

Reestenosis y expansión asimétrica de *stents* en la aorta de conejos hipercolesterolémicos

ALEJANDRO D. FERNÁNDEZ[†], DANIEL BERROCAL*, GERMÁN GONZÁLEZ, SUSANA PÉREZ, CELINA MORALES*, EDUARDO BERTOLETTI, RICARDO J. GELPI*, LILIANA GRINFELD*

RESUMEN

Introducción

La expansión asimétrica (EA) de los *stents* consiste en una distribución heterogénea del metal en la circunferencia de la pared arterial y está producida por distorsiones de la arquitectura normal del *stent* expandido. Esto estaría vinculado a una mayor agresión sobre la pared del vaso en los lugares con mayor concentración de metal y su consiguiente aumento de la proliferación endotelial. Algunos estudios experimentales previos avalarían estas afirmaciones.

Objetivos

El objetivo del presente estudio fue explorar el efecto de la EA sobre la hiperplasia neointimal en aorta de conejos hipercolesterolémicos, además de evaluar en qué grado la sobreexpansión por alta presión de un *stent* influye sobre la configuración de éste.

Material y métodos

Se implantaron 20 *stents* tubulares de acero inoxidable 316L en la aorta abdominal de conejos New Zealand hipercolesterolémicos. Se realizó ultrasonido intravascular (IVUS) durante el implante y a las 8 semanas previo al sacrificio. El análisis del IVUS se utilizó para medir el grado de retracción elástica de los *stents* y para clasificar los *stents* en simétricos o asimétricos. Para esto último se integraron en un dibujo planar todos los cortes obtenidos durante el retiro mecánico del IVUS a 1 mm/seg (estereomorfometría). Se realizó el análisis histológico de engrosamiento neointimal mediante la comparación de los *stents* asimétricos (A) respecto de los simétricos (S) y los cuadrantes con mayor concentración de metal (M+) respecto de aquellos donde existía mayor cantidad de pared libre de metal (M-).

Resultados

Completaron el seguimiento 17 animales y se registró una mortalidad precoz del 15%. Se observó mayor hiperplasia neointimal en los *stents* definidos asimétricos (264,65 versus 185,00 micrones) ($p = 0,025$) y en las zonas con mayor concentración de metal (279,90 versus 205,34 micrones) ($p = 0,022$). No se observaron diferencias significativas en cuanto a la simetría o al monto de hiperplasia neointimal al comparar ambas técnicas de implante. La retracción mecánica fue significativamente mayor en los *stents* 3,0 sobreexpandidos ($0,28 \pm 0,18$ versus $0,10 \pm 0,11$ mm) ($p < 0,001$).

Conclusión

De acuerdo con evidencias previas y con lo que sugerirían los mecanismos fisiopatológicos involucrados, la expansión asimétrica de *stents* en la aorta abdominal de conejos hipercolesterolémicos produce un aumento significativo de la hiperplasia neointimal debido a mayor hiperplasia en zonas de mayor concentración de metal.

REV ARGENT CARDIOL 2005;73:174-179.

Recibido: 26/10/2004
Aceptado: 07/03/2005
Dirección para separatas:
Alejandro D. Fernández
Servicio de Hemodinamia del
Hospital Italiano de Buenos Aires
Gascón 450 (1181)
Ciudad de Buenos Aires, Argentina
Tel. 4958-2452 / Fax 4958-2452
E-mail: alejandro.fernandez@
hospitalitaliano.org.ar

Palabras clave

> *Stent* - Reestenosis coronaria - Hiperplasia - Conejos - Experimental

INTRODUCCIÓN

Los *stents* coronarios están asociados con una tasa menor de reestenosis si se comparan con la angio-

plastia con balón. (1, 2) Es sabido que el efecto beneficioso está relacionado con el mayor lumen ganado y con una reducción significativa de la retracción elástica después de la intervención. (3) Sin embargo, los

stents no han demostrado que reduzcan la respuesta de proliferación neointimal a la injuria vascular observada tanto en los segmentos tratados con balón como en aquellos tratados con *stent*. Además, la injuria originada por el implante y el efecto de cuerpo extraño (4) del *stent* podrían dar por resultado un mayor estímulo para la proliferación. (5)

Dado que la injuria vascular está determinada por la presencia de cada *strut*, resulta de gran importancia estudiar el efecto de la expansión asimétrica sobre la reestenosis.

El presente estudio se diseñó con el objetivo de explorar el efecto de la expansión asimétrica sobre la hiperplasia neointimal en la aorta de conejos hipercolesterolémicos y de evaluar en qué grado la sobreexpansión por alta presión de un *stent* influye sobre la configuración de éste.

MATERIAL Y MÉTODOS

Modelo en el animal y protocolo experimental

Los procedimientos se llevaron a cabo en el laboratorio de Cardiología Intervencionista del Hospital Italiano de Buenos Aires y en el Instituto de Fisiopatología Cardiovascular de la Universidad de Buenos Aires.

Se aplicaron todos los procesos de asepsia que se utilizan de rutina para el implante de *stents* en seres humanos, a fin de evitar el riesgo de infecciones.

Un número total de 20 conejos machos de raza New Zealand de entre 2 y 2,5 kg de peso fueron alimentados con una dieta de colesterol al 1% durante un periodo de 60 días. Cada animal fue tratado con aspirina por vía oral en dosis de 5 mg/kg/día durante los tres días previos al procedimiento.

Los animales se distribuyeron en dos grupos:

Grupo 1: recibió *stents* de 3,0 mm de diámetro.

Grupo 2: recibió *stents* de 3,5 mm de diámetro.

A todos los animales se les administró 75 mg/kg de ketamina y 0,75 mg/kg de xylazina por vía subcutánea como premedicación anestésica. Se efectuó rasurado de ambas ingles, las cuales luego se desinfectaron con yodopovidona previo a la colocación de un campo estéril fenestrado. Se canuló una vena de la oreja con una cánula de teflón de 0,9 mm (Abbot 22®). A través de este acceso venoso se efectuó la anestesia mediante la infusión de ketamina y propofol.

El presente estudio se realizó siguiendo las guías para el cuidado y uso de animales de laboratorio, publicadas por el US National Institutes of Health (NIH Publication # 85 - 23, revised 1996). (6)

Logrado un plano anestésico estable, se expuso la arteria femoral mediante disección por planos. Una vez expuesta, la arteria se canalizó mediante una cánula de teflón de 1,3 mm de diámetro (Abbot 18®) a través de la cual se administraron 50 UI/kg de heparina. Se realizó una angiografía de control a través de dicha cánula, mediante la inyección de 5 cm³ de contraste de baja osmolaridad (Ioxaglate). Después de visualizar la anatomía de la aorta abdominal se progresó una cuerda intracoronaria de 0,014" a través de la cánula hasta alcanzar el cayado aórtico; sobre esta cuerda se colocó un introductor pediátrico de 4 F a través del cual se introdujo un balón de 3,0 mm de diámetro con el cual se efectuó la desendotelización de un segmento de la aorta infrarrenal. Luego de efectuado esto, se avanzó el *stent*. Se implantó sólo un *stent* por conejo. En el grupo 1, los *stents* de 3,0 mm de diámetro se liberaron a 20 atmósferas y alcanza-

ron un diámetro de 3,5 mm y en el grupo 2 los *stents* de 3,5 mm se liberaron a 10 atmósferas y alcanzaron un diámetro de 3,6 mm.

Una vez finalizado el procedimiento, la arteria femoral se ligó y la herida se cerró por planos. Todos los animales recibieron 5 mg/kg/día de aspirina por vía oral en el agua de bebida durante todo el período de seguimiento.

Se registraron 3 muertes prematuras, los 17 animales restantes completaron el seguimiento de 8 semanas y fueron sacrificados mediante inyección intravenosa de tiopental sódico luego de efectuar ultrasonido endovascular del segmento de la aorta donde se implantó el *stent*. Certificada la muerte del animal se efectuó la resección de los órganos para estudio anatomopatológico. Todos los órganos se pesaron y se fijaron en formol al 10%.

Stents

Se utilizaron dos diámetros diferentes de *stents* de acero inoxidable biocompatible 316L MultilinK Penta®, 3,0 mm de diámetro y 3,5 mm de diámetro, ambos con una longitud de 20 mm.

Los *stents* están montados en balones de 3,0 mm y 3,5 mm de diámetro, respectivamente, y todo el sistema está esterilizado mediante radiación gamma.

El diseño de los *stents* de 3,0 mm y 3,5 mm es similar, ambos tienen 6 coronas (*crests*) y tres articulaciones (*links*), son simétricos radialmente y con una relación corona/articulación de 2-1-2-1-2-1. La diferencia entre ambos *stents* es que los de 3,5 mm tienen *struts* ligeramente más largos (esto es para mantener la relación metal/arteria dentro del 15%) y un cambio mínimo en el ángulo superior de la corona que permite que el implante de 3,5 mm se distienda con más facilidad a un diámetro superior.

Técnica de ultrasonido endovascular y definiciones

El ultrasonido endovascular se realizó utilizando *pull back* motorizado a 1 mm por segundo. A fin de lograr una interpenetración estereomorfológica de la simetría del *stent* se integraron en una imagen las imágenes correspondientes a un corte de un milímetro. Cada corte de un milímetro generado por ultrasonido endovascular contiene 25 fotogramas; con la superposición de estos fotogramas se logra una imagen integrada de ese corte de 1 mm. De esta manera, la distribución de los *struts* se pudo evaluar con más precisión (Figura 1). Con esta técnica, cada corte representa 1 mm integrado en una imagen planar, lo cual da la posibilidad de analizar una estructura tridimensional en una imagen planar (un concepto similar a la imagen "bull eye" utilizada para el análisis de los cortes de estudios de perfusión con SPECT). Para el análisis de simetría utilizamos los "ángulos *interstrut*" a fin de cuantificar la separación entre ellos, medidos considerando como vértice el centro de la circunferencia determinada por el corte transversal de la arteria. Para ello se midieron los ángulos *interstruts* de todos los cortes a fin de obtener la población total de ángulos y en base al análisis de la población definir qué ángulo se consideraría punto de corte (Figura 2).

Se midieron un total de 2.832 ángulos (un promedio de 12 ángulos por corte) y se efectuó la distribución poblacional en dos grupos (grupo 1: *stents* de 3,0 mm y grupo 2: *stents* de 3,5 mm) (Figura 3). Se analizaron diferentes puntos de corte a fin de encontrar el que tuviera la mejor correlación con la evaluación visual de simetría; de esta manera se llegó a definir asimétrico a un corte cuando poseía al menos dos ángulos *interstruts* mayores al percentil 95.

La retracción elástica crónica medida mediante ultrasonido endovascular se definió como la diferencia entre el diá-

metro máximo alcanzado en el momento del implante y el diámetro máximo del *stent* en el seguimiento.

Examen histopatológico y morfométrico

Los segmentos de la aorta que contenían el *stent* implantado se fijaron en metacrilato. Se efectuaron cortes del extremo cefálico, del medio y del extremo caudal del *stent*. Todos los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina. El material procesado fue evaluado histológica y morfométricamente en forma ciega por un operador independiente (Figura 4). El análisis histológico incluyó la evaluación morfométrica de la hiperplasia neointimal medida a nivel de cada *strut* y en el espacio *interstrut*. El estudio morfométrico se realizó con un analizador digital (ImagePro® Plus 3.0) que permitió medir el crecimiento neointimal en micrones. Las mediciones se efectuaron entre la membrana elástica interna y el neointotelio.

Análisis estadístico

Para las variables de tipo continuo se determinó el tipo de distribución; en aquellas que mostraron distribución normal se utilizaron la media y desvío estándar y se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Bonferroni. Las variables con distribución no gaussiana se analizaron mediante pruebas no paramétricas (Kruskal-Wallis). Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

En 17 conejos se completó el seguimiento luego del implante exitoso de 17 *stents* (9 en el grupo 3,0 mm y 8 en el grupo 3,5 mm).

En el grupo 3,0 mm hubo una muerte prematura y en el grupo 3,5 mm se produjeron dos.

No se observaron episodios de trombosis parcial o total de los *stents* en ninguno de los dos grupos y todos los *stents* mostraron buena permeabilidad en la angiografía de seguimiento a las 8 semanas.

Retracción elástica

Los *stents* de 3,0 mm sobreexpandidos mostraron una retracción elástica significativamente mayor que los de 3,5 mm implantados a presión nominal ($0,28 \text{ mm} \pm 0,18$ versus $0,10 \pm 0,11$, $p < 0,001$). Considerando que la retracción aceptada como "normal" *in vitro* para estos *stents* es del 10%, concluimos que en el grupo de *stents* de 3,0 mm una retracción mayor que ese 10% se halló en el 37,9% de los casos mientras que en el grupo de 3,5 mm se encontró en el 2,7% ($p < 0,001$).

Configuración simétrica evaluada por ultrasonido endovascular

La configuración simétrica se observó en el 87,6% de los cortes en los *stents* de 3,0 mm y en el 88,1% de los cortes en los *stents* de 3,5 mm ($p = \text{NS}$).

Considerando simétricos los *stents* que poseían más del 90% de sus cortes simétricos, fueron simétricos el 88,8% de los *stents* de 3,0 mm y el 71,4% de los *stents* de 3,5 mm ($p = 0,5$).

Evaluación histopatológica

La hiperplasia neointimal promedio fue de 227,81 micrones en los *stents* de 3,0 mm y de 206,19 micrones en los *stents* de 3,5 mm ($p = 0,537$).

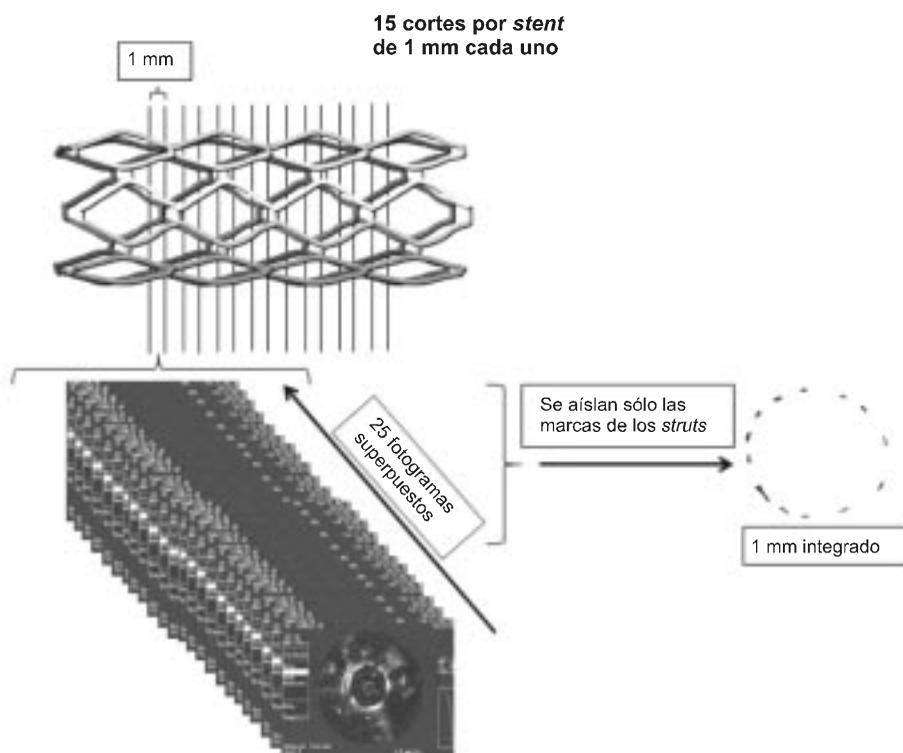


Fig. 1. Integración de los cortes de ultrasonido endovascular en una imagen planar.

La hiperplasia neointimal promedio fue significativamente menor en los *stents* simétricos (185,00 micrones) en comparación con los *stents* asimétricos (264,65 micrones) ($p = 0,025$).

Se observó una diferencia significativa en el grosor de la neointima entre las áreas que contenían

mayor concentración de metal, definidas como un ángulo de separación entre *struts* menor al percentil 95 (279,90 micrones), cuando se compararon con aquellas áreas con menor concentración metálica (205,34 micrones) ($p = 0,022$) (Figura 5).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo hemos observado un grado mayor de hiperplasia en los *stents* definidos asimétricos en comparación con aquellos con distribución simétrica de sus *struts*, como también un grado mayor de hiperplasia en las zonas con mayor concentración de metal.



- Promedio de 12 ángulos por *stent*
- Total de 2.832 ángulos
- 1.540 ángulos en el grupo 3,0 mm
- 1.292 ángulos en el grupo 3,5 mm

Fig. 2. Técnica de medición de los ángulos interstrut.

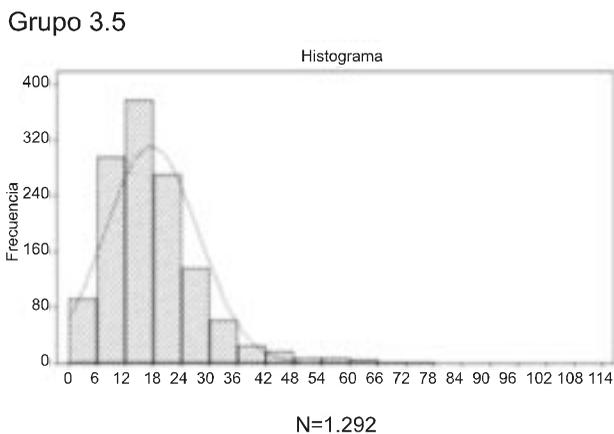
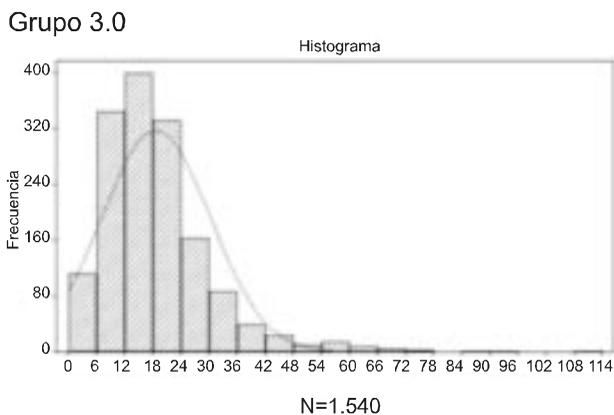


Fig. 3. Distribución de la población de ángulos de ambos grupos.

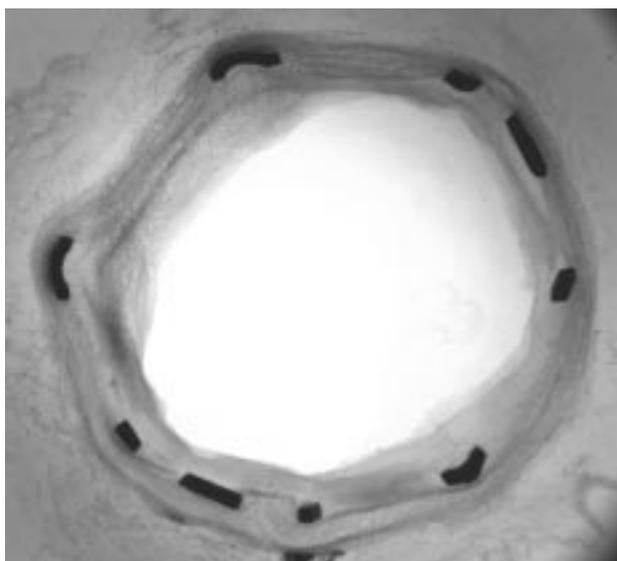


Fig. 4. Corte histológico de una aorta abdominal con stent implantado. Nótese la hiperplasia neointimal que cubre los struts.

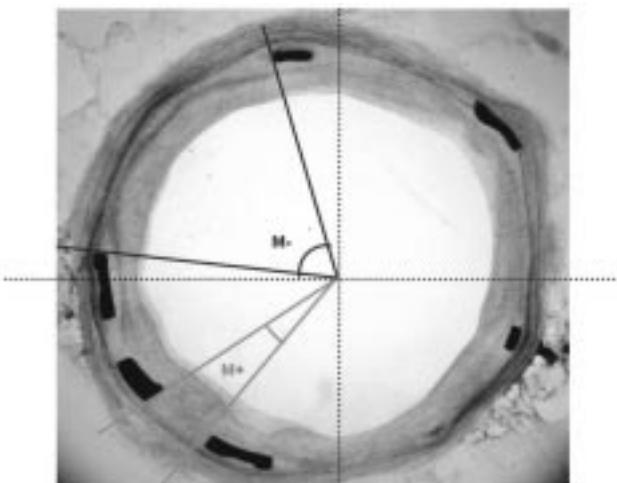


Fig. 5. División de los cuadrantes de un corte de acuerdo con la concentración de metal.

Además, la injuria vascular provocada por el implante y el efecto de cuerpo extraño generado por el metal tendrían mayor impacto en la proliferación neointimal y este impacto sería mayor en aquellas áreas con mayor concentración de metal.

Los hallazgos del presente estudio se relacionan con los del trabajo de Schultz y colaboradores, (7) quienes también estudiaron el efecto de la simetría en la génesis de la reestenosis, sólo que lo hicieron basados únicamente en el modelo histológico, sin tomar en cuenta la configuración total del *stent*. Por ser el *stent* una estructura tridimensional, resultaba incompleta una conclusión sólo sobre la base de los hallazgos de un corte de escasos micrones. Basándonos en esto, realizamos el presente estudio combinando el análisis histológico con el análisis estereomorfométrico realizado por ultrasonido endovascular. Por otro lado, en el estudio de Schultz y colaboradores no se analizó la causa de la mayor hiperplasia en las zonas de asimetría. Los hallazgos del presente estudio sugieren que esta mayor hiperplasia tiene relación directa con la mayor concentración de metal observada en ciertos cuadrantes de los *stents* asimétricos.

En cuanto a la evaluación de la retracción elástica, ésta fue mayor en los *stents* sobreexpandidos que en los implantados a presión nominal.

La reestenosis continúa siendo el principal problema de la angioplastia con implante de *stent*. Dado que el efecto beneficioso obtenido con los *stents* en la angioplastia está relacionado fundamentalmente con el mayor diámetro logrado, resulta de gran importancia evaluar la presencia de retracción elástica del *stent* (8) y determinar si ésta se relaciona con algún tipo de técnica de implante.

Este fenómeno de retracción elástica de los *stents* luego del implante se evaluó en diversos estudios, (9-11) pero ninguno de ellos lo relacionó con la técnica de implante. (12)

Estos resultados sugieren la importancia de adaptar la selección del *stent* al diámetro del vaso que se ha de tratar a fin de evitar su retracción mecánica. Por otra parte, sería desaconsejable el uso para arterias de gran calibre de aquellos modelos de *stents* que, a diferencia de los empleados en el presente estudio, no posean una estructura adaptada a los distintos diámetros.

SUMMARY

Restenosis and Asymmetric Expansion of Stents in the Aorta of Hypercholesterolemic Rabbits

Asymmetric expansion (AE) of stents is a heterogeneous distribution of the stent within the circumference of the arterial wall caused by distortions in the normal architecture of the expanded stent. This could relate to an increased aggression of the vessel wall in the location where greater metal concentration is found with a consequent increase of endothelial proliferation. Previous experimental studies seem to support this mechanism. The objective of this study was to explore the effect of AE on neointimal hyperplasia in the

aorta of hypercholesterolemic rabbits and to assess to which extent the degree of overexpansion of the stent due to high pressure would influence its configuration.

Twenty tubular 316L stainless steel stents were implanted in the abdominal aorta of hypercholesterolemic New Zealand rabbits. Intravascular ultrasound (IVUS) was performed during the procedure and after 8 weeks previous to sacrifice. IVUS analysis was employed to measure the degree of elastic retraction of the stents and to classify the stents in symmetric and asymmetric. For the latter, all the cuts obtained were integrated in a planar drawing during the mechanical withdrawal of the IVUS at 1 mm/sec (stereomorphometry). The histological analysis of neointimal growth was performed comparing the asymmetric stents (A) with the symmetric (S) ones, and the quadrants with increased metal concentration (M+) were compared to those where the wall was more metal free (M-). Seventeen animals completed the follow-up period and an early mortality rate of 15% was recorded.

Increased stent neointimal hyperplasia was observed in the stents defined as asymmetric (264.65 vs. 185.00 microns) ($p = 0.025$) and in zones with more metal concentration (279.90 vs. 205.34 microns) ($p = 0.022$).

No significant differences were observed regarding symmetry and amount of neointimal hyperplasia when comparing both implant techniques. The mechanical retraction was significantly higher in the overexpanded 3.0 stents, (0.28 ± 0.18 vs. 0.10 ± 0.11 mm) ($p < 0.001$)

Conclusion

In accordance with previous evidence and as suggested by the involved physiopathological mechanisms, the asymmetric expansion of stents in the abdominal aorta of hypercholesterolemic rabbits causes a significant increase of neointimal hyperplasia due to an increased hyperplasia in areas with increased metal concentration.

Key words: Stents - Coronary restenosis - Hyperplasia - Rabbits

BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- Cohen DJ, Krumholz HM, Sukin CA, Ho KK, Siegrist RB, Cleman M, et al. In-hospital and one-year economic outcomes after coronary stenting or balloon angioplasty. Results from a randomized clinical trial. *Stent Restenosis Study Investigators. Circulation* 1995;92:2480-7.
- 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.
- de Scheerder I, Wang K, Wilczek K, van Dorpe J, Verbeken E, Desmet W, et al. Local methylprednisolone inhibition of foreign body response to coated intracoronary stents. *Coron Artery Dis* 1996;7:161-6.
- González G, Berrocal D, Fernández A, Pérez S, Morales C, Bertoletti E y col. Influencia de la estructura y técnica de implante de *stents* sobre su retracción mecánica y grado de simetría en conejos hipercolesterolémicos: implicancias sobre la reestenosis. *Rev Argent Cardiol* 2004;72: 130 (Abstract).
- Guide for the Care and use of Laboratory animal. 7th edition. National Research Council, Institute of Laboratory animal. Resources, Washington DC. National Academy Press; 1996.
- Schulz C, Herrmann RA, Beilharz C, Pasquantonio J, Alt E. Coronary stent symmetry and vascular injury determine experimental restenosis. *Heart* 2000;83:462-7.

8. Yamamoto Y, Brown DL, Ischinger TA, Arbab-Zadeh A, Penny WF. Effect of stent design on reduction of elastic recoil: a comparison via quantitative intravascular ultrasound. *Catheter Cardiovasc Interv* 1999;47:251-7.
9. Carrozza JP Jr, Hosley SE, Cohen DJ, Baim DS. In vivo assessment of stent expansion and recoil in normal porcine coronary arteries: differential outcome by stent design. *Circulation* 1999;100:756-60.
10. Hong MK, Park SW, Lee CW, Ko JY, Kang DH, Song JK, et al. Intravascular ultrasound comparison of chronic recoil among different stent designs. *Am J Cardiol* 1999;84:1247-50, A8.
11. Okabe T, Asakura Y, Ishikawa S, Asakura K, Mitamura H, Ogawa S. Evaluation of scaffolding effects of five different types of stents by intravascular ultrasound analysis. *Am J Cardiol* 1999;84:981-6.
12. von Degenfeld G, Heinrich D, Giehl W, Boekstegers P. Comparison of Pura-Vario and Palmaz-Schatz stents following implantation using normal and high pressure in pigs: immediate and late results assessed by 3-dimensional IVUS. *Z Kardiol* 1999;88:906-13.