

## 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.revespcardiol.org](http://www.revespcardiol.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<sup>®</sup> 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<sup>®</sup>, 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 lumenales 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 ( $100 \times 100 \mu\text{m}$ ) (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).

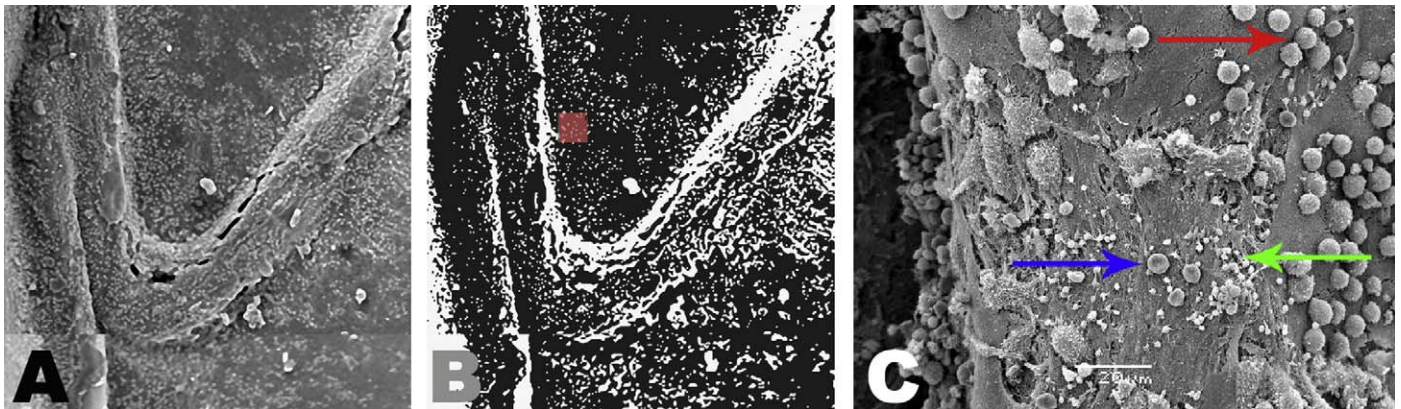
Se presentan los datos como media  $\pm$  desviación estándar. Se analizan las diferencias entre medias con el test de la *t* de Student y las correlaciones mediante la  $r^2$  de Pearson.

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

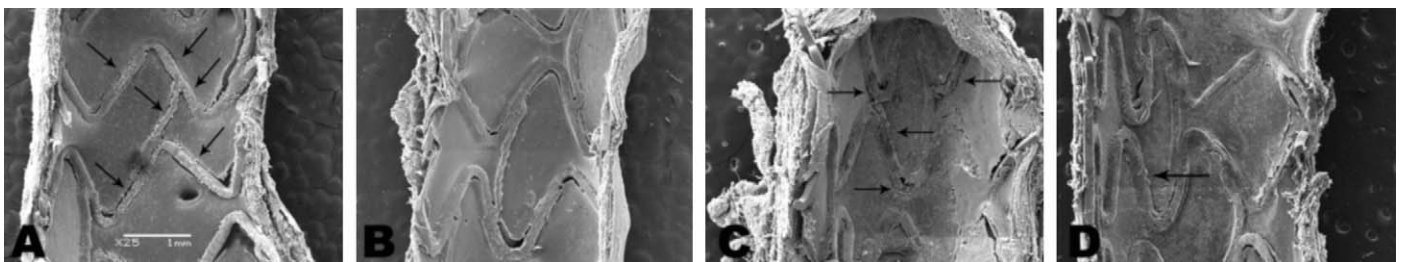
## RESULTADOS

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  $26,3 \pm 4,4\%$ ;  $p = 0,0001$ ).

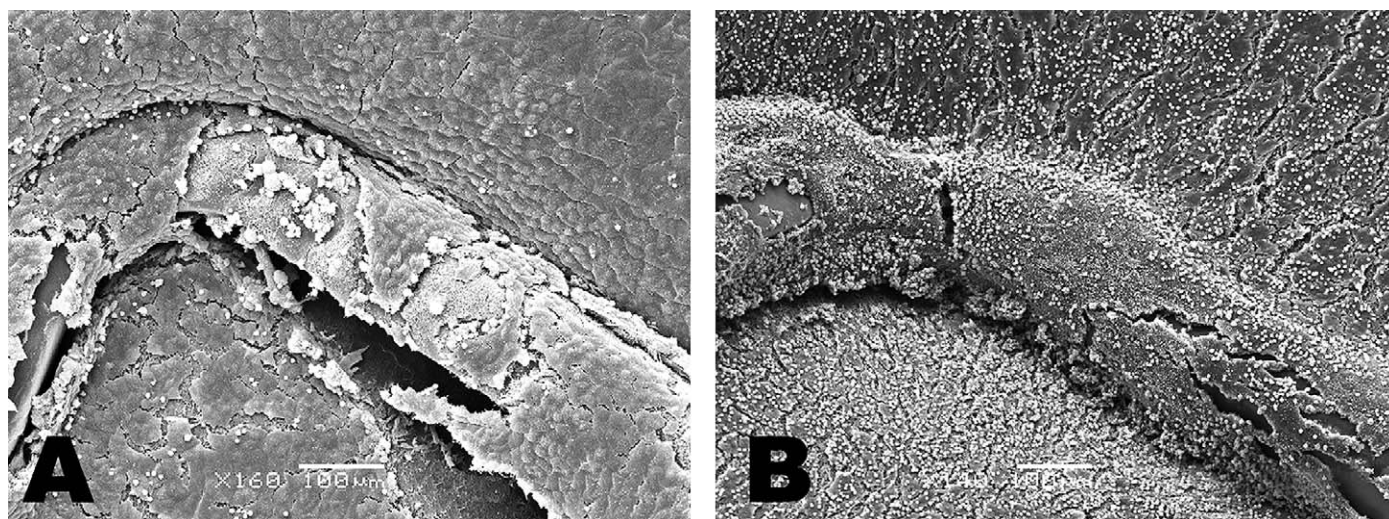


**Figura 1.** Procesado de las imágenes para análisis de la inflamación. A: respuesta inflamatoria al *stent* en zona adyacente de la pared. B: procesado del umbral de grises y selección de área representativa de  $100 \times 100 \mu\text{m}$  (cuadro rojo). C: detalle del tamaño y la morfología de leucocitos (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).

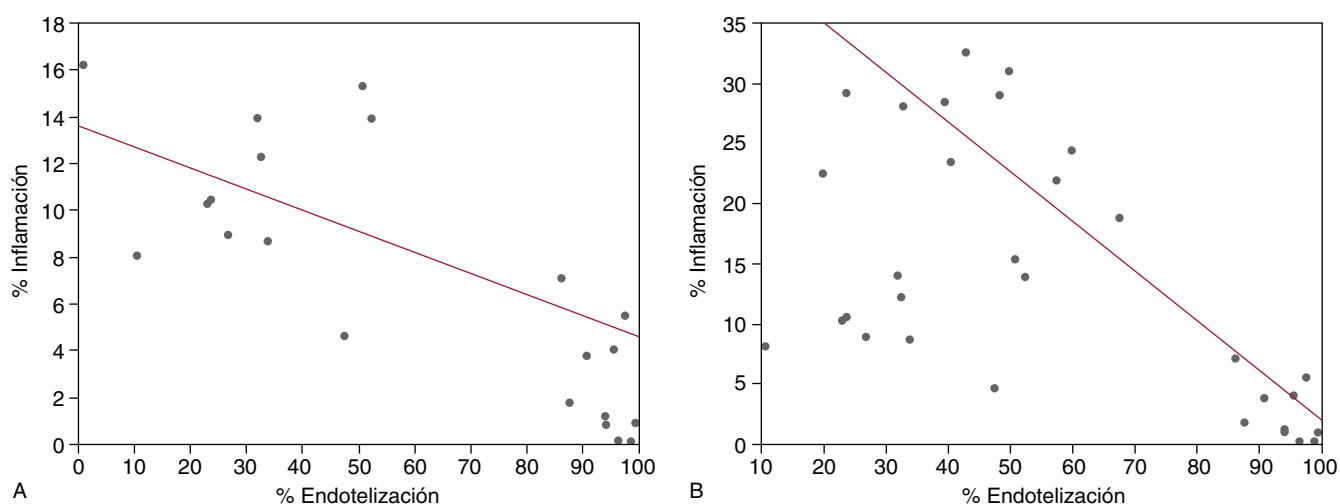


**Figura 2.** A y B: endotelización de *stent* de acero. A: a los 3 días, endotelización parcial del *stent*; áreas desnudas (flechas). B: a los 7 días, endotelización completa del *stent*. C y D: endotelización de *stent* farmacoactivo. C: a los 3 días, áreas desnudas (flechas) y el resto cubierto de 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* farmacoactivo, 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 CJ, Nakazawa G, Schwartz RS, Huibregtse 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.