pm 3$  y  $95 \pm 4\%$ , muy similar a la descrita previamente con los BLP con eficacia anti-reestenótica<sup>20,21</sup>.

La transferencia del fármaco desde los BLP es muy elevada, permaneciendo menos del 10% del cargado inicialmente en el balón tras el procedimiento. Las concentraciones de paclitaxel medidas demuestran su persistencia en la pared arterial hasta 24 horas tras su administración, lo que explica que un mínimo periodo de tiempo en la aplicación del fármaco puede traducirse en efectos a más largo plazo. Los valores medidos son prácticamente superponibles a los observados en otros estudios<sup>31</sup> en los que se aprecia una reducción lineal de las concentraciones desde la aplicación del balón hasta las 24 horas con posterior persistencia de los niveles sin grandes cambios hasta los 28 días.

Como todos los modelos pre-clínicos, esta serie tiene sus limitaciones inherentes: ningún modelo animal reproduce todas las complejas características de la enfermedad humana. Los modelos de animal enfermo podrían reflejar algunas de estas particularidades pero aún se desconoce su significado exacto, por ello se recomienda el modelo empleado para analizar la respuesta vascular a este tipo de dispositivos<sup>23,24</sup>. El modelo concreto de implante de stent coronario y posterior sobredilatación con balones no refleja exactamente todas de las condiciones clínicas en las que se usan estos dispositivos, pero si constituye el mejor modelo experimental en términos de inducción de reestenosis como lo demuestra su uso en las series previamente publicadas<sup>14,15,20,21,31</sup>. Este modelo comparte características de las lesiones *de novo* y de la reestenosis; la discutida menor eficacia de los BLP en la primera situación podría influir en la ausencia de diferencias entre los BLP. Si bien los resultados observados no permiten señalar diferencias entre los BLP analizados, no es descartable que existan entre otros diseños no incluidos en este estudio<sup>20,22</sup>. La evaluación histológica con valoraciones semicuantitativas también supone una limitación en la precisión; sin embargo, se emplean las escalas consensuadas<sup>23,24</sup>. El modelo empleado para el estudio farmacocinético también puede ser discutible al no tener en cuenta el importante papel que la presencia de placa aterosclerótica puede tener en la captación del fármaco.

### CONCLUSIONES

En el modelo preclínico de coronarias normales porcinas con implante de stent y sobredilatación con balón, los balones liberadores de paclitaxel analizados muestran una reducción significativa de la reestenosis en comparación con el control. Aunque no se observan datos de daño vascular o inflamación persistentes, sí se aprecian los efectos de la acción farmacológica en forma de endotelización retrasada y acumulación de fibrina en profundidad.

TABLA 1.- Escalas de valoración histopatológica de la seguridad<sup>28</sup>

	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3
<b>Daño vascular (injury score)</b> <i>Schwartz et al</i> <sup>29</sup>	Sin deformación LEI ni capa media	LEI lacerada, media comprimida	LEI y media laceradas, sin ruptura de LEE	Ruptura de todas las capas, afectación de adventicia
<b>Intensidad de inflamación</b> <i>Kornowski et al</i> <sup>30</sup>	Ausente	Infiltrado linfocitario ligero que rodea el stent	Acumulación $\geq$ moderada de células inflamatorias alrededor del stent de forma no circunferencial	Acumulación significativa de células inflamatorias alrededor del stent de forma circunferencial
<b>Acumulación de fibrina</b> <i>Suzuki et al</i> <sup>31</sup>	–	Acumulación moderada alrededor del stent, $<1/4$ circunferencia arterial	Acumulación moderada alrededor del stent, $>1/4$ circunferencia arterial O acumulación intensa alrededor o fuera del stent, $<1/4$ circunferencia arterial	Acumulación intensa, $>1/4$ circunferencia arterial

LEE: Lámina elástica externa; LEI: Lámina elástica interna.

TABLA 2.- Resultados angiográficos iniciales y a los 28 días

	Control (n=10)	BLP 1 (n=15)	BLP 2 (n=16)	BLP 3 (n=10)	p Control vs. entre BLP	
<b>Diámetro pre-stent (mm)</b>	2.56 $\pm$ 0.33	2.55 $\pm$ 0.31	2.57 $\pm$ 0.32	2.66 $\pm$ 0.43	0.87	0.75
<b>DLM inicial (mm)</b>	3.17 $\pm$ 0.35	3.05 $\pm$ 0.41	3.08 $\pm$ 0.31	3.12 $\pm$ 0.40	0.47	0.88
<b>Presión implante stent (atm)</b>	13.7 $\pm$ 3.0	13.9 $\pm$ 3.3	15.1 $\pm$ 2.3	14.8 $\pm$ 2.4	0.36	0.47
<b>Presión hinchado balón (atm)</b>	12.0 $\pm$ 4.2	12.3 $\pm$ 3.3	13.0 $\pm$ 3.6	14.2 $\pm$ 2.9	0.40	0.40
<b>Relación stent / arteria</b>	1.25 $\pm$ 0.16	1.20 $\pm$ 0.13	1.21 $\pm$ 0.11	1.20 $\pm$ 0.20	0.35	0.98
<b>DLM seguimiento (mm)</b>	1.84 $\pm$ 0.63	2.61 $\pm$ 0.59	2.77 $\pm$ 0.48	2.66 $\pm$ 0.48	$<0.0001$	0.70
<b>DRef seguimiento (mm)</b>	2.75 $\pm$ 0.47	2.88 $\pm$ 0.40	2.99 $\pm$ 0.42	3.05 $\pm$ 0.42	0.17	0.44
<b>Pérdida tardía (mm)</b>	1.33 $\pm$ 0.50	0.44 $\pm$ 0.53	0.31 $\pm$ 0.30	0.46 $\pm$ 0.41	$<0.0001$	0.49
<b>% estenosis angiográfica</b>	33.5 $\pm$ 17.8	9.6 $\pm$ 15.1	7.7 $\pm$ 7.8	11.9 $\pm$ 12.2	$<0.0001$	0.69

BLP: Balón Liberador de Paclitaxel; DLM: Diámetro luminal mínimo intra-stent; DRef: Diámetro Referencia.

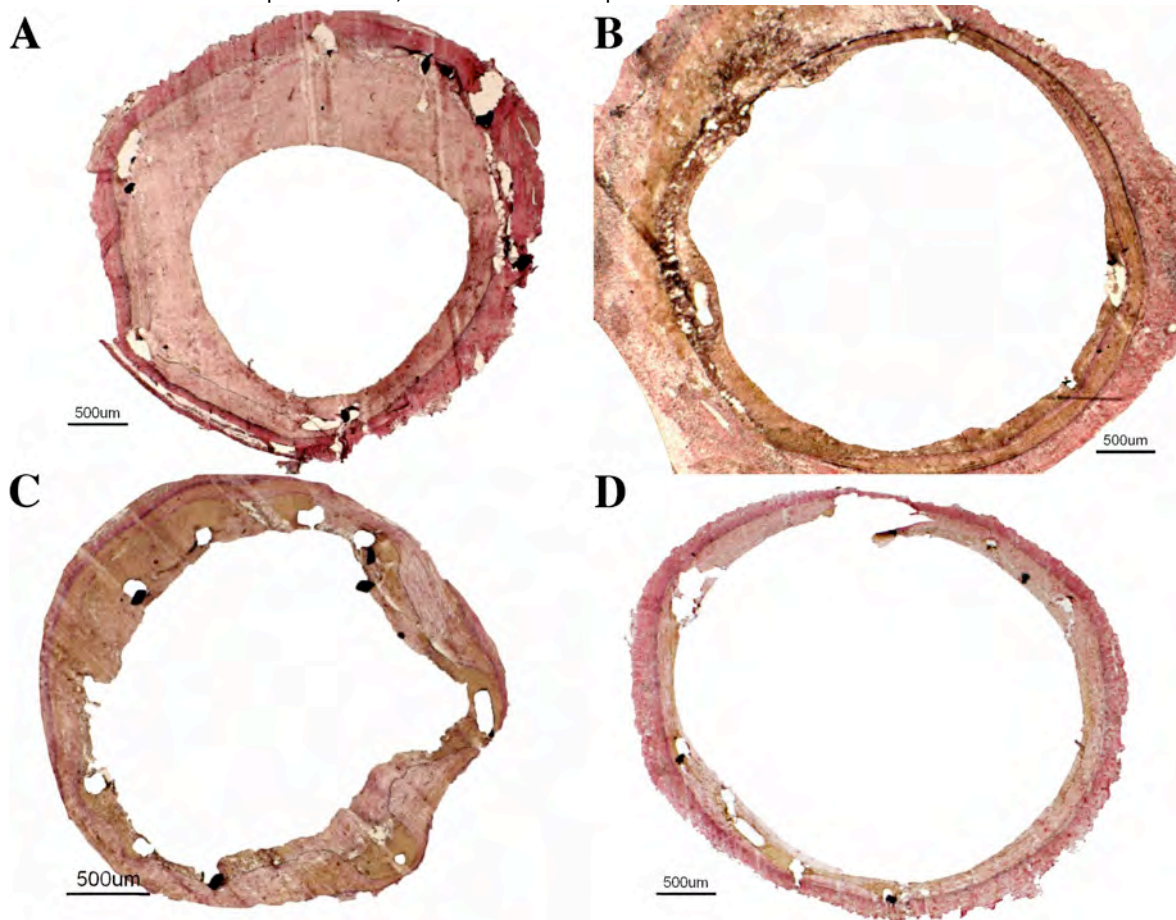


TABLA 3.- Resultados histológicos a los 28 días.

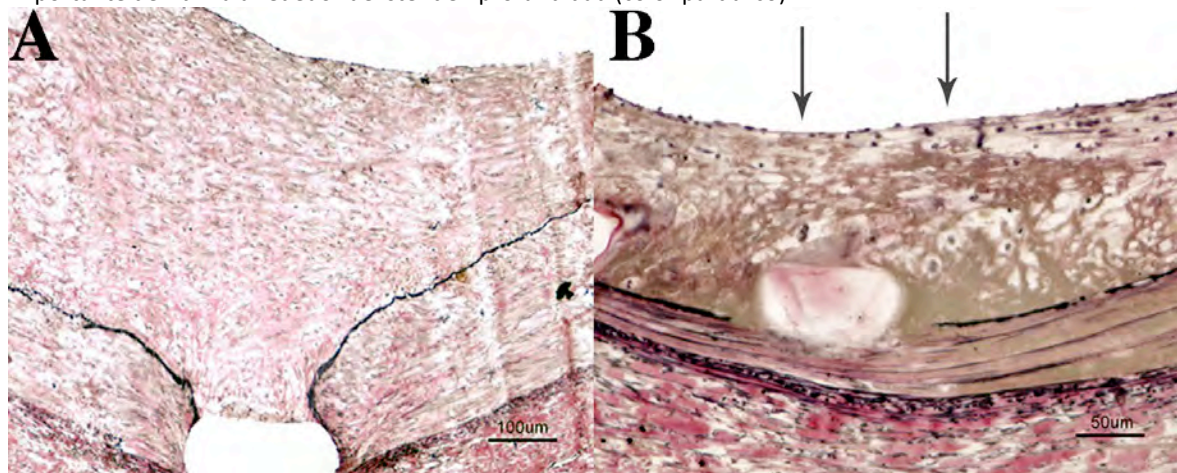
	Control (n=10)	BLP 1 (n=15)	BLP 2 (n=16)	BLP 3 (n=10)	p	
					Control vs. BLP	entre BLP
Área neointimal (mm <sup>2</sup> )	3.4 ± 1.2	1.5 ± 0.7	1.7 ± 0.4	1.9 ± 0.8	<0.0001	0.18
% estenosis histológica	51.0 ± 17.9	20.3 ± 8.4	21.3 ± 5.6	25.6 ± 8.6	<0.0001	0.33
<b>Injury score</b>	0.88 ± 0.56	0.64 ± 0.31	0.51 ± 0.52	0.59 ± 0.56	0.076	0.43
<b>Injury score ≥1</b>	50%	7%	25%	20%	0.042	0.24
<b>Grado de Inflamación</b>	0.89 ± 0.16	0.79 ± 0.34	0.75 ± 0.23	0.91 ± 0.37	0.40	0.22
<b>Grado de inflamación ≥1</b>	30%	33%	25%	40%	0.92	0.21
<b>Grado de Fibrina</b>	0.43 ± 0.47	2.26 ± 0.84	2.19 ± 0.51	1.70 ± 0.78	<0.0001	0.08
<b>Grado de fibrina ≥1</b>	30%	93%	100%	90%	<0.0001	0.42
<b>% endotelización</b>	99 ± 1	86 ± 11	84 ± 11	93 ± 4	0.0007	0.35
<b>Endotelización completa</b>	100%	40%	12.5%	20%	0.0014	0.35

BLP: Balón Liberador de Paclitaxel.

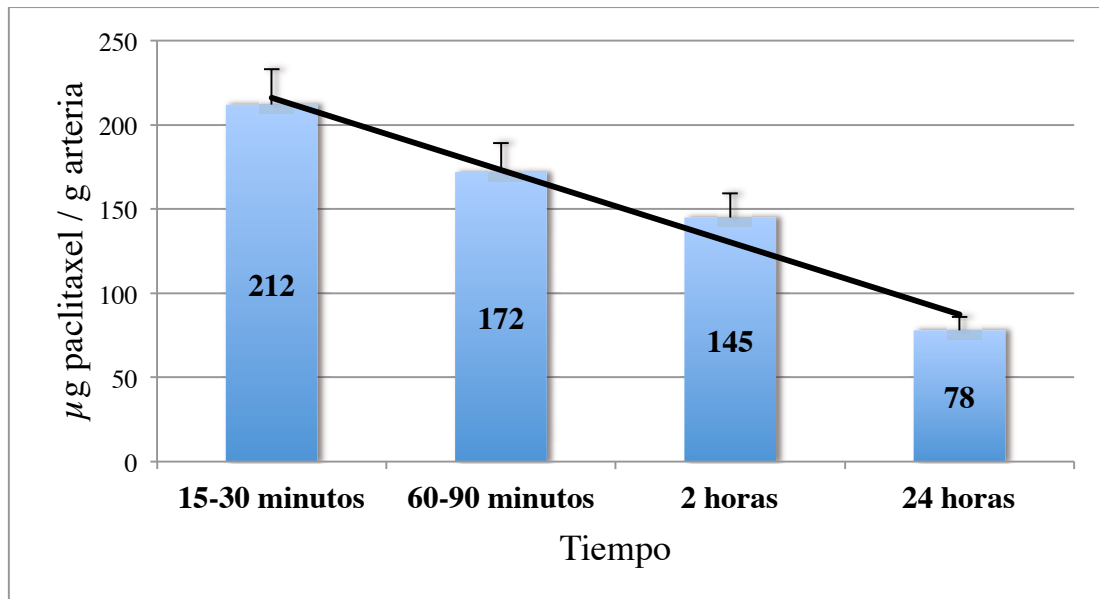
**FIGURA 1.-** Secciones centrales de distintos stents sobredilatados con distintos balones, tinción elastina de Van Gieson: **Balón control (panel A):** Crecimiento neointimal significativo, sin datos de inflamación en profundidad, cobertura endotelial uniforme. **Balones liberadores de paclitaxel, BLP1 (iVascular) – panel B –**, BLP2 (iVascular) – **panel C –** y BLP3 (In.Pact Falcon, Medtronic) – **panel D –**: Escaso crecimiento neointimal, sin datos de inflamación en profundidad, endotelización aceptable.



**FIGURA 2.-** Detalle de la respuesta arterial, tinción elastina de Van Gieson: **balón control (panel A),** muestra un crecimiento neointimal significativo, con endotelización completa de la superficie luminal, sin datos de inflamación y sin restos de fibrina. **Balón liberador de paclitaxel, BLP1 (iVascular) – panel B –**, menor crecimiento neointimal, con aceptable endotelización luminal pero no completa (flechas) y acumulación importante de fibrina alrededor del stent en profundidad (color parduzco).



**FIGURA 3.-** Concentración de paclitaxel en la pared arterial en distintos puntos temporales.  
Cromatografía líquida (HPLC).



## BIBLIOGRAFIA

1. Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F, Macaya C, Rutsch W, Heyndrickx G, et al. A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group. *N Engl J Med.* 1994;331:489-95.
2. Fischman DL, Leon MB, Baim DS, Schatz RA, Savage MP, Penn I, et al. A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators. *N Engl J Med.* 1994;331:496-501.
3. Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, Fajadet J, Ban Hayashi E, Perin M, et al. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med.* 2002;346:1773-80.
4. Grube E, Silber S, Hauptmann KE, Mueller R, Buellesfeld L, Gerckens U, et al. TAXUS I: six- and twelve-month results from a randomized, double-blind trial on a slow-release paclitaxel-eluting stent for de novo coronary lesions. *Circulation.* 2003;107:38-42.
5. Joner M, Finn AV, Farb A, Mont EK, Kolodgie FD, Ladich E, et al. Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:193-202.
6. Finn AV, Joner M, Nakazawa G, Kolodgie F, Newell J, John MC, et al. Pathological correlates of late drug-eluting stent thrombosis: strut coverage as a marker of endothelialization. *Circulation.* 2007;115:2435-41.
7. Luscher TF, Steffel J, Eberli FR, Joner M, Nakazawa G, Tanner FC, et al. Drug-eluting stent and coronary thrombosis: biological mechanisms and clinical implications. *Circulation.* 2007;115:1051-8.
8. Joner M, Nakazawa G, Finn AV, Quee SC, Coleman L, Acampado E, et al. Endothelial cell recovery between comparator polymer-based drug-eluting stents. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52:333-42.
9. Nakazawa G, Otsuka F, Nakano M, Vorpahl M, Yazdani SK, Ladich E, et al. The pathology of neoatherosclerosis in human coronary implants bare-metal and drug-eluting stents. *J Am Coll Cardiol.* 2011;57:1314-22.
10. Park SJ, Kang SJ, Virmani R, Nakano M, Ueda Y. In-stent neoatherosclerosis: a final common pathway of late stent failure. *J Am Coll Cardiol.* 2012;59:2051-7.
11. Schwartz RS, Chronos NA, Virmani R. Preclinical restenosis models and drug-eluting stents: still important, still much to learn. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44:1373-85.
12. Finn AV, Kolodgie FD, Harnek J, Guerrero LJ, Acampado E, Tefera K, et al. Differential response of delayed healing and persistent inflammation at sites of overlapping sirolimus- or paclitaxel-eluting stents. *Circulation.* 2005;112:270-8.
13. Virmani R, Guagliumi G, Farb A, Musumeci G, Grieco N, Motta T, et al. Localized hypersensitivity and late coronary thrombosis secondary to a sirolimus-eluting stent: should we be cautious? *Circulation.* 2004;109:701-5.
14. Scheller B, Speck U, Abramjuk C, Bernhardt U, Bohm M, Nickenig G. Paclitaxel balloon coating, a novel method for prevention and therapy of restenosis. *Circulation.* 2004;110:810-4.
15. Speck U, Scheller B, Abramjuk C, Breitwieser C, Dobberstein J, Boehm M, et al. Neointima inhibition: comparison of effectiveness of non-stent-based local drug delivery and a drug-eluting stent in porcine coronary arteries. *Radiology.* 2006;240:411-8.
16. Scheller B, Hehrlein C, Bocksch W, Rutsch W, Haghi D, Dietz U, et al. Treatment of coronary in-stent restenosis with a paclitaxel-coated balloon catheter. *N Engl J Med.* 2006;355:2113-24.
17. Latib A, Colombo A, Castriota F, Micari A, Cremonesi A, De Felice F, et al. A randomized multicenter study comparing a paclitaxel drug-eluting balloon with a paclitaxel-eluting stent in small coronary vessels: the BELLO (Balloon Elution and Late Loss Optimization) study. *J Am Coll Cardiol.* 2012;60:2473-80.
18. Cortese B, Micheli A, Picchi A, Coppolaro A, Bandinelli L, Severi S, et al. Paclitaxel-coated balloon versus drug-eluting stent during PCI of small coronary vessels, a prospective randomised clinical trial. The PICCOLETO study. *Heart.* 2010;96:1291-6.
19. Gray WA, Granada JF. Drug-coated balloons for the prevention of vascular restenosis. *Circulation.* 2010;121:2672-80.
20. Joner M, Byrne RA, Lapointe JM, Radke PW, Bayer G, Steigerwald K, et al. Comparative assessment of drug-eluting balloons in an advanced porcine model of coronary restenosis. *Thromb Haemost.* 2011;105:864-72.
21. Joner M, Radke PW, Byrne RA, Hartwig S, Steigerwald K, Leclerc G, et al. Preclinical evaluation of a novel drug-eluting balloon in an animal model of in-stent stenosis. *J Biomater Appl.* 2013;27:717-26.

22. Loh JP, Waksman R. Paclitaxel drug-coated balloons: a review of current status and emerging applications in native coronary artery de novo lesions. *JACC Cardiovasc Interv.* 2012;5:1001-12.
23. Schwartz RS, Edelman ER, Carter A, Chronos N, Rogers C, Robinson KA, et al. Drug-eluting stents in preclinical studies: recommended evaluation from a consensus group. *Circulation.* 2002;106:1867-73.
24. Schwartz RS, Edelman E, Virmani R, Carter A, Granada JF, Kaluza GL, et al. Drug-Eluting Stents in Preclinical Studies: Updated Consensus Recommendations for Preclinical Evaluation. *Circ Cardiovasc Interv.* 2008;1:143-153.
25. Perez de Prado A, Perez-Martinez C, Cuellas-Ramon C, Gonzalo-Orden JM, Regueiro-Purrinos M, Martinez-Fernandez B, et al. Scanning electron microscopy analysis of luminal inflammation induced by different types of coronary stent in an animal model. *Rev Esp Cardiol.* 2011;64:159-62.
26. Diego A, Perez de Prado A, Cuellas C, Perez-Martinez C, Gonzalo-Orden M, Altonaga JR, et al. [In-stent restenosis related to vessel injury score degree. Are current experimental models valid for drug-eluting stents analysis?]. *Rev Esp Cardiol.* 2011;64:745-51.
27. Perez de Prado A, Perez-Martinez C, Cuellas C, Gonzalo-Orden JM, Diego A, Regueiro M, et al. Preclinical Evaluation of Coronary Stents: Focus on Safety Issues. *Curr Vasc Pharmacol.* 2013;11:74-99.
28. Schwartz RS, Huber KC, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vlietstra RE, et al. Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model. *J Am Coll Cardiol.* 1992;19:267-74.
29. Kornowski R, Hong MK, Tio FO, Bramwell O, Wu H, Leon MB. In-stent restenosis: contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia. *J Am Coll Cardiol.* 1998;31:224-30.
30. Suzuki T, Kopia G, Hayashi S, Bailey LR, Llanos G, Wilensky R, et al. Stent-based delivery of sirolimus reduces neointimal formation in a porcine coronary model. *Circulation.* 2001;104:1188-93.
31. Speck U, Cremers B, Kelsch B, Biedermann M, Clever YP, Schaffner S, et al. Do pharmacokinetics explain persistent restenosis inhibition by a single dose of paclitaxel? *Circ Cardiovasc Interv.* 2012;5:392-400.

Rev Esp Cardiol <rec@revespcardiol.org>  
Para: aperez@secardiologia.es, armando.perez@me.com  
Decisión artículo / Article decision

---

20 de septiembre de 2013 12:06

Ms. Ref. No.: REC-D-13-00507R1

TITULO: Análisis de la eficacia y seguridad de distintos balones liberadores de paclitaxel en modelo animal - Safety and Efficacy of Different Paclitaxel-Eluting Balloons in a Preclinical Swine Model

Estimado Dr. Pérez de Prado:

Tengo el placer de comunicarle que su artículo de ref. REC-D-13-00507R1 ha sido aceptado para publicación en nuestra Revista.

En un futuro nuestra editorial le enviará pruebas de autor que usted deberá corregir y le informará sobre la fecha estimada de publicación. Tras este paso, tenga en cuenta que su artículo no se corregirá exhaustivamente, aunque sí pasará un proceso de corrección estilística.

Le comunicamos que la edición impresa de Rev Esp Cardiol (disponible únicamente en español) se publica en blanco y negro, aunque nuestra edición digital (en español e inglés, [www.revespcardiol.org](http://www.revespcardiol.org)) está disponible a todo color. Si prefiere que las figuras en su artículo impreso se publiquen en color habrá de abonar 600EUR en concepto de gastos de producción antes de la recepción de pruebas de autor. Para ello, por favor envíe un correo electrónico a [recsec@elsevier.com](mailto:recsec@elsevier.com) indicando su nombre y apellidos, domicilio fiscal, DNI y el número de referencia de su artículo que figura en la cabecera de este correo. Nuestra editorial se pondrá en contacto con usted lo antes posible con las instrucciones a seguir.

Muchas gracias por enviar su trabajo a Revista Española de Cardiología.

Reciba un cordial saludo,

Magda Heras  
Editora Jefe

## ***ANEXO 2***

**Otras publicaciones de la línea de investigación**





## ANEXO 2: Otras publicaciones de la línea de investigación

1. *Vascular healing response to simvastatin-eluting-stent (IRIST®) in a swine coronary model.* **A. Pérez De Prado**, C. Perez, C. Cuellas, M. Regueiro, A. Diego, A. De Miguel, J.M. Gonzalo, J.R. Altonaga, M.J. Iglesias, J. Ajenjo, B. Martínez, M. Molina, L. Duocastella, A. Fernandez, M. Merlos, F. Fernandez-Vazquez. **EuroIntervention** 2009; 5 (Suppl E): E 103
2. *Better Vascular Healing Without Reduction in Anti-Restenotic Effect of a Low-dose Paclitaxel plus Simvastatin Eluting Stent: Preclinical Results.* **A. Pérez De Prado**, C. Perez-Martinez, C. Cuellas, M. Regueiro, A. Diego, A. De Miguel, B. Martínez, J. Ajenjo, J.M. Gonzalo, M.J. Iglesias, J.R. Altonaga, M. Molina, L. Duocastella, F. Fernandez-Vazquez. **J Am Coll Cardiol** 2010; 56 (Suppl B): B30.
3. Vasorreactividad coronaria tras implante de *stents* farmacoactivos y actividad de la sintasa endotelial de óxido nítrico (eNOS): ¿qué estamos analizando? **A. Pérez de Prado**, C. Pérez-Martínez, C. Cuellas Ramón, J.M. Gonzalo-Orden, A. Diego Nieto, M. Regueiro Purriños, B. Martínez-Fernández y Felipe Fernández-Vázquez. **Rev Esp Cardiol** 2011; 64 (Supl.3) :61
4. *Is coronary vasomotor dysfunction the result of a reduced endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity after drug eluting stent implantation?* **A. Peéez De Prado**, C. Perez-Martinez, C. Cuellas, J.M. Gonzalo-Orden, A. Diego, M. Regueiro, B. Martinez, J.M. Ajenjo, M.J. Garcia-Iglesias, F. Fernandez-Vazquez. **Eur Heart J** 2012; 33 (Suppl 1): 397.
5. *Biodegradable-Polymer Biolimus Eluting Stents Show Better Antiproliferative Efficacy And Vascular Healing Pattern Than Permanent-Polymer Paclitaxel Eluting Stents in a Preclinical Coronary Model.* **A. Pérez de Prado**, C. Pérez-Martínez, C. Diego, J.M. Gonzalo-Orden, C. Cuellas, M. Regueiro, B. Martínez-Fernández, J.M. Ajenjo, M.J. Garcia-Iglesias, F. Fernández-Vázquez. **J Am Coll Cardiol** 2012; 60 (Suppl B): B164.
6. *Preclinical Model of Restenosis Using Stent Overexpansion in Normal Coronary Arteries: May We Predict the Immediate Vascular Injury?.* **A. Pérez de Prado**, C. Perez Martinez, C. Cuellas Ramon, M. Regueiro, B. Martinez Fernandez, A. Diego Nieto, M.J. Garcia Iglesias, J.M. Ajenjo, M. Lopez Benito, J.M. Gonzalo Orden, F. Fernandez Vazquez. **Cath Cardiovasc Interv** 2013; 81 (Suppl S1): S135-6.

7. *Stent Recoil or Arterial Restriction to Full Expansion? Differences between Predicted and Real Maximal Diameters of Cobalt-Chromium Stents.* **A. Pérez de Prado**, M. Regueiro, C. Cuellas Ramon, C. Perez Martinez, A. Diego Nieto, J.M. Ajenjo, M. Lopez Benito, B. Martinez Fernandez, J.M. Gonzalo Orden, F. Fernandez Vazquez. **Cath Cardiovasc Interv** **2013**; 81 (Suppl S1): S137.

## Vascular healing response to simvastatin-eluting-stent (IRIST®) in a swine coronary model

Armando Perez De Prado<sup>1</sup>, MD; Claudia Perez<sup>2</sup>, PhD; Carlos Cuellas<sup>1</sup>, MD; Marta Regueiro<sup>2</sup>, PhD; Alejandro Diego<sup>1</sup>, MD; Antonio De Miguel<sup>1</sup>, MD; J-Manuel Gonzalo<sup>2</sup>, PhD; Jose R. Altonaga<sup>2</sup>, PhD; Maria J. Iglesias<sup>2</sup>, PhD; Jose Ajenjo<sup>2</sup>, DVM; Beatriz Martinez<sup>2</sup>, DVM; Maria Molina<sup>3</sup>, BSc; Luis Duocastella<sup>3</sup>, PhD; Alberto Fernandez<sup>4</sup>, PhD; Manel Merlos<sup>4</sup>, PhD; Felipe Fernandez-Vazquez<sup>1</sup>, MD

1. Interventional Cardiology, Hospital de Leon, Leon, Spain; 2. Facultad de Veterinaria, Universidad de Leon, Leon, Spain; 3. Iberhospitex SA, Cordynamic, Barcelona, Spain; 4. Palau Pharma SA, Uriach, Barcelona, Spain

**Aims:** To compare the rate of endothelialisation and inflammatory response at 7 days of Simvastatin-eluting stent (IRIST®) with different comparators.

**Methods and results:** In 8 domestic swine (25±3 kg) one stent per coronary artery were implanted: stainless-steel stent (APOLO®), APOLO stent coated with polymer (P5®, triflusal copolymer), Paclitaxel eluting stent (TAXUS®) and IRIST stent. Stented segments were longitudinally bisected and analysed with scanning electron microscopy (SEM). The rate of strut endothelialisation was measured over the whole surface of the stent. The density of leukocytes per sample area (100x100 µm) was quantified.

IRIST, APOLO and P5 coated stents showed a similar rate of endothelialisation (98±3%, 97±3% and 97±5% of the strut surface covered by endothelial cells, respectively; p=NS). Conversely, TAXUS stents showed a significant lower rate of endothelialisation (72±25%, p=0.002). The elicited inflammation was lower in APOLO (1±1%) and P5 coated stents (4±3%) than in IRIST stents (7±3%, p=0.015); TAXUS stents showed a higher grade (11±8%, p=0.051 compared with IRIST).

**Conclusions:** The simvastatin-eluting stent IRIST shows an endothelialisation rate equivalent to the bare metal stent and significantly better than the TAXUS stent. A trend favouring IRIST stent over TAXUS stent was also observed in elicited inflammation.

## TCT-129

**Better Vascular Healing Without Reduction in Anti-Restenotic Effect of a Low-dose Paclitaxel plus Simvastatin Eluting Stent: Preclinical Results**

Armando Perez de Prado<sup>1</sup>, Claudia Perez-Martinez<sup>1</sup>, Carlos Cuellas<sup>1</sup>, Marta Regueiro<sup>1</sup>, Alejandro Diego<sup>1</sup>, Antonio de Miguel<sup>1</sup>, Beatriz Martinez<sup>1</sup>, Jose M Ajenjo<sup>1</sup>, Jose M Gonzalo-Orden<sup>1</sup>, Jose R Altonaga<sup>1</sup>, Maria J Iglesias<sup>1</sup>, Maria Molina<sup>2</sup>, Luis Duocastella<sup>2</sup>, Felipe Fernandez-Vazquez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fundacion Investigacion Sanitaria en Leon. HemoLeon, Leon, Spain; <sup>2</sup>IHT, IberHospitex - Cordynamic, Barcelona, Spain

**Background:** Paclitaxel-eluting-stents (PES) are consistently associated with a delayed healing of the vessel. Simvastatin-eluting-stents (IRIST®), based on a stainless-steel stent with P5® polymer, have demonstrated an endothelialization process equivalent to bare metal stents. Our objective is to analyze the response to a decrease in the amount of paclitaxel and addition of simvastatin into a combined drug-eluting-stent.

**Methods:** In 15 domestic swine (25 ± 3 kg), one stent per coronary artery was implanted with an intended stent-to-artery ratio of 1.1 to 1.2. Paclitaxel eluting stents (ACTIVE®, 0.36 µg/mm<sup>2</sup> paclitaxel) were used as controls. We tested two different formulations of simvastatin + paclitaxel-eluting-stents, both with 0.36 µg/mm<sup>2</sup> simvastatin + 0.13 µg/mm<sup>2</sup> paclitaxel (IRIST-Duo I) and 0.09 µg/mm<sup>2</sup> paclitaxel (IRIST-Duo II). Nine stents were assessed at 7 days to measure the quantitative rate of strut endothelialization and luminal inflammation by Scanning Electron Microscopy (SEM). The remaining 36 stents were analyzed at 28 days. Morphometric analysis was performed to calculate neointimal area (NIA), percentage of restenosis and semi-quantitative degree of endothelialization as recommended per consensus documents. Angiographic restenosis (%) and late loss (LL) were measured using off-line QCA (Medis®).

**Results:** Both at 7 and 28 days, significant better healing parameters were observed with IRIST-Duo II without significant differences in restenosis, neither by histomorphometry nor angiographically. The table summarizes the results:

	PES	IRIST-Duo I	IRIST-Duo II
7-days			
• Endothelialization, %	1 ± 2 *	17 ± 11 †	56 ± 12
• Inflammation, %	23 ± 8 *	13 ± 6	12 ± 2
28-days			
• Full endothelialization, %	50 *	42 †	83
• NIA, mm <sup>2</sup>	1.4 ± 0.3	2.5 ± 1.8	2.6 ± 1.8
• Restenosis (histo), %	19 ± 6	24 ± 14	27 ± 17
• Restenosis (angio), %	10 ± 8	13 ± 6	15 ± 6
• Late loss, mm	0.3 ± 0.3	0.4 ± 0.3	0.5 ± 0.3

*p* < 0.05 IRIST-Duo II: \* vs PES; † vs IRIST-Duo I

**Conclusions:** In conclusion, lower doses of paclitaxel combined with simvastatin in a drug-eluting-stent improve the healing response without a significant compromise in anti-restenotic efficacy in preclinical testing.

tividad ( $r < 0,01$ ,  $p = 0,6$ ) o entre ellas y la presencia o función del endotelio (todas  $r < 0,1$ ,  $p = NS$ ).

**Conclusiones:** Los stents liberadores de paclitaxel empleados en este modelo porcino de coronarias normales muestran endotelización incompleta (morfológica y funcional) al mes del implante y vasorreactividad anormal (epicárdica y microcirculatoria). Sin embargo, no se aprecia asociación entre las variables histológicas y de función vasomotora. Ello sugiere que la alteración vasomotora podría deberse a otras causas distintas de la actividad de eNOS.

### 322. VASORREACTIVIDAD CORONARIA TRAS IMPLANTE DE STENTS FARMACOACTIVOS Y ACTIVIDAD DE LA SINTASA ENDOTELIAL DE ÓXIDO NÍTRICO (eNOS): ¿QUÉ ESTAMOS ANALIZANDO?

Armando Pérez de Prado, Claudia Pérez-Martínez, Carlos Cuellas Ramón, J. Manuel Gonzalo-Orden, Alejandro Diego Nieto, Marta Regueiro Purriños, Beatriz Martínez-Fernández y Felipe Fernández-Vázquez de la Fundación Investigación Sanitaria en León, HemoLeón.

**Antecedentes y Objetivos:** Los stents farmacoactivos (SFA) de 1ª generación muestran vasoconstricción paradójica a estímulos dependientes del endotelio. La causa se atribuye a la lenta y disfuncional re-endotelización, con actividad reducida de sintasa de óxido nítrico (eNOS). Nuestro objetivo es analizar la relación entre aspectos morfológicos y funcionales del endotelio tras implante de SFA y la vasorreactividad coronaria.

**Métodos:** En 9 cerdos domésticos sanos ( $25 \pm 3$  kg) se implanta 1 stent por arteria coronaria (ratio stent:arteria 1.1-1.2). Se usan stents convencionales (SC, Apolo®), SFA liberadores de paclitaxel (SLp, Active®) y de paclitaxel + simvastatina (SLps, Irist-Duo®). En la coronariografía al mes de seguimiento se analiza la vasorreactividad de la arteria epicárdica (diámetro del vaso distal al stent) y microcirculatoria (TIMI frame count). Se presentan las diferencias en ambas variables tras vasodilatación máxima independiente (nitroglicerina, 200 µg) y dependiente (acetilcolina, 20 µg) del endotelio. En 3 niveles distintos de cada stent se analizan características morfométricas (tinción hematoxilina-eosina, extensión del endotelio con apariencia de empedrado confluyente) y funcionales (expresión de eNOS, % células endoteliales con marcado +).

**Resultados:** Tanto la vasorreactividad epicárdica como la microcirculatoria es mejor en los SC que en los SFA: diámetro epicárdico, SC  $+5 \pm 15\%$ , SLp  $-10 \pm 12\%$ , SLps  $-1 \pm 15\%$  ( $p < 0,02$ ); TIMI frame count, SC  $+6 \pm 6$ , SLp  $+22 \pm 22$ , SLps  $+10 \pm 9$  ( $p < 0,0001$  SC vs SLp y SLp vs SLps). La presencia y función del endotelio también es mayor en los SC que en los SFA: endotelización completa, SC 97%, SLp 57%, SLps 74% ( $p < 0,001$ ); actividad eNOS, SC  $88 \pm 4\%$ , SLp  $77 \pm 15\%$ , SLps  $74 \pm 20\%$  ( $p < 0,0002$ ). Sin embargo, no se halla correlación entre las 2 variables de vasorreacti-

**P2428** **Is coronary vasomotor dysfunction the result of a reduced endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity after drug eluting stent implantation?**



A. Perez De Prado, C. Perez-Martinez, C. Cuellas, J.M. Gonzalo-Orden, A. Diego, M. Regueiro, B. Martinez, J.M. Ajenjo, M.J. Garcia-Iglesias, F. Fernandez-Vazquez. *HemoLeon, Fundacion Investigacion Sanitaria en Leon, Leon, Spain*

**Purpose:** Drug eluting stents (DES), especially first-generation DES, have been associated with abnormal coronary vasomotor function as compared with bare metal stents (BMS), being the suggested cause the reduced expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) observed in immature endothelium. The objective of this study is to analyse the relationship between the morphological and functional characteristics of the endothelium after BMS and DES implantation and the vasomotor response to endothelium-dependent drugs.

**Methods:** In 18 domestic juvenile swine ( $25 \pm 3$  kg), one stent per coronary artery was implanted with an intended stent-to-artery ratio of 1.1 to 1.2. We used 18 stainless-steel BMS, 18 paclitaxel eluting stents (PES), 9 simvastatin+ paclitaxel eluting stents (SpES) and 9 biolimus eluting stents (BES). Quantitative coronary angiography was performed after 28 days to assess the vasomotor response measuring the vessel diameter distal to the stent after intracoronary infusion of Acetylcholine 10-6M as compared with basal status. Morphometric analyses of the endothelialisation (haematoxylin-eosin stain, circumferential extent of luminal surface coverage with flattened, confluent endothelial cells) and eNOS expression (percentage of endothelial cells positively immuno-stained) were calculated at 3 levels of each stent sample. The eNOS+ endothelialisation index measures the proportion of the whole luminal surface covered by eNOS+ endothelial cells.

**Results:** The vasomotor responses were significantly different among stents: change in diameter, BMS +3% (SD 9), PES -7% (SD 11), SpES +1% (SD 12), BES +6% (SD 10), ( $p < 0.04$ ). The eNOS+ endothelialisation indexes were also significantly different among groups: BMS 88% (SD 8), PES 78% (SD 11), SpES 76% (SD 7), BES 94% (SD 3), ( $p < 0.0001$ ).

However, no significant relationships were found between the vasomotor response and the presence of endothelium ( $p = 0.07$ ) or its function ( $p = 0.14$ ). A significant, but weak, correlation was found between the vasomotor response and the eNOS+ endothelialisation index ( $r^2 0.23$ ,  $p = 0.003$ ).

**Conclusions:** The paclitaxel eluting stents used in this normal coronary arteries swine model show impaired healing 28 days after the implantation. This fact can be revealed either as an abnormal coronary vasomotor function as well as loss of functional endothelialisation. Nonetheless, the association between histological and vasomotor findings is very weak, raising the chance of different causal mechanisms other than eNOS reduced activity.

## TCT-564

**Biodegradable-Polymer Biolimus Eluting Stents Show Better Antiproliferative Efficacy And Vascular Healing Pattern Than Permanent-Polymer Paclitaxel Eluting Stents in a Preclinical Coronary Model**

Armando Pérez de Prado<sup>1</sup>, Claudia Pérez-Martínez<sup>1</sup>, Alejandro Diego<sup>1</sup>, José Manuel Gonzalo-Orden<sup>1</sup>, Carlos Cuellas<sup>1</sup>, Marta Regueiro<sup>1</sup>, Beatriz Martínez-Fernández<sup>1</sup>, Jose M Ajenjo<sup>1</sup>, Maria J Garcia-Iglesias<sup>1</sup>, Felipe Fernández-Vázquez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>HemoLeon, Fundación Investigación Sanitaria en León, León, León

**Background:** Second-generation drug eluting stents (DES) have shown a high efficacy in terms of restenosis prevention, like first-generation DES, with reduced rates of stent thrombosis, especially late stent thrombosis. The suggested mechanism for this superiority is a better morphological and functional healing response. The objective of this study is to compare the efficacy and safety results of 2 different, first and second-generation, DES in a swine model of normal coronary arteries.

**Methods:** In 9 domestic juvenile swine ( $25 \pm 3$  kg), one stent per coronary artery was implanted with an intended stent-to-artery ratio  $\geq 1.1$ . We used 9 bare metal stents (BMS), 9 permanent-polymer paclitaxel eluting stents (PES) and 9 biodegradable-polymer biolimus eluting stents (BES). Quantitative coronary angiography was performed after 28 days to assess the in-stent % stenosis and the endothelium-dependent vasomotor response of the distal vessel (Acetylcholine 10-6M). We performed morphometric analyses of the in-stent % area stenosis and the endothelialization rate (haematoxylin-eosin stain, extent of luminal surface coverage with endothelial cells) at 3 levels of each stent sample. The eNOS+ endothelialization index measures the proportion of the whole luminal surface covered by eNOS+ endothelial cells.

**Results:** All the stents were implanted as per-protocol, with a final stent:artery ratio  $1.17 \pm 0.15$ . No baseline differences were observed between groups. The Table shows the restenosis and the functional healing parameters analyzed in each group.

	BES	PES	BMS
Angiographic diameter stenosis (%)	3 ± 6*	15 ± 26*	34 ± 17
Histologic area stenosis (%)	23 ± 10†	36 ± 21	37 ± 15
Vasomotor response (% Δ diameter)	+6 ± 10‡	- 7 ± 6	+ 5 ± 9‡
eNOS+ endothelialization index (%)	94 ± 3 ‡	85 ± 7	96 ± 3‡
* $p < 0.01$ BES & PES vs BMS; † $p < 0.05$ BES vs PES & BMS; ‡ $p < 0.05$ BES & BMS vs PES			

**Conclusions:** In this preclinical test, biodegradable-polymer biolimus eluting stents show a higher antiproliferative effect than both bare metal and permanent-polymer paclitaxel eluting stents. The functional vascular healing pattern of biolimus eluting stents is similar to that observed in bare metal stents and better than that observed after paclitaxel eluting stents.

**D-002**

**Title:** Preclinical Model of Restenosis Using Stent Overexpansion in Normal Coronary Arteries: May We Predict the Immediate Vascular Injury?

**Category:** Stents (including DES)

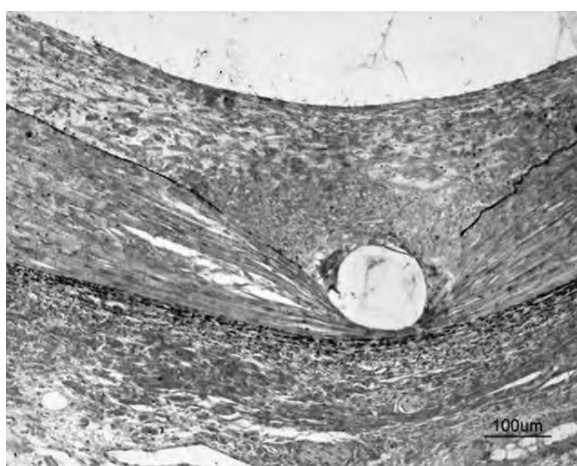
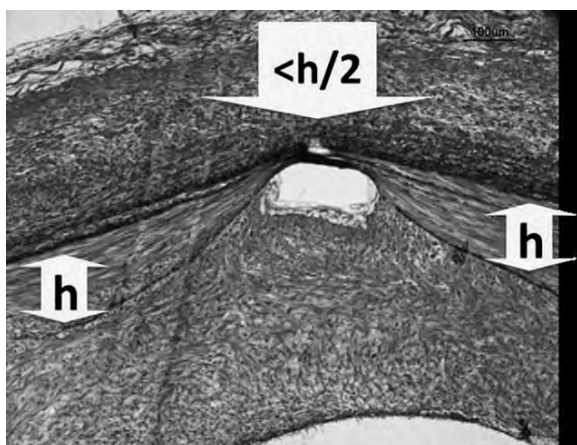
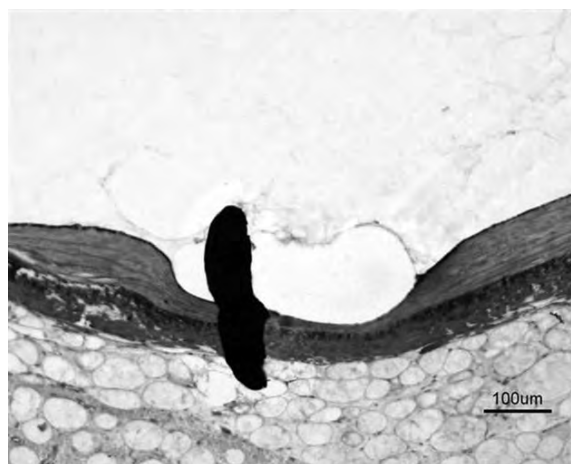
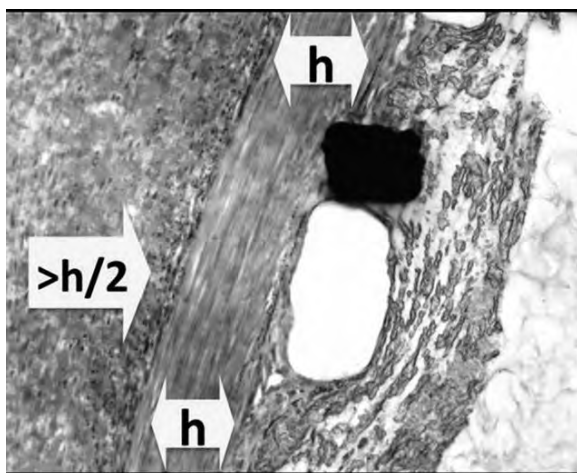
**Authors:** Armando Perez de Prado, Fundacion Investigacion Sanitaria en Leon, Spain; Claudia Perez Martinez, Fundacion Investigacion Sanitaria en Leon, Spain; Carlos Cuellas Ramon, Fundacion Investigacion Sanitaria en Leon, Spain; Marta Regueiro, Fundacion Investigacion Sanitaria en Leon, Spain; Beatriz Martinez Fernandez, Fundacion Investigacion Sanitaria en Leon, Spain; Alejandro Diego Nieto, Fundacion Investigacion Sanitaria en Leon, Spain; Maria J Garcia Iglesias, Fundacion Investigacion Sanitaria en Leon, Spain; Jose M Ajenjo, Fundacion Investigacion Sanitaria en Leon, Spain; Jose M Ajenjo, Fundacion Investigacion Sanitaria en Leon, Spain; Maria Lopez Benito, Fundacion Investigacion Sanitaria en Leon, Spain; Jose M Gonzalo Orden, Fundacion Investigacion Sanitaria en Leon, Spain; Felipe Fernandez Vazquez, Fundacion Investigacion Sanitaria en Leon, Spain

**Background:** The most established preclinical model of restenosis is based on the overstretch of a normal artery with an oversized balloon or stent. The integrity of the internal elastic lamina (IEL) and the amount

Catheterization and Cardiovascular Interventions DOI 10.1002/ccd.  
Published on behalf of The Society for Cardiovascular Angiography and Interventions (SCAI).



## S136 Abstracts



of compression of the medial layer are critical predictors of the induced restenosis. Our objective is to analyze the immediate vascular injury caused by the implantation of greatly oversized stents in a swine model of normal coronary arteries.

**Methods:** Twenty-five Cobalt-Chromium stents (4 different brands) were implanted in the major coronary arteries of young domestic swine ( $25 \pm 3$  Kg). The stent sizes were selected to obtain stent:artery ratios  $\geq 1.2$ . Quantitative coronary angiography was performed after maximal vasodilation, both before and after stent implantation. Immediately after the procedure, the stented segments were explanted, embedded in resin, cut and stained (elastin van Giesson) for histomorphometric analysis. In every stent strut, a modified injury score was calculated: Score 0, IEL intact with media compression  $< 50\%$  as compared with nearby media (Score 0A) or  $\geq 50\%$  (Score 0B); Score 1, IEL lacerated with media compressed but not lacerated.

**Results:** All the stents were successfully implanted, without complications despite achieving a stent:artery ratio  $1.29 \pm 0.19$  (basal artery diameter  $2.69 \pm 0.55$ , post-stent  $3.43 \pm 0.67$  mm). Among 117 struts analyzed, none of them showed IEL laceration (0% Injury Score 1) and only 23 showed  $\geq 50\%$  media compression (19.7% Injury Score 0B).

The predictors of higher vascular injury (stents showing at least 1 strut with score 0B) were the extreme stent sizes (100% of stents with nominal size = 2.5 or 4.5mm vs. 24% of the rest,  $p = 0.005$ ) and the cross-sectional shape of the struts (83% of stents with circular section vs. 25% of those with square section,  $p = 0.023$ ). The stent:artery ratio showed no correlation with the injury score ( $r < 0.01$ ).

**Conclusion:** The immediate vascular injury observed in this swine model of oversized stents is significantly lower than that described in longer follow-up studies. No relationship between the degree of oversize and injury score was found. Stents with circular cross-sectional struts may induce higher immediate vascular injury.

**Disclosures:**

Armando Perez de Prado:

Claudia Perez Martinez: This author has nothing to disclose.

Carlos Cuellas Ramon: This author has nothing to disclose.

Marta Regueiro: This author has nothing to disclose.

Beatriz Martinez Fernandez: This author has nothing to disclose.

Alejandro Diego Nieto: This author has nothing to disclose.

Maria J Garcia Iglesias: This author has nothing to disclose.

Jose M Ajenjo: This author has nothing to disclose.

Jose M Ajenjo: This author has nothing to disclose.

Maria Lopez Benito: This author has nothing to disclose.

Jose M Gonzalo Orden: This author has nothing to disclose.  
Felipe Fernandez Vazquez: This author has nothing to disclose.

### D-003

#### Title: Stent Recoil or Arterial Restriction to Full Expansion? Differences between Predicted and Real Maximal Diameters of Cobalt-Chromium Stents

Category: Stents (including DES)

Authors: Armando Perez de Prado, Fundacion Investigacion Sanitaria en Leon, Spain; Marta Regueiro, Fundacion Investigacion Sanitaria en Leon, Spain; Carlos Cuellas Ramon, Fundacion Investigacion Sanitaria en Leon, Spain; Claudia Perez Martinez, Fundacion Investigacion Sanitaria en Leon, Spain; Alejandro Diego Nieto, Fundacion Investigacion Sanitaria en Leon, Spain; Jose M Ajenjo, Fundacion Investigacion Sanitaria en Leon, Spain; Maria Lopez Benito, Fundacion Investigacion Sanitaria en Leon, Spain; Beatriz Martinez Fernandez, Fundacion Investigacion Sanitaria en Leon, Spain; Jose M Gonzalo Orden, Fundacion Investigacion Sanitaria en Leon, Spain; Felipe Fernandez Vazquez, Fundacion Investigacion Sanitaria en Leon, Spain

**Background:** Often, coronary stents do not achieve the maximal size that manufacturers' compliance charts predict, that only reflect in vitro measurements without considering the role of vascular restriction opposed to the full expansion. The universal use of Cobalt-Chromium stents (CCS) bolsters this point, as some grade of alloy-intrinsic recoil is reported. Our objective is to analyze the degree of recoil of different CCS implanted at rated burst pressure (RBP) in a swine model of normal coronary arteries.

**Methods:** We implanted 25 CCS (4 different brands) in separate segments of the 3 major epicardial arteries in young domestic swine ( $25 \pm 3$  Kg). The stent sizes were selected to achieve a stent:artery ratio  $\geq 1.2$  after inflation at RBP. Off-line vessel diameters were measured after maximal vasodilation in basal, RBP balloon inflation and final angiographic series (1024x1024 px). After the procedure, the arterial segments were explanted and the final measurements were analyzed by histomorphometry.

**Results:** All the stents were successfully implanted, without complications despite achieving a stent:artery ratio  $1.29 \pm 0.19$ . Different stent sizes, from 2.5 to 4.5 mm, were implanted, being 3.5 (n = 6) and 4 mm (n = 7) the most used. Final angiographic measurement and histomorphometric values showed a good correlation ( $r = 0.82$ ,  $p < 0.001$ ). Final diameter was slightly smaller than RBP balloon diameter ( $3.43 \pm 0.67$  vs.  $3.5 \pm 0.61$  mm; stent recoil  $4.1 \pm 3.2\%$ ) but notably smaller than predicted value ( $3.43 \pm 0.67$  vs.  $3.88 \pm 0.62$  mm; arterial restriction  $11.8 \pm 7\%$ ).

Neither the vessel or stent size nor the stent brand showed any influence on the final results. However, those stents implanted at distal segments showed a higher difference between predicted and final diameter (arterial restriction  $15.5 \pm 8$  vs.  $9.4 \pm 5\%$ ,  $p = 0.03$ ).

**Conclusion:** The Cobalt-Chromium stents analyzed in this preclinical model showed values of stent recoil equivalent to those described in vitro ( $\approx 5\%$ ). Nevertheless, the difference between predicted (manufacturers' compliance chart) and final diameter is higher, more than twice that value. Even normal, elastic, arteries oppose an immediate restriction to the full expansion of the stent with a mean value of 0.45 mm.

#### Disclosures:

Armando Perez de Prado: This author has nothing to disclose.  
Marta Regueiro: This author has nothing to disclose.  
Carlos Cuellas Ramon: This author has nothing to disclose.  
Claudia Perez Martinez: This author has nothing to disclose.  
Alejandro Diego Nieto: This author has nothing to disclose.  
Jose M Ajenjo: This author has nothing to disclose.  
Maria Lopez Benito: This author has nothing to disclose.  
Beatriz Martinez Fernandez: This author has nothing to disclose.  
Jose M Gonzalo Orden: This author has nothing to disclose.  
Felipe Fernandez Vazquez: This author has nothing to disclose.

