

# La inyección intramural de lípidos en arterias coronarias induce lesiones ateroscleróticas complejas que expresan citoquinas inflamatorias: Implicación para el desarrollo de un modelo porcino de placa vulnerable<sup>§</sup>

Armando Tellez,\* Ángela Sanguino,\*\* Christine Ballantyne,\*\*\* Juan F Granada\*

## RESUMEN

**Antecedentes:** Demostramos previamente que la aplicación intramural de lípidos complejos en las arterias coronarias de cerdos mantenidos bajo una dieta alta en colesterol resulta en la formación de lesiones ateroscleróticas localizadas en un periodo de 12 semanas. Estas lesiones están localizadas en segmentos vasculares con remodelamiento positivo y asociadas a un incremento en el número de *vasa vasorum* en adventicia e infiltrados importantes de células mononucleares. En el presente estudio analizamos el grado de expresión de varias citoquinas inflamatorias en el desarrollo de lesiones ateroscleróticas comparadas con segmentos vasculares y control inyectados solamente con solución salina. **Material y métodos:** Una lesión vascular por balón fue realizada en 15 arterias coronarias en cerdos alimentados bajo una dieta de colesterol alto por 12 semanas. Dos semanas posterior al procedimiento, 60 segmentos coronarios fueron randomizados para inyección intramural de lípidos (n = 30) o solución salina (n = 30). La densidad de la neovascularización en las lesiones fueron analizadas por inmunohistoquímica de lectina. Los segmentos adyacentes fueron procesados para estudiar la expresión de RNA de citoquinas inflamatorias MCP-1 y VEGF. **Resultados:** 12 semanas posterior al procedimiento, se observó una estenosis leve a moderada en el área de estenosis vascular en los segmentos histológicos en ambos grupos (lípidos =  $17.3 \pm 15 \text{ mm}^2$  vs salina =  $32.4 \pm 22.8 \text{ mm}^2$ , p 0.017). El grupo con inyección de lípidos mostró una cantidad de *vasa vasorum* mayor en comparación con el grupo con inyección de solución salina (salina =  $30.6 \pm 21.6 \text{ vv/sección}$  vs lípidos =  $18.2 \pm 14.9 \text{ vv/sección}$ , p < 0.05). La densidad de *vasa vasorum* fue igualmente mayor en el grupo de lípidos comparados con solución salina (salina =  $7.3 \pm 4.6 \text{ vv/mm}^2$  vs lípidos =  $16.5 \pm 9 \text{ vv/mm}^2$ , p < 0.001). Por otro lado, la expresión de MCP-1 fue mayor en el grupo de lípidos ( $1.5 \pm 1.12$ ) comparado al grupo control ( $0.83 \pm 0.34$ , p < 0.01). La expresión de VEGF fue mayor de igual manera en el grupo de lípidos ( $1.36 \pm 0.9$ ) comparado al grupo control

## ABSTRACT

**Introduction:** We showed previously that intramural delivery of complex lipids into coronaries of pigs fed high-cholesterol diet results in formation of localized atherosclerotic-like lesions in 12 weeks. In human atherosclerosis, lesion complexity is associated with increased inflammation and neovascularization. Accordingly, we studied the neovascularization and expression of various inflammatory chemokines in our model, validated against active control (saline injection). **Methods:** Balloon injury was performed in 19 coronary segments of 5 pigs fed high cholesterol diet for 12 weeks. Two weeks after procedure, segments were randomized to intramural injections of lipids or saline. Neovessel density in the lesions was analyzed by lectin stain. Segments were processed for RNA expression of inflammatory chemokines such as MCP1, BRAK and RANTES, and receptors CCR2 and CCR5. **Results:** The neovessel density in the lipid-injected segments trended to be higher than that induced by the active control of saline ( $10.3 \pm 2.6$  vs  $6.61 \pm 4.8$  per visual field). Similarly, chemokine expression consistently exceeded that induced by saline injections (BRAK:  $23.07 \pm 46.8$  vs  $0.6 \pm 0.4$ , RANTES  $2.8 \pm 4.9$  vs  $0.9 \pm 0.3$  and MCP  $3.02 \pm 5.01$  vs  $0.7 \pm 0.3$ ). Chemokine receptor expression was also increased in the lesions developed following intramural lipid delivery in comparison to those induced by saline delivery (CCR2:  $3.48 \pm 6.5$  vs  $1.1 \pm 0.3$ ; CCR5:  $5.22 \pm 7.2$  vs  $1.3 \pm 0.4$ ). **Conclusion:** In our pig model of coronary lesions induced by intramural lipid injections, inflammatory chemokine expression and neovessel density markedly exceed those induced by the active control of saline injections. As such, these findings represent an important step toward validation that the model, despite its mechanically accelerated character, appears to produce pathophysiologic and molecular features resembling those seen in natural history of atherosclerosis.

§ Trabajo ganador del 1er. lugar, premio al investigador joven Dr. Mariano Ledesma Velasco, XIV Congreso Nacional de Cardiología, Cancún, Q. Roo, noviembre de 2010.

\* Skirball Center for Cardiovascular Research, Cardiovascular Research Foundation, Orangeburg, NY.

\*\* Department of Experimental Therapeutics, University of Texas, MD Anderson Cancer Center, Houston TX.

\*\*\* Center for Cardiovascular Disease Prevention, Methodist DeBakey Heart and Vascular Center, Houston, TX.

( $0.87 \pm 0.33$ ,  $p < 0.05$ ). **Conclusión:** La inyección intramural de lípidos complejos en las arterias coronarias de cerdos bajo una dieta alta en colesterol resulta en lesiones ateroscleróticas locales en segmentos vasculares con remodelación positiva con un número mayor de neovascularización y expresión de citoquinas proinflamatorias.

**Palabras clave:** MCP-1, VEGF, modelo porcino de aterosclerosis, modelo preclínico.

**Key words:** MCP-1, VEGF, atherosclerotic porcine model, preclinical models.

## INTRODUCCIÓN

Una de las principales limitaciones en la investigación de la placa vulnerable es la ausencia de un modelo preclínico que representa de manera precisa la enfermedad aterosclerótica que se observa en humanos. Se ha demostrado que la introducción de una dieta alta en colesterol en cerdos domésticos por periodos de tiempo largo induce lesiones ateroscleróticas<sup>1,2</sup> con alta variabilidad de localización en la vasculatura arterial y la ausencia de características patológicas vasculares de un ateroma avanzado que encontramos en los humanos.<sup>1,3,4</sup> Los modelos porcinos que desarrollan enfermedad aterosclerótica de manera natural usualmente se presentan en lesiones avanzadas pero toman un periodo largo en desarrollarse y se encuentran en diferentes etapas de desarrollo y localizadas al azar a lo largo del sistema arterial.<sup>5</sup> Recientemente, varios modelos basados en lesión vascular han sido propuestos para el estudio de imagen e intervención de aterosclerosis.<sup>6,7</sup> Aun y cuando los resultados histológicos de estos modelos produzcan diferencias con la enfermedad aterosclerótica humana, estos modelos ofrecen una opción costo-efectiva para la validación de imagenología y terapéuticas en el campo de investigación de placa vulnerable. Previamente reportamos datos preliminares de un modelo particular de aterosclerosis de lesión vascular.<sup>4,5</sup> En este modelo, una solución basada en lípidos son inyectados en arterias coronarias y se les da seguimiento por varias semanas posterior a la denudación vascular con balón. Alrededor de 12 semanas, las lesiones ateroscleróticas creadas muestran características de una lesión avanzada que consiste de abundante neovascularización, infiltración de células inflamatorias y remodelación vascular positiva. Este estudio está enfocado a analizar las características biológicas en este modelo por medio de la expresión de citoquinas proinflamatorias en el desarrollo de lesiones ateroscleróticas comparadas con segmentos control inyectadas con solución salina.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Diseño experimental

El estudio fue aprobado por el Comité Institucional del Uso y Cuidado Animal (IACUC). Todos los animales recibieron los cuidados establecidos por el protocolo, el cual sigue los lineamientos del bienestar animal y los «Principios de Cuidado de Animales de Laboratorio» formulado por el Instituto de Recursos de Animales de Laboratorio (Consejo de Investigación Nacional, NIH Publicación No. 85-23, revisión 1996). Un total de 5 cerdos domésticos (DS, peso promedio 30 kg) fueron incluidos en este estudio. Todos los animales fueron tratados con aspirina (650 mg) y clopidogrel (300 mg) un día previo al procedimiento y aspirina (325 mg) y clopidogrel (150 mg) en el día del procedimiento. Se realizó angiografía coronaria cuantitativa (QCA) y ultrasonido intravascular (IVUS) de base. Los segmentos coronarios fueron seleccionados de acuerdo a la accesibilidad y al calibre luminal apropiado. Se utilizó un balón al 130% del lumen arterial basado en el lumen base por IVUS para crear una lesión vascular. El procedimiento de lesión fue repetido dos veces. Dos semanas después de la lesión inicial, los segmentos coronarios fueron randomizados a dos grupos de estudio, la inyección intramural de la solución de lípidos o a un grupo control de inyección de solución salina. Todos los animales se alimentaron con una dieta hipercolesterolémica (2% colesterol, 20% manteca y 1.5% de colato de sodio) hasta el término del estudio.

### Protocolo de imagenología intravascular

Las imágenes del ultrasonido intravascular (IVUS) se obtuvieron utilizando un catéter de ultrasonido coronario (Atlantis® SR Pro 40 MHz catéter de imagen coronario, Boston Scientific, Natick, MA, US) y un sistema analítico comercialmente disponible (iLab Boston Scientific, Natick, MA, US). Por medio de

fluoroscopia, el catéter de IVUS se posicionó distal al segmento vascular previamente seleccionado por angiografía para la intervención. Posteriormente se obtuvo un escaneo del segmento a una velocidad de 0.5 mm/seg cubriendo por lo menos 10 mm proximal y distal al segmento vascular seleccionado. La posición inicial del catéter de IVUS se determinó por medio de fluoroscopia previo al escaneo y se utilizaron estructuras vasculares como referencias anatómicas durante el escaneo. El análisis morfométrico en cada arteria coronaria fue realizado bajo definiciones estándares previamente publicadas.<sup>8</sup>

### Solución lipídica para inyección

Una parte de lineato de colesterol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) fue añadido a dos partes de aceite de olivo para posteriormente mezclarlas. A esta solución de ésteres de colesterol se le agregó la isoforma 5 de LDL oxidado humano. La solución turbia y viscosa resultante se cargó a un catéter de inyección y se sumergió en solución salina tibia para aumentar su temperatura y disminuir la viscosidad de la solución inmediatamente previo a la inyección. El LDL utilizado para la inyección se aisló de pacientes homocigóticos para enfermedad hipercolesterolémica familiar y separados de acuerdo a la carga molecular utilizando un programador LCC-500 controlando dos bombas P-500 en una columna UnoQ12, una columna de intercambio aniónico (BioRad; Hércules, CA, USA) previamente equilibrada con buffer A (0.02 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 mM EDTA) a 4 °C. La proteína LDL en buffer A fue cargada a una columna UnoQ12 y eludida en un gradiente secuencial de buffer B (1 M NaCl en buffer A): 0%, 10 min; 0-15%, 10 min; 15-20%, 30 min; isocratic 20%, 10 min; 20-40%, 25 min; 40-100%, 10 min; 100%, 15 min; 100-0%, 5 min y 0%, 25 min. Las fracciones de LDL fueron agrupadas de acuerdo a la concentración de cloruro de sodio en cinco subfracciones, L1 a L5 (0.08-0.17 M, 0.17-0.18 M, 0.18-0.20 M, 0.20 M y 0.20-0.38 M, respectivamente). Los aislados fueron concentrados, esterilizados y almacenados a 4 °C.

### Inyección vascular intramural

Dos semanas posterior a la lesión vascular por balón, se realizó la inyección intramural endovascular utilizando un catéter de inyección (Mercator Med-Systems, San Leandro, CA). El sistema contiene una aguja en el extremo distal diseñado para penetrar la pared arterial y permitir la infusión de solución du-

rante la inflación del balón de una manera simétrica controlado por un mecanismo mecánico. El catéter de inyección se posicionó en el segmento vascular en donde previamente se realizó la lesión vascular por balón. Para asegurar que el balón se haya inflado por completo y se haya expandido a un diámetro apropiado para asegurar la aplicación de la solución el proceso fue observado con detenimiento por medio de fluoroscopia. Posterior a la randomización del tratamiento coronario, por medio del catéter de infusión se lograron aplicar aproximadamente 250 mL de solución salina en el grupo control o infusión lipídica en cada segmento por inyección. El procedimiento se repitió circunferencialmente para un total de 4 inyecciones en el segmento vascular, alcanzando un total de 1 mL de solución inyectada. A doce semanas posteriores a la inyección, se realizó angiografía terminal y IVUS. Posterior a la imagenología terminal se aplicó eutanasia en los animales bajo anestesia general y la inyección intravenosa de solución de eutanasia comercial. Posterior a la eutanasia, el corazón se extrajo y las arterias coronarias se limpiaron de cualquier remanente sanguíneo con un litro de solución salina y se extrajeron del miocardio. Las arterias coronarias fueron subseccionadas en anillos vasculares de 2 a 3 mm. Los segmentos vasculares fueron seleccionados de una manera secuencial para ser preparados para histología o cuantificación analítica de la expresión genética de mRNA. Así, cada segmento vascular asignado a expresión genética pertenecerá a un segmento vascular destinado a análisis histológico.

### Protocolo de histología

Los segmentos arteriales destinados para histología se sumergieron en formalina al 10% por 12 horas. Los segmentos arteriales se procesaron bajo protocolos de histología estándares. Los segmentos arteriales se montaron en bloques de parafina y se cortaron para producir secciones de 5 µm de grosor. Las laminillas se tiñeron con hematoxilina y eosina al igual que con pentacromo de Movat. Además se realizó la detección histológica de células endoteliales utilizando *Griffonia simplicifolia* Biotinada Lectina 1 (Vector Laboratories, Burlingame, CA) en cada segmento bajo protocolos generales de inmunohistoquímica. Utilizando el software Spot Advanced y 4.1.1 se obtuvieron imágenes digitales y se realizó morfometría utilizando el software BIOQUANT NOVA PRIME v6.70.10. En el análisis morfométrico se compuso de área luminal (LA, mm<sup>2</sup>) y área de lámina elástica externa e interna (EEL, IEL, mm<sup>2</sup>). El área de la

neointima se definió como IEL menos LA. El porcentaje del área de estenosis se calculó como  $[(\text{IEL-LA})/\text{IEL}] \times 100$ . Utilizando cuadrantes en la circunferencia vascular y una escala semicualitativa se determinó la cuantificación de *vasa vasorum* (VV). La densidad de VV se determinó calculando el resultado de la cuantificación de VV y dividido por el área íntima medial (EEL-LA) con el propósito de determinar la densidad de VV de acuerdo a la formación neointimal en cada segmento arterial.

### Aislamiento de RNA, transcripción reversa de PCR (RT-PCR)

Segmentos arteriales inyectados destinados a expresión genética se sumergieron en el medio OCT para muestras de tejido congelado y se congeló en nitrógeno líquido. Posteriormente, una reacción en cadena de la polimerasa de dos pasos se utilizó para determinar la cantidad relativa de varias transcripciones de RNA en los segmentos arteriales destinados a la expresión genética. El RNA celular total se aisló de las muestras vasculares por medio de trizol (Invitrogen, Carlsbad CA) de acuerdo a las instrucciones de uso de la compañía. Un homogeneizador fue utilizado para homogeneizar las muestras de tejido en trizol previamente al aislamiento de RNA. Posterior al aislamiento, las muestras de RNA se trataron con DNase para remover DNA genómico residual. La primera línea de cDNA fue sintetizada de 5.0  $\mu\text{g}$  RNA en 100  $\mu\text{L}$  RT utilizando un kit de almacenamiento de alta capacidad de cDNA (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acuerdo a las instrucciones de uso. El método RT utiliza hexámeros al azar para sintetizar cDNA primo. TaqMan tiempo real QPCR se utilizó para determinar las cantidades relativas cDNA de varios genes objetivo. Adicionalmente, la cantidad relativa de cDNA de 18S (ribosomal) se determinó como normalizador. Todos los ensayos de QPCR para los genes objetivos se designaron en el laboratorio. El ensayo de 18S QPCR se adquirió pre-diseñado (Applied Biosystems, Foster City, CA). QPCR se realizó con un sistema de detección de secuencia ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA) en 50  $\mu\text{L}$  reacciones singleplex de acuerdo a las instrucciones de uso. Diluciones seriadas de una muestra representativa de cDNA fue utilizada como una curva estándar para la cuantificación relativa de cDNA. Esta metodología se utilizó para cuantificar la expresión de mRNA de MCP-1 y VEGF en las muestras arteriales destinadas para expresión genética.

### Análisis estadístico

El resultado de cada método analítico se presentó como promedio y desviación estándar. El análisis estadístico se realizó utilizando el software SigmaStat 3.11 (2004. Sustat Inc. San José, California, US). La prueba t de Student impar fue utilizada para estudiar las diferencias entre ambos grupos. Un valor de p menor de 0.05 se consideró como diferencia estadística significativa.

## RESULTADOS

### Análisis coronario cuantitativo

Un total de 60 segmentos coronarios se inyectaron ya sea con solución lipídica ( $n = 30$ ) o solución salina ( $n = 30$ ). En el análisis coronario cuantitativo (QCA), el diámetro mínimo luminal (MLD) de base no mostró diferencia estadística entre el grupo de inyección salina ( $2.7 \pm 0.4$  mm) e inyección lipídica ( $2.8 \pm 0.3$  mm,  $p = 0.5$ ). A la terminación del estudio, se observó una reducción del MLD en ambos grupos (inyección salina =  $2.3 \pm 0.3$  mm, reducción de 15% *versus* inyección lipídica =  $2.3 \pm 0.4$  mm, reducción de 18%). A pesar de las diferencias que se observaron por QCA en el porcentaje de diámetro de estenosis (%DS) no fueron estadísticamente significativas entre los grupos (inyección salina =  $14.7 \pm 5.7\%$  *versus* inyección lipídica =  $19.5 \pm 16\%$ ,  $p = 0.5$ ). Al término del estudio, el análisis volumétrico del IVUS mostró una lesión vascular con una longitud promedio de  $16.6 \pm 6.9$  mm y un porcentaje de área de estenosis de  $41.9 \pm 7.9\%$ .

### Análisis histomorfométrico

El promedio del área vascular en los segmentos vasculares estudiados no fue diferente entre los grupos. (inyección lipídica =  $4.18 \pm 1.62$  mm<sup>2</sup> *versus* inyección salina =  $4.17 \pm 1.59$  mm<sup>2</sup>,  $p = 0.997$ , NS). El porcentaje de área de estenosis (%AS) fue más prominente en el grupo de inyección salina comparado con el grupo de inyección lipídica (inyección salina =  $32.4 \pm 22.8$  *versus* inyección lipídica =  $17.3 \pm 15.0$ ,  $p = 0.017$ , Cuadro I). Se observó un aumento estadísticamente significativo en la cuantificación de VV en el grupo de inyección lipídica ( $30.6 \pm 21.6$  vv/laminilla) comparado con aquellos segmentos del grupo control inyectados con solución salina ( $18.2 \pm 14.9$  vv/laminilla,  $p = 0.04$ ). La densidad de VV (cuantificación de VV por área neointimal) en el grupo de inyección lipídica fue estadísticamente mayor que el grupo control de inyección de solución salina (inyección salina  $7.3 \pm 4.6$



VV/mm<sup>2</sup> versus inyección lipídica  $16.5 \pm 9.0$  VV/mm<sup>2</sup>,  $p < 0.001$ , Cuadro I).

### Análisis de expresión genética de mRNA

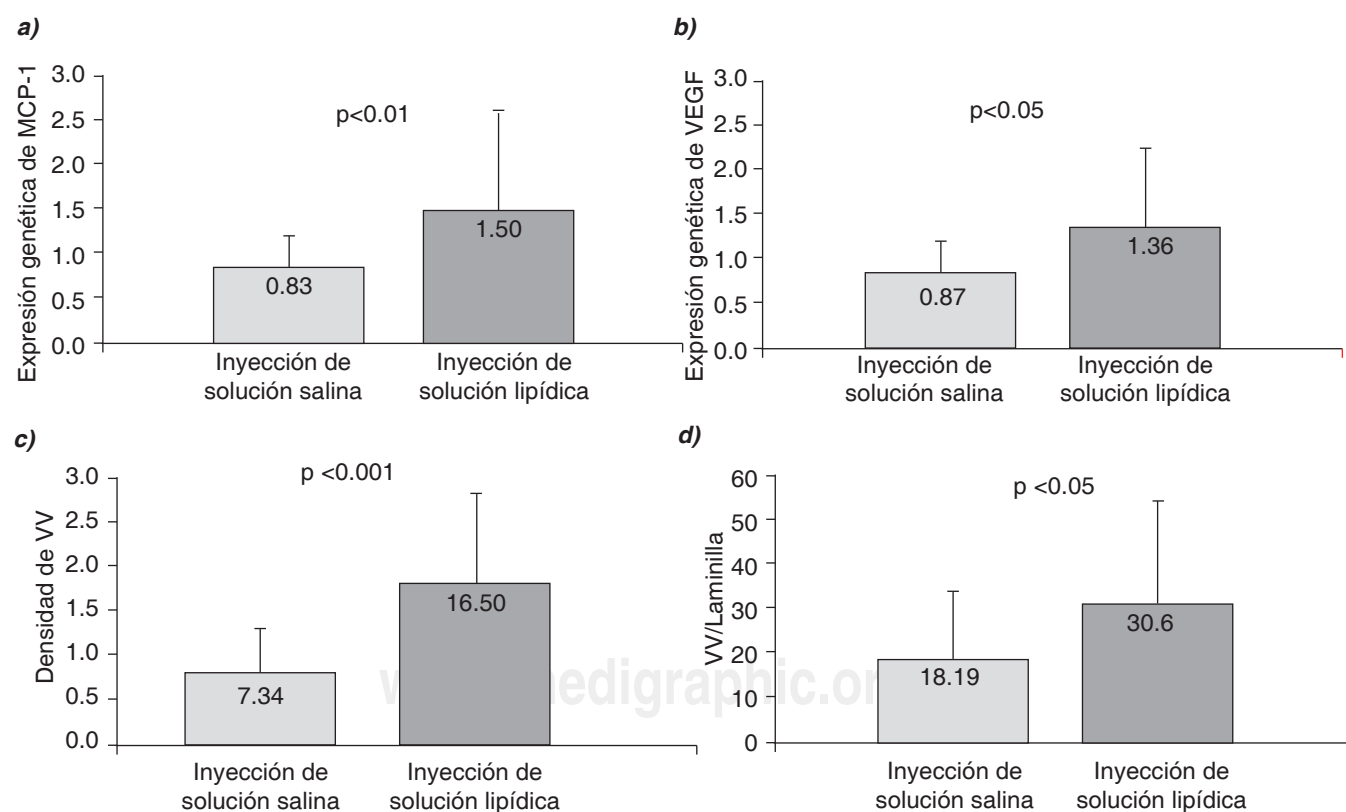
Comparado con la curva de estandarización para la cuantificación del cDNA, el grupo de inyección lipí-

dica mostró un incremento estadísticamente significativo cuando se estudió el MCP-1 comparado con el grupo control (inyección de solución salina =  $0.83 \pm 0.34$  versus inyección lipídica =  $1.55 \pm 1.12$ ,  $p < 0.01$ ). Resultados similares se observaron cuando se estudió la expresión de VEGF mostrando un incremento estadísticamente significativo en el grupo de

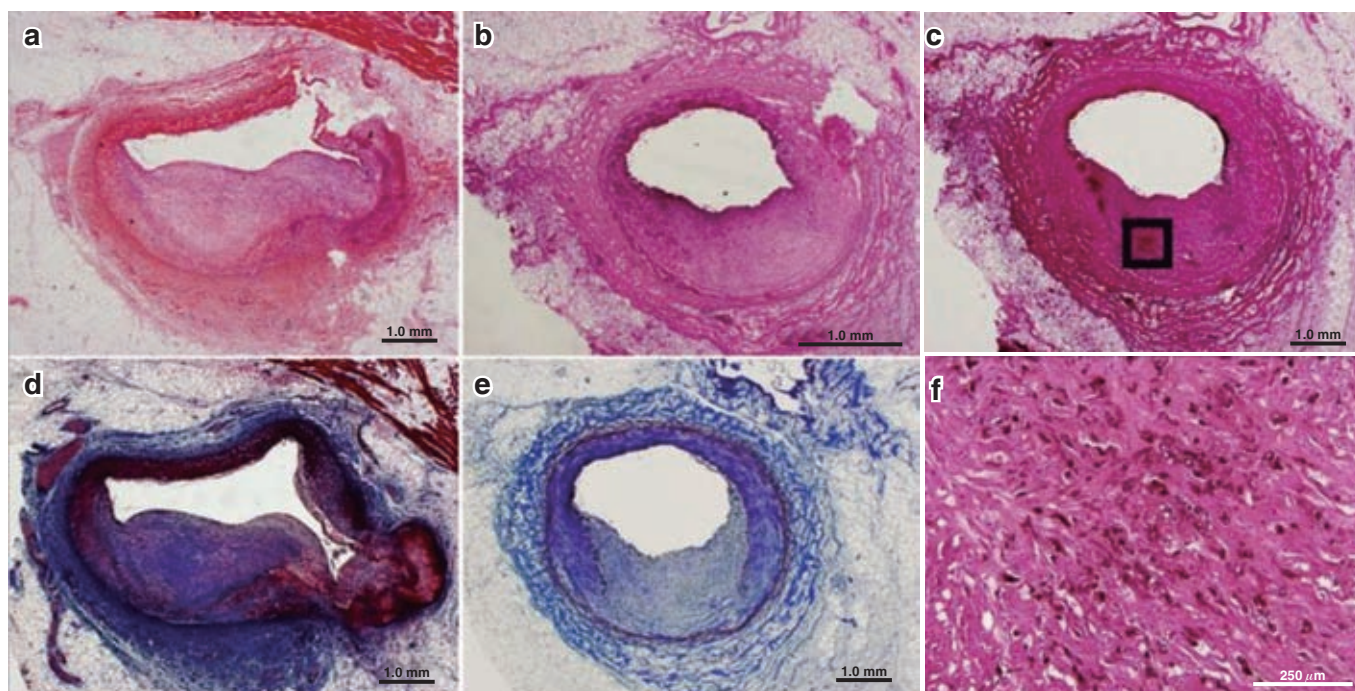
**Cuadro I.** Hallazgos morfológicos y cuantificación de vasa vasorum del grupo de inyección de solución lipídica comparados con el grupo control de inyección de solución salina. Un valor  $\geq 0.05$  de  $p$  fue considerado como significativo.

|                                                 | Inyección lipídica (n = 30) | Inyección salina (n = 30) | Valor p         |
|-------------------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------|
| EEL (mm <sup>2</sup> )                          | $4.18 \pm 1.62$             | $4.17 \pm 1.59$           | $p \ 0.9$ , NS  |
| Porcentaje del área de estenosis (%)            | $17.3 \pm 15.0$             | $32.4 \pm 22.8$           | $p \ 0.017$ , S |
| Cuantificación de vasa vasorum                  | $30.6 \pm 21.6$             | $18.2 \pm 14.9$           | $p \ 0.04$ , S  |
| Densidad de vasa vasorum (No./mm <sup>2</sup> ) | $16.5 \pm 9.0$              | $7.3 \pm 4.6$             | $p < 0.001$ , S |

S: diferencia estadística; NS: diferencia no significativa



**Figura 1.** Análisis de citocinas y neovascularización. Un aumento estadísticamente significativo se observó en el grupo de inyección lipídica en ambos, a) MCP-1 y b) VEGF cuando se comparó con el grupo control de inyección de solución salina. c) La cantidad de vasa vasorum fue significativamente mayor en el grupo de inyección lipídica comparado con el grupo control. d) Sin embargo, cuando se analizó la cantidad de vasa vasorum en relación al área neointimal, la diferencia estadística entre el grupo de inyección lipídica fue más evidente comparado con el grupo control.



**Figura 2.** Una formación neointimal significativa se observó como efecto de la lesión vascular por balón e inyección de solución salina en la tinción de hematoxilina y eosina (a, magnificación 2x) y tricromo de Masson (d, magnificación 2x). En contraste, en el grupo de inyección de lípidos (b, c, e, magnificación 2x) la formación neointimal observada fue menos estenótica. Sin embargo, en la tinción de tricromo de Masson se observó cómo el contenido colágeno/fibrótico de la placa (blue) en el grupo control de inyección salina (d) es mayor que el contenido de colágeno/fibrótico del grupo con inyección de solución lipídica (e) sugiriendo que el grupo control produce una lesión mucho más estable y firme que la lesión formada por el grupo de inyección de lípidos. Imágenes representativas de la tinción de células endoteliales del grupo de inyección de lípidos (c, magnificación 2x). Las estructuras microvasculares observadas fueron detectadas en el área de la placa tanto como en el área medial y adventicia (f, magnificación 20x).

inyección lipídica comparado con el grupo control (inyección de solución salina  $0.87 \pm 0.33$  versus inyección lipídica,  $1.36 \pm 0.92$ ,  $p = 0.013$ , *Figura 1*).

## DISCUSIÓN

El cerdo doméstico es el modelo más comúnmente utilizado en la investigación cardiovascular. Su similitud, tanto anatómicamente como en tamaño con el humano, lo hacen un modelo ideal para el estudio de enfermedad aterosclerótica.<sup>1</sup> El perfil lipoproteínico y el metabolismo lipídico en los cerdos domésticos tienen mucha similitud con el que se observa en los humanos. Cuando se mantiene a los cerdos domésticos bajo una dieta alta en colesterol, este modelo eventualmente desarrolla lesiones que semejan a las observadas en la enfermedad aterosclerótica. Estas lesiones tempranas, sin embargo, son de origen fibro-elástico en naturaleza y carecen de los componentes patológicos que se observan en las

lesiones vasculares en humanos.<sup>1,2</sup> Numerosas investigaciones han tenido como objetivo principal el desarrollo de lesiones ateroscleróticas complejas utilizando el modelo porcino, ya sea por medio de modificaciones en la dieta y suplementos alimenticios, induciendo lesiones vasculares o ambos. Sin embargo, aunque aún son efectivos en crear lesiones vasculares, estos modelos están limitados por el tiempo que conlleva el desarrollo de las lesiones vasculares, el costo y la composición de la lesión resultante. Gerrity et al.<sup>1</sup> aceleraron el proceso (20 semanas) por medio del uso de streptozotocin con el cual se indujo diabetes en cerdos bajo una dieta similar.<sup>1</sup> Por otro lado, otros investigadores han tenido como objetivo acelerar el proceso por medio de una lesión vascular directa. Shi et al.<sup>3</sup> describieron un modelo de aterosclerosis en las arterias carótidas que semeja aterosclerosis humana en cerdos que se han mantenido en dieta alta en colesterol, además de físicamente ocluir parcialmente las arterias a estudiar.<sup>3</sup>

En nuestro laboratorio, previamente se propuso un método para inducir lesiones ateroscleróticas, combinando lesión vascular por balón y la aplicación de sustancias lipídicas en la adventicia vascular. Demostramos anteriormente que en 2 semanas estas lesiones vasculares son localizadas y con remodelamiento positivo y fácilmente identificables utilizando la tecnología de ultrasonido intravascular. Estas lesiones contienen abundantes células inflamatorias y neovascularización en adventicia y media vascular, la cual asemeja a las etapas tempranas del desarrollo de la enfermedad aterosclerótica humana.<sup>4,5</sup> Estudios de autopsia han demostrado que la aterosclerosis humana está fuertemente asociada con la presencia de macrófagos<sup>9</sup> y neovascularización.<sup>9-13</sup> El sistema molecular de citocinas es conocido por activar y reclutar células inflamatorias en diferentes situaciones biológicas y promueve la neovascularización en la aterosclerosis.<sup>10</sup> También ha descrito que el grosor de la neointima promueve el incremento de la densidad de VV.<sup>12</sup> En un intento para proporcionar el oxígeno necesario para los componentes celulares del engrosamiento patológico de la media vascular, se detona un estímulo para el desarrollo de nuevos vasos. Sin embargo, la pared vascular de estos vasos no posee la madurez adecuada; esto sugiere que existe fuga de eritrocitos y el depósito de lipoproteínas de baja densidad de colesterol en la neointima dentro del periodo temprano de aterosclerosis. La acumulación de estos componentes biológicos en la media vascular se comporta como un estímulo dirigido por citocinas que promueven el reclutamiento de células inflamatorias y la activación de las mismas resultando en una infiltración vascular de células inflamatorias observadas en las placas ateroscleróticas complejas.<sup>12,14</sup> Dos de las citocinas que están relacionadas con la quimiotaxis de células inflamatorias y la vasculogénesis son la proteína quimiotáctica de monocitos proteína-1 (MCP-1) y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). El rol de MCP-1 en la angiogénesis y aterosclerosis ha sido estudiado extensamente.<sup>15-19</sup> La presencia de la proteína MCP-1 se ha correlacionado con la proliferación de la neointima<sup>17</sup> y la presencia de células espumosas.<sup>10,15-18,20</sup> También ha sido detectada en placas ateroscleróticas en humanos y áreas ricas en macrófagos.<sup>21,22</sup> Por otro lado, se piensa que MCP-1 juega un papel fundamental en la transición de una lesión aterosclerótica estable a un estado de la enfermedad aterosclerótica más compleja.<sup>10,23</sup> Los roedores knockout MCP-1<sup>-/-</sup> usualmente desarrollan lesiones ateroscleróticas estables con alto contenido de colágeno con una formación mínima de centro necrótico en las placas ateroscleróticas.<sup>23</sup> VEGF induce neovascularización en procesos tanto

fisiológicos como patológicos.<sup>12,18,24-26</sup> La administración de la proteína VEGF-A en un roedor deficiente de apolipoproteína-E promueve angiogénesis mientras que la administración del anticuerpo antiVEGFR-1 en el mismo modelo animal reduce el desarrollo y aumenta la estabilidad de la placa aterosclerótica.<sup>27,28</sup>

Para poder determinar la similitud de nuestro modelo acelerado de aterosclerosis por medio de inyección lipídica para el desarrollo de aterosclerosis humana,<sup>12</sup> estudiamos la densidad de VV y su correlación con MCP-1 y VEGF. De acuerdo al análisis histomorfométrico, el porcentaje de estenosis fue mínimo en ambos grupos. En el presente estudio, el daño vascular por medio de sobreexpansión del balón y la introducción de una aguja fueron variables controladas para ambos grupos. Morfológicamente, las lesiones desarrolladas fueron excéntricas, no oclusivas y localizadas en segmentos arteriales con remodelamiento positivo. Haft et al.<sup>29</sup> describieron que la mayoría de las lesiones coronarias permanecen estables o empeoran sólo de manera mínima con el tiempo. Un rápido progreso en la enfermedad obstructiva ocurre en segmentos coronarios que originalmente tenían mínima o modesta enfermedad intraluminal (< 20% de obstrucción luminal).<sup>29</sup> La importancia de la placa vulnerable permanece en el hecho de que un número significativo de oclusiones trombóticas se desarrollan entre angiografías previamente catalogadas como «normales» o con irregularidad mínima. Mann et al.<sup>30</sup> estudiaron 106 placas humanas de 49 especímenes coronarios. No se encontró una correlación entre el tamaño del centro necrótico y el grado de estenosis, grosor de la capa fibrosa y tamaño de la placa.<sup>30</sup> Ahora se considera que el tamaño del centro necrótico y la composición son factores más importantes que la severidad de la obstrucción con respecto a la vulnerabilidad de la placa. La composición celular de la placa aterosclerótica determina su vulnerabilidad y el desarrollo de una eventual trombosis vascular.<sup>31</sup> En nuestro estudio analizamos la composición celular entre los grupos y observamos que difieren significativamente (*Figura 2*). Este análisis demostró que existe un aumento de 44% en la densidad de VV en el grupo con inyección lipídica comparado con el grupo control de inyección de solución salina. Este resultado, en conjunto con el aumento de 55 y 63% en la expresión genética de MCP1 y VEGF, respectivamente, sugieren que existe un proceso de angiogénesis e inflamatorio establecido, semejando la situación patológica que se observa en la aterosclerosis humana.

Es necesario continuar la investigación para determinar la relación de este modelo con la enfermedad aterosclerótica humana y ver su posible aplicación en



estudios preclínicos más complejos como el de dispositivos intravasculares e imagenología. Sin embargo, el modelo aquí descrito tiene el potencial de ser un excelente método de inducción de lesiones ateroscleróticas en un modelo porcino. Debido a su naturaleza acelerada, es útil para suplantar a otros modelos, los cuales llevan meses para el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Gerrity RG, Natarajan R, Nadler JL, Kimsey T. Diabetes-induced accelerated atherosclerosis in swine. *Diabetes* 2001; 50(7): 1654-65.
- Gerrity RG, Naito HK, Richardson M, Schwartz CJ. Dietary induced atherogenesis in swine. Morphology of the intima in prelesion stages. *Am J Pathol* 1979; 95(3): 775-92.
- Shi ZS, Feng L, He X, Ishii A, Goldstine J, Vinters HV, Vinuela F. Vulnerable plaque in a swine model of carotid atherosclerosis. *Am J Neuroradiol* 2009; 30(3): 469-72.
- Granada JF, Moreno PR, Burke AP, Schulz DG, Raizner AE, Kaluza GL. Endovascular needle injection of cholesteryl linoleate into the arterial wall produces complex vascular lesions identifiable by intravascular ultrasound: early development in a porcine model of vulnerable plaque. *Coron Artery Dis* 2005; 16(4): 217-24.
- Granada JF, Kaluza GL, Wilensky RL, Biedermann BC, Schwartz RS, Falk E. Porcine models of coronary atherosclerosis and vulnerable plaque for imaging and interventional research. *Eurointervention* 2009; 5(1): 140-8.
- Busnelli M, Froio A, Bacci ML, Giunti M, Cerrito MG, Giovannoni R, Forni M, Gentilini F, Scagliarini A, Deleo G, Benatti C, Leone BE, Biasi GM, Lavitrano M. Pathogenetic role of hypercholesterolemia in a novel preclinical model of vascular injury in pigs. *Atherosclerosis* 2009; 207(2): 384-90.
- Ferns GA, Avades TY. The mechanisms of coronary restenosis: insights from experimental models. *Int J Exp Pathol* 2000; 81(2): 63-88.
- Mintz GS, Nissen SE, Anderson WD, Bailey SR, Erbel R, Fitzgerald PJ, Pinto FJ, Rosenfield K, Siegel RJ, Tuzcu EM, Yock PG. American College of Cardiology Clinical Expert Consensus Document on Standards for Acquisition, measurement and reporting of intravascular ultrasound studies (IVUS). A report of the American College of Cardiology Task Force on Clinical Expert Consensus Documents. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37(5): 1478-92.
- Fan J, Watanabe T. Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2003; 10(2): 63-71.
- Frangogiannis NG. The prognostic value of monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 in acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50(22): 2125-7.
- Langheinrich AC, Michniewicz A, Sedding DG, Walker G, Beighley PE, Rau WS, Bohle RM, Ritman EL. Correlation of *vasa vasorum* neovascularization and plaque progression in aortas of apolipoprotein E(-/-)/low-density lipoprotein(-/-) double knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26(2): 347-52.
- Langheinrich AC, Kampschulte M, Buch T, Bohle RM. *Vasa vasorum* and atherosclerosis - Quid novi? *Thromb Haemost* 2007; 97(6): 873-9.
- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420(6917): 868-74.
- Moreno PR, Purushothaman KR, Zias E, Sanz J, Fuster V. Neovascularization in human atherosclerosis. *Curr Mol Med* 2006; 6(5): 457-77.
- Heil M, Ziegelhoeffer T, Wagner S, Fernandez B, Helisch A, Martin S, Tribulova S, Kuziel WA, Bachmann G, Schaper W. Collateral artery growth (arteriogenesis) after experimental arterial occlusion is impaired in mice lacking CC-chemokine receptor-2. *Circ Res* 2004; 94(5): 671-7.
- Ito WD, Arras M, Winkler B, Scholz D, Schaper J, Schaper W. Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circ Res* 1997; 80(6): 829-37.
- Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res* 2004; 95(9): 858-66.
- Fujii T, Yonemitsu Y, Onimaru M, Tanli M, Nakano T, Egashira K, Takehara T, Inoue M, Hasegawa M, Kuwano H, Sueishi K. Nonendothelial mesenchymal cell-derived MCP-1 is required for FGF-2-mediated therapeutic neovascularization: critical role of the inflammatory/arteriogenic pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26(11): 2483-9.
- Hoefer IE, van Royen N, Buschmann IR, Piek JJ, Schaper W. Time course of arteriogenesis following femoral artery occlusion in the rabbit. *Cardiovasc Res* 2001; 49(3): 609-17.
- Hartl D, Griesse M, Nicolai T, Zissel G, Prell C, Reinhardt D, Schendel DJ, Krauss-Etschmann S. A role for MCP-1/CCR2 in interstitial lung disease in children. *Respir Res* 2005; 6: 93.
- Takeya M, Yoshimura T, Leonard EJ, Takahashi K. Detection of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerotic lesions by an anti-monocyte chemoattractant protein-1 monoclonal antibody. *Hum Pathol* 1993; 24(5): 534-9.
- Yla-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Sarkioja T, Yoshimura T, Leonard EJ, Witztum JL, Steinberg D. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(12): 5252-6.
- Inoue S, Egashira K, Ni W, Kitamoto S, Usui M, Otani K, Ishibashi M, Hiasa K, Nishida K, Takeshita A. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy limits progression and destabilization of established atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation* 2002; 106(21): 2700-6.
- Moulton KS, Vakili K, Zurakowski D, Soliman M, Butterfield C, Sylvén E, Lo KM, Gillies S, Javaherian K, Folkman J. Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(8): 4736-41.
- Kolodgie FD, Narula J, Yuan C, Burke AP, Finn AV, Virmani R. Elimination of neoangiogenesis for plaque stabilization: is there a role for local drug therapy? *J Am Coll Cardiol* 2007; 49(21): 2093-101.
- von Hundelshausen P, Petersen F, Brandt E. Platelet-derived chemokines in vascular biology. *Thromb Haemost* 2007; 97(5): 704-13.
- Matsumoto T, Mugishima H. Signal transduction via vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors and their roles in atherogenesis. *J Atheroscler Thromb* 2006; 13(3): 130-5.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9(6): 669-76.
- Haft JJ, Haik BJ, Goldstein JE, Brodyn NE. Development of significant coronary artery lesions in areas of minimal disease. A common mechanism for coronary disease progression. *Chest* 1988; 94(4): 731-6.
- Mann JM, Davies MJ. Vulnerable plaque. Relation of characteristics to degree of stenosis in human coronary arteries. *Circulation* 1996; 94(5): 928-31.
- Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995; 92(3): 657-71.

Dirección para correspondencia:

**Armando Tellez, MD**

Skirball Center for Cardiovascular Research  
Cardiovascular Research Foundation  
8 Corporate Dr., Orangeburg, NY, 10965  
Office: (845)580 3091, Fax: (845)359 5084  
E-mail: atellez@crf.org