

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



**EFFECTOS DE LA INHIBICIÓN NO SELECTIVA DE LOS
RECEPTORES DE ENDOTELINA (ETa Y ETb) EN LA
FORMACIÓN DE TEJIDO NEOINTIMAL TRAS
ANGIOPLASTIA CORONARIA EN UN MODELO PORCINO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Marcelo Sanmartín Fernández

Bajo la dirección de los doctores
Antonio Fernández Ortiz
Carlos Macaya de Miguel

Madrid, 2004

ISBN: 84-669-2135-4

T 28135

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5317309932

**EFFECTOS DE LA INHIBICIÓN NO
SELECTIVA DE LOS RECEPTORES DE
ENDOTELINA (ET_A Y ET_B) EN LA
FORMACIÓN DE TEJIDO NEOINTIMAL
TRAS ANGIOPLASTIA CORONARIA EN UN
MODELO PORCINO**

Marcelo Sanmartín Fernández

Directores:

Antonio Fernández Ortiz

Carlos Macaya de Miguel

Instituto Cardiovascular. Hospital Universitario San Carlos. Madrid.

Madrid. Octubre de 2002

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es el resultado del esfuerzo de varias personas que no solo intervinieron directamente en la realización de los experimentos y análisis de los resultados, sino también participaron de forma decisiva en mi formación profesional y orientación hacia la investigación.

- Al Dr. Panayotis Fantidis por la inestimable ayuda en la realización de los experimentos.
- A la Dra. Paloma Aragoncillo, responsable por el análisis histológico e inmunohistoquímica.
- Al Dr. Pablo González por la colaboración en el cuidado y manejo de los animales de experimentación.
- A la Dra. Cristina Fernández por la ayuda en el análisis estadístico de los datos.
- Al Dr. Raúl Castellanos por la revisión crítica del texto.

Muy especialmente,

- Al Dr. Antonio Fernández-Ortiz por el estímulo continuo y exhaustiva revisión de los datos y del manuscrito.
- Al Dr. Carlos Macaya, director de esta tesis, por la inestimable ayuda en mi formación como médico y estímulo a la investigación básica y clínica.
- Al Dr. Javier Goicolea por el apoyo incondicional ofrecido para la elaboración de esta tesis y por la confianza continua en mi trabajo.

ÍNDICE

<i>I. INTRODUCCIÓN</i>	6
1. Angioplastia y reestenosis coronaria: relevancia clínica	6
2. Fisiopatología de la reestenosis coronaria	11
2.1 Reparación vascular y reestenosis	11
2.2 Reestenosis tras implantación de stents	12
2.3 Reestenosis tras aterectomía	13
2.4 Mediadores biológicos	14
2.4.a) Formación de trombo	14
2.4.b) Respuesta inflamatoria	15
2.4.c) Proliferación celular y formación de la matriz extracelular	15
2.4.d) Remodelado vascular	16
3. Modelos experimentales de reestenosis	18
3.1 Estudios en ratas	18
3.2 Modelos en conejos	19
3.3 Modelo canino	19
3.4 Modelo porcino	20
3.5 Modelos de primates no humanos	21
3.6 Perspectiva general de los diferentes modelos experimentales	21
3.7 La aterectomía direccional como modelo experimental	23
4. Prevención de la reestenosis	28
4.1) Tratamiento farmacológico sistémico para el control de la reestenosis	28
4.1.a) Fármacos antitrombóticos	28
4.1.b) Fármacos antiinflamatorios	30
4.1.c) Inhibidores de factores de crecimiento	31

4.1.d) Otros fármacos de uso sistémico: hipolipemiantes, vasodilatadores	33
4.2) Tratamiento farmacológico local	36
4.3) Braquiterapia, Sonoterapia	39
5. Papel biológico de las endotelinas	40
5.1) Concepto y descripción de las endotelinas	40
5.1.a) Receptores para las endotelinas: ET _A y ET _B	43
5.1.b) Acciones cardiovasculares de la ET-1	43
5.1.c) Distribución de los receptores ET _A y ET _B en los tejidos	45
5.1.d) Endotelinas, aterogénesis e hiperplasia vascular	46
6. Antagonismo de los receptores de endotelina para la prevención de la reestenosis	48
7. Antagonismo de los receptores de endotelina con bosentán: efectos cardiovasculares	51
8. Antagonismo de los receptores de endotelina con bosentán: estudios experimentales y clínicos.	54
8.1) Bosentán en la hipertensión arterial sistémica	54
8.2) Bosentán en la insuficiencia cardíaca.	55
8.3) Bosentán en la hipertensión pulmonar primaria	57
8.4) Bosentán en la prevención del vasoespasm cerebral.	59
8.5) Bosentán en la prevención de la reestenosis	59
II. HIPÓTESIS	61
III. OBJETIVOS	62
IV. METODOLOGIA	63
1. Animales de experimentación	63
2. Estudio de eficacia del bosentán oral en el modelo porcino	63
3. Grupos de estudio	68

4. Aterectomía direccional en coronarias porcinas _____	69
5. Tratamiento local con el aterotomo direccional de Simpson _____	69
6. Procesamiento y análisis morfométrico de las muestras _____	72
7. Inmunohistoquímica para endotelina en la pared vascular _____	73
8. Análisis estadístico _____	74
V. RESULTADOS _____	75
1. Tamaño del vaso, grado de lesión y proliferación neointimal _____	75
2. Tratamiento con bosentán y proliferación neointimal _____	78
3. Inmunolocalización de la endotelina en la pared vascular. _____	82
VI. DISCUSIÓN _____	84
1. Aterectomía direccional y proliferación neointimal _____	84
2. Antagonismo de los receptores de endotelina y proliferación neointimal: estudios previos _____	86
3. Tratamiento local frente a tratamiento sistémico _____	88
4. Integración de los resultados en la fisiopatología de la reestenosis coronaria _____	89
5. Limitaciones del presente trabajo experimental _____	92
6. Implicaciones clínicas de nuestros resultados _____	93
VII. CONCLUSIONES _____	97
VIII. BIBLIOGRAFÍA _____	98

I. INTRODUCCIÓN

1. Angioplastia y reestenosis coronaria: relevancia clínica

En sus poco más de 25 años de existencia, la angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP) se ha convertido en una de las intervenciones terapéuticas más frecuentes de la medicina actual. La idea de dilatar las arterias por vía percutánea fue introducida por Dotter y Judkins en 1964.¹ Su método, aplicable a vasos periféricos, consistía en la introducción de catéteres progresivamente más gruesos a través de una estenosis, de modo que el orificio de entrada en la arteria era por lo menos igual al de la luz arterial conseguida. A pesar de que la técnica no llegó a ser ampliamente utilizada en la práctica, el concepto de conseguir resolver una obstrucción arterial sin la necesidad de cirugía sirvió para impulsar el desarrollo del balón de angioplastia a lo largo de los años siguientes. En 1977, Andreas R. Grüntzig realizó la primera angioplastia coronaria en un varón de 38 años con una estenosis única y focal en la arteria descendente anterior.² Los resultados en los primeros 50 pacientes no parecían prever el enorme impacto que la técnica tendría en el futuro: la tasa de éxito fue de 64%, con un 6% de infarto y con necesidad de cirugía de revascularización en 5 casos.³ Se estimó entonces que la dilatación percutánea podría ser utilizada en estenosis focales aisladas en el árbol coronario proximal y por lo tanto sería aplicable a un 15% de los pacientes con enfermedad coronaria.²

A lo largo de los años siguientes, el desarrollo de un sistema de balón de angioplastia guiado por un alambre-guía fino y flexible, permitió mejorar los resultados inmediatos de la ACTP. Conjuntamente con los avances en el material utilizado para la dilatación, la mejoría en la calidad de las imágenes y la aparición de los equipos de rayos X digitales impulsaron la ampliación de las indicaciones a estenosis más complejas y a pacientes con enfermedad de más de un vaso. Posteriormente, la ACTP pasó a tener un papel clave en el tratamiento de reperfusión del infarto agudo de miocardio y en el manejo de los síndromes

coronarios agudos sin elevación del segmento ST. La mejoría técnica progresiva del material y el aumento notable en la seguridad de los procedimientos con la introducción del stent son los principales responsables de la gran difusión experimentada por la técnica en estos últimos años.

En España el número de intervenciones coronarias ha crecido de manera exponencial en los últimos años: de los poco más de 3500 procedimientos registrados en el año 1990, se pasó a cerca de 27000 intervenciones en el año 2000.⁴ En la actualidad, de los pacientes sometidos a coronariografía casi un 40% se derivan a un procedimiento intervencionista percutáneo.⁴

A lo largo de estas dos décadas de intensa investigación y desarrollo, la ACTP ha estado marcada por dos tipos de complicaciones. La primera es la oclusión trombótica precoz y súbita de la arteria después de la dilatación, en muchos casos relacionada con la disección de la pared del vaso producida por el dispositivo de dilatación. La introducción de las prótesis intracoronarias o stents y la mejoría de las estrategias farmacológicas antiplaquetarias ha permitido reducir la incidencia de oclusión precoz a menos de 1% de los casos. La segunda limitación de la ACTP es la recidiva de la lesión estenótica, a veces de mayor severidad que la lesión original, fenómeno conocido como reestenosis. A pesar de que han sido muchos los avances técnicos que han permitido mejorar los resultados inmediatos de las intervenciones percutáneas, la reestenosis sigue ocurriendo en hasta un 20 a 30% de los pacientes.

Se han utilizado diferentes definiciones de reestenosis en los estudios clínicos (tabla 1). La que más frecuentemente se utiliza en la práctica cardiológica habitual es la presencia de una estenosis de 50% o más en el segmento tratado objetivada en una angiografía de seguimiento. De todos modos, más relevante para medir el impacto clínico de la reestenosis es la frecuencia con que se repite la revascularización sobre el mismo vaso, variable conocida como reestenosis clínica. Esta última es de 10 a 15% de una forma genérica, pero en algunas circunstancias como la angioplastia de más de un vaso, diabetes mellitus y arterias de pequeño calibre (<2,5 mm de diámetro) puede alcanzar hasta el 50%.

Tabla 1: Algunas definiciones de reestenosis basadas en la angiografía de seguimiento utilizadas en estudios clínicos.

Aumento de $\geq 30\%$ de la estenosis presente inmediatamente postangioplastia
Estenosis inmediata postangioplastia $< 50\%$ que aumenta a $> 70\%$ en el seguimiento
Aumento de la severidad de la estenosis a 10% más por debajo de la estenosis original
Pérdida de $> 50\%$ del aumento en el diámetro luminal postangioplastia
Presencia de estenosis $> 50\%$ en el seguimiento
Disminución del diámetro luminal mínimo $> 0,72$ mm, con respecto a la angiografía postangioplastia

En la búsqueda de mejores resultados y menores tasas de reestenosis, se han ido desarrollando otras formas alternativas o complementarias al balón de angioplastia para conseguir la dilatación coronaria (tabla 2). De modo esquemático estos dispositivos se pueden dividir en: (1) aquellos capaces de reducir la cantidad de material aterosclerótico, como los catéteres de aterectomía y el láser, y (2) las prótesis intracoronarias o stents.

La aterectomía direccional y la aterectomía rotacional han sido comparadas con el balón en diferentes ensayos clínicos.⁵⁻⁸ A pesar de que se experimentaron varias estrategias diferentes, más o menos agresivas en cuanto a la cantidad de tejido extraída, con o sin dilatación complementaria, no se consiguió demostrar una reducción en las complicaciones inmediatas o en las tasas de reestenosis. El láser excimer también se comparó con el balón convencional sin que se observara ventajas a medio-largo plazo.^{9,10}

El único instrumento de dilatación que ha demostrado beneficios convincentes comparado con la angioplastia con balón ha sido el stent, no solo por su papel en la reducción de la oclusión aguda tras angioplastia,¹¹⁻¹³ sino también con la demostración de mejores resultados a más largo plazo.¹⁴⁻²⁴ Cuando el stent se utiliza en lesiones relativamente cortas y en vasos grandes, la tasa de

reestenosis disminuye de un 30% a un 20%.¹⁴ Los datos favorables obtenidos y la facilidad en obtener un excelente resultado angiográfico explican la utilización rutinaria del stent en más de 80% de los procedimientos de revascularización percutánea coronaria hoy en día.

Tabla 2: Técnicas utilizadas en Intervencionismo Coronario para obtener un aumento de la luz arterial

<i>Ampliación de la luz por dilatación</i>
Balón convencional
Stent
Balón de corte
<i>Ampliación de la luz por retirada de tejido</i>
Aterectomía direccional
Aterectomía de rotación
Aterectomía de extracción
Aterectomía de retirada (“pull-back”)
Láser

No obstante, a pesar de los stents, la reestenosis no ha dejado de ser un problema. De hecho, la incidencia de reestenosis en lesiones no tan favorables como las incluidas en los ensayos clínicos puede ser mucho mayor que el 20% antes mencionado. Por otro lado, la reestenosis intrastent representa un nuevo subgrupo de lesiones de muy difícil solución desde el punto de vista de la revascularización percutánea. En estas situaciones, independiente del dispositivo de angioplastia utilizado, la tasa de recidiva puede superar el 50%.²⁵⁻²⁷

Afortunadamente, en la mayoría de los casos la reestenosis no se presenta como un cuadro clínico catastrófico. La clínica suele ser más bien progresiva y, aunque con frecuencia conlleva una disminución de la capacidad funcional del

individuo y se asocia a un ingreso hospitalario, el infarto de miocardio como manifestación de una lesión reestenótica es raro. El impacto económico es otro aspecto negativo de la reestenosis. Teniendo en cuenta las cerca de 27000 angioplastias realizadas en España en el año 2000 cabe esperar que de estos pacientes, unos 4000 precisen una segunda intervención percutánea o quirúrgica dentro de los primeros meses que siguen el procedimiento original. Al coste adicional que suponen estas reintervenciones habría que sumar los gastos originados por mayor necesidad de medicación, reingresos y baja laboral.

La investigación sobre la reestenosis tras la angioplastia coronaria es uno de los factores que más ha impulsado el desarrollo del tratamiento moderno de la cardiopatía isquémica. La aparición de nuevas técnicas o estrategias farmacológicas capaces de eliminar la reestenosis supondría un cambio revolucionario en el manejo de la enfermedad coronaria, de forma similar a como lo fue la introducción de la cirugía de revascularización coronaria o la propia angioplastia percutánea años atrás.



2. Fisiopatología de la reestenosis coronaria

2.1 Reparación vascular y reestenosis

Cuando se infla un balón de angioplastia en una arteria coronaria con enfermedad aterosclerótica se consigue un incremento de la luz arterial gracias a la distensión mecánica de toda la pared arterial, incluida la adventicia, y también debido a pequeñas roturas que se producen en la placa aterosclerótica, particularmente en la unión entre las estructuras más fibrosas o calcificadas y las más blandas de la pared de la arteria. En este contexto, la reestenosis se interpreta como la consecuencia final de una respuesta reparadora a esta agresión provocada por el balón o cualquier otro dispositivo de dilatación coronaria.

En el proceso de reestenosis tras angioplastia con balón se pueden distinguir tres componentes: 1) el retroceso elástico de la pared arterial tras la dilatación; 2) la proliferación anormal de células musculares lisas y formación de matriz extracelular; y 3) la constricción de la pared vascular o remodelado. Algunos minutos después de la distensión mecánica de la arteria con un balón de angioplastia se produce una pérdida en el área luminal debido a un fenómeno de retroceso elástico de la pared arterial. Esta pérdida puede alcanzar hasta un tercio del diámetro luminal que se había ganado con la dilatación pero no progresa más allá del primer día tras la intervención.²⁸

El segundo componente es la proliferación de un tejido nuevo, conocido como neointima, que ocupa las zonas de rotura o disección de la placa provocadas por el balón, y que a menudo crece de forma exagerada hacia la luz arterial, lo que tiende a reobstruirla. El análisis del tejido neointimal extraído mediante aterectomía direccional ha permitido demostrar que el principal componente celular de este tejido de reparación es la célula muscular lisa (CML)²⁹ La exposición de estructuras de la pared vascular al torrente circulatorio es el motor inicial del proceso de reparación, que implica la transformación y proliferación de CML desde la capa media de la arteria y síntesis de matriz extracelular.^{30,31} Por otro lado, recientemente se ha reconocido también una participación de los miofibroblastos de la adventicia en el proceso de formación

de la neointima.³²⁻³⁴ Estos fibroblastos son células diferenciadas que pueden contribuir también al proceso de constricción de la arteria tras la lesión producida por balón de angioplastia.³⁴

Algunos datos provenientes de diversos modelos animales y también de estudios clínicos permiten asegurar que la hiperplasia neointimal no es el único mecanismo de pérdida luminal tardía tras angioplastia coronaria. Un factor de igual o mayor importancia es un fallo en el aumento compensatorio del área vascular o directamente una constricción progresiva de la pared de la arteria.^{35,36} Este último proceso, conocido también como “remodelado negativo” o “constrictivo” puede explicar más del 50% de la pérdida luminal tardía cuando se hace una angioplastia con balón. Este mecanismo no participa en la reestenosis tras implantación de stents, situación en que prácticamente el único factor de pérdida luminal tardía es la proliferación de las CML.³⁷⁻³⁹

2.2 Reestenosis tras implantación de stents

El mecanismo de dilatación secundario a la implantación de los stents es la expansión de la circunferencia de todo el vaso, también con interrupciones de la placa. A diferencia de la angioplastia con balón, esta expansión es más simétrica y suele ser más extensa. La presencia de una estructura metálica apoyada en la íntima evita la reducción inmediata o tardía del área vascular total. En este sentido, el éxito de los stents reduciendo de forma significativa la incidencia de reestenosis postangioplastia se debe entender como la consecuencia de su efecto protector frente a dos de los mecanismos anteriormente descritos: el retroceso elástico y la constricción progresiva o remodelado negativo de la arteria.

En realidad, la respuesta de la pared arterial a la implantación de una prótesis intraluminal suele ser más extensa que aquella producida por la angioplastia con balón.⁴⁰ Además de la agresión producida por la dilatación del balón sobre el que van montados la mayoría de los stents, hay que considerar la agresión propia de la presencia de un dispositivo metálico enclavado en la pared arterial y en contacto con la sangre circulante. De hecho, los stents, lejos de lograr una reducción en la respuesta proliferativa de la célula muscular lisa, suelen exacerbar esta respuesta.¹⁴ Aún así, a pesar de un índice de pérdida luminal mayor

que el producido tras angioplastia con balón, los stents consiguen un mejor resultado tardío, fundamentalmente debido a una mayor ampliación de la luz en el momento de la dilatación.

Es importante resaltar que el mecanismo subyacente de la reestenosis tras la implantación de stents coronarios es casi exclusivamente la hiperplasia neointimal.³⁷⁻³⁹ En este sentido, cualquier estrategia mecánica o farmacológica propuesta para disminuir la reestenosis debe tener como objetivo la reducción de esta respuesta celular.

2.3 Reestenosis tras aterectomía

La utilización de los dispositivos de aterectomía busca la reducción del volumen de la placa como mecanismo de ampliación de la luz arterial. El aterotomo direccional es el más extensamente estudiado en el terreno clínico. Las observaciones obtenidas con ecografía intravascular sugieren que el aumento del volumen luminal tras aterectomía se debe a un doble componente de retirada de tejido y estiramiento o dilatación del vaso, probablemente por la modificación de la arquitectura del mismo.^{41,42}

En contraste con la angioplastia con balón, el retroceso elástico o pérdida luminal aguda suele ser menos importante en el caso de la aterectomía direccional.⁴³

Existen ciertas diferencias en el mecanismo de reducción progresiva de la luz tras aterectomía direccional en comparación con la angioplastia con balón. En el caso de la aterectomía direccional existe una participación más marcada del crecimiento de tejido neointimal en comparación con el papel relativo del remodelado.^{42,44} La proliferación neointimal parece estar estrechamente relacionada a la agresividad de la aterectomía, es decir, con la profundidad del corte en la pared arterial.⁴⁵ Por otro lado, en algunos estudios el remodelado constrictivo se apunta como el mecanismo más importante de reestenosis tras aterectomía.^{46,47} Estas aparentes discrepancias se podrían explicar por diferencias entre características basales de la placa⁴² o por diferentes estrategias de intervención seguidas, ya que en algunos casos la retirada de tejido es mínima y se efectúa una dilatación con balón para conseguir un resultado final adecuado.

2.4 Mediadores biológicos

Entendida la angioplastia como una forma de lesión vascular y la reestenosis como la consecuencia de una serie de mecanismos de respuesta a esta lesión, el proceso de reparación sigue diversos pasos biológicos que parecen comunes a todos los dispositivos utilizados en las intervenciones percutáneas. Dicho proceso tiene varias similitudes con el fenómeno de aterosclerosis, que también es el producto de una respuesta combinada a una lesión vascular, esto sí, inducida de forma mucho más lenta y prolongada. La respuesta biológica al daño producido sobre la pared arterial incluye la formación de trombo, la actividad de mediadores de inflamación, seguida de una intensa proliferación celular y formación de una matriz extracelular. Por último, el resultado final de esta serie de factores es la formación de un tejido de reparación, combinado o no con cambios en la geometría circunferencial del vaso.

2.4.a) Formación de trombo

El proceso de reparación vascular se inicia con la activación de la coagulación y con la adhesión-agregación plaquetaria.^{48,49} La denudación del endotelio y exposición de las estructuras subendoteliales a la sangre promueve la activación, adhesión y agregación de plaquetas, que tiene como consecuencia la liberación de una serie de sustancias de su interior con propiedades vasoconstrictoras y mitogénicas, como tromboxano A₂, serotonina, y varios factores de crecimiento. Estos factores de crecimiento, en especial el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), pero también el factor de crecimiento tisular beta (TGF- β), el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), junto con la interleuquina-1, son los iniciadores de la transformación, migración y proliferación de las CML desde la capa media hacia la íntima, que culmina con la formación del tejido neointimal. Las plaquetas activadas también aceleran la producción de trombina, que a su vez es un importante activador plaquetario y también tiene propiedades mitogénicas para las CML.⁵⁰

2.4.b) Respuesta inflamatoria

Una segunda fase en la respuesta natural a la lesión vascular, sea esta inducida por dilatación con balón, stents o aterectomía, tiene relación con una intensa actividad inflamatoria.^{51,52} Dicha respuesta inflamatoria incluye la participación de células mononucleares y polimorfonucleares que se adhieren a la superficie intimal poco después de la lesión. La activación de estas células es capaz de potenciar la agregación plaquetaria y también tiene un papel en la secreción de mediadores bioquímicos con propiedades mitogénicas y de quimioatracción. La importancia de estos mediadores queda ratificada por estudios que utilizan anticuerpos contra proteínas específicas de los macrófagos. Dichos anticuerpos son capaces de reducir la respuesta neointimal que se origina tras el daño inducido en carótidas de ratas.⁵³

2.4.c) Proliferación celular y formación de la matriz extracelular

Una vez producido el daño sobre la estructura vascular y constituida la reacción trombótica inicial, se liberan una serie de mediadores a nivel local que promueven la activación de CML en la capa media de la arteria. Las CML pasan a proliferar, migrar hacia la zona de lesión, y además fabricar componentes de la nueva matriz extracelular. La transformación de las CML se debe en última instancia a la activación de determinados oncogenes (c-fos, c-jun, c-myc), y es ya evidente en las primeras horas después de la lesión experimental.⁵² Además de las plaquetas, otros grupos celulares son fuente potencial de factores de crecimiento, como las células endoteliales, macrófagos y las propias células musculares lisas transformadas.

Los factores de crecimiento liberados por plaquetas, células inflamatorias y CML no actúan de forma aislada, sino bajo una compleja interacción sinérgica con algunos factores hormonales, como por ejemplo el eje renina-angiotensina-aldosterona, serotonina, vasopresina y las endotelinas.⁵²

En modelos experimentales, la proliferación de CML es ya evidente 24 horas después de la lesión vascular y se continúa durante al menos 2 semanas. La cantidad de neointima que se acumula después de este periodo guarda relación con la síntesis de matriz extracelular por las CML modificadas. De hecho, dicha

matriz representa la mayor parte del volumen del tejido neointimal.⁵⁴ Después del segundo o tercer mes de la lesión inicial, las CML pasan a un fenotipo contráctil y el proceso de creación del tejido de reparación se frena.⁵⁵ Por otro lado, la matriz extracelular no es un componente biológicamente inerte del tejido neointimal. Los constituyentes de la matriz, como por ejemplo la fibronectina y la vitronectina, pueden facilitar la migración de las CML mediante la interacción con moléculas de adhesión (integrinas) expresadas en la pared de las CML activadas.⁵⁶

El trauma mecánico inducido sobre la pared guarda una relación directa con el grado de formación de tejido neointimal. A nivel experimental, la denudación endotelial sin daño de la lámina elástica interna o de la capa media conlleva una respuesta neointimal mínima.⁵⁷ En cambio, la respuesta es intensa cuando se produce rotura de la lámina elástica interna y lesión evidente sobre la capa media.⁵⁸ El daño directo de la media parece funcionar por lo tanto como un factor amplificador de la activación y proliferación de las CML y es un elemento esencial en cualquier modelo experimental de reestenosis.

2.4.d) Remodelado vascular

El crecimiento exagerado de un tejido de reparación no es el único mecanismo responsable de la reestenosis. En realidad, los estudios en humanos con ecografía intravascular después de una angioplastia con balón, han sugerido que el principal factor de pérdida luminal tardía es la reducción en el calibre total del vaso.^{36,44} La reducción en el tamaño de los vasos como respuesta a determinados estímulos es un concepto trasladado del estudio de la arteriosclerosis y acuñado como remodelado. La forma más habitual de remodelado es el aumento del tamaño del vaso como una adaptación al crecimiento de tejido en la pared (remodelado positivo o excéntrico). Dichos cambios fueron descritos inicialmente en humanos por Mann y cols⁵⁹ en 1972. Glagov y cols⁶⁰ ampliaron este concepto en un estudio retrospectivo en 136 autopsias que documentó el mantenimiento de la luz arterial a pesar del incremento en el volumen de placa aterosclerótica gracias a un crecimiento global del área vascular. Solamente cuando el volumen de placa superaba el 40% del área contenida en la lámina elástica interna se producía una disminución en la luz

del vaso. A lo largo de los últimos años, el concepto de remodelado se ha ampliado y se utiliza para definir cambios en el tamaño global de los vasos, tanto en el sentido descrito inicialmente como favorable o compensador, que tiende a preservar la luz arterial, como en el sentido desfavorable o patológico que contribuye a la obstrucción, conjuntamente con la formación de tejido aterosclerótico, o en este caso reestenótico.

Se conoce poco sobre los mecanismos que regulan el cambio en la geometría de los vasos como respuesta a una agresión. En el caso del remodelado compensador podría ser la consecuencia final de los cambios muy lentos en el estrés de corte inducidos por el crecimiento hacia la luz. Este crecimiento produciría un aumento del flujo en contacto con la pared luminal que dispararía determinados cambios en la estructura de soporte de la matriz extracelular en el sentido de preservar el estrés de corte en la íntima.⁶⁰ El remodelado constrictivo, por otro lado, debe estar en relación con la mayor acumulación de colágeno y elastina en la matriz extracelular a medida en que la respuesta celular reparativa cede y la matriz extracelular se reorganiza pocas semanas después de la lesión.⁶¹

La adventicia es un anillo de tejido que circunda el vaso en su pared externa. Recientemente se ha reconocido que los cambios en la adventicia después de una angioplastia pueden desempeñar un papel relevante en la pérdida luminal tardía, sobre todo en lo relacionado al remodelado constrictivo. Algunos estudios realizados en el modelo porcino de lesión coronaria sugieren que la respuesta celular de la adventicia puede exceder la respuesta de la capa media.^{32,62} La actividad proliferativa es máxima en el 3º día después de la lesión y se reduce a partir del 14º día. El fenotipo de los fibroblastos de la adventicia cambia y estas células pasan a expresar proteínas propias de las CML como la alfa-actina. A los 28 días de la lesión, la hipercelularidad de la adventicia disminuye y una cicatriz densa y rica en colágeno es ya evidente. En resumen, los cambios en la adventicia producidos por el daño a la capa media de la arteria se caracterizan por proliferación celular, formación de miofibroblastos y una importante reacción fibrótica secundaria a la acumulación de matriz rica en colágeno. Dichos cambios tienen un papel clave en la pérdida luminal progresiva después de una angioplastia.

3. Modelos experimentales de reestenosis

El estudio de los mecanismos y la prevención de la reestenosis en el terreno clínico presenta algunas dificultades prácticas importantes. En primer lugar, la realización de controles angiográficos rutinarios en pacientes que en su mayoría están asintomáticos y sin datos funcionales de isquemia, conlleva riesgos innecesarios. Por otro lado, la elección de puntos finales exclusivamente clínicos, como la recidiva de los síntomas o la necesidad de nueva revascularización del vaso tratado, obliga a un muestreo muy grande, lo que aumenta la complejidad y los costes de los ensayos. Además, en los estudios clínicos no se dispone normalmente de material histológico para su análisis, siendo esto solo posible cuando se utiliza aterectomía direccional o de extracción. Pero la limitación más importante, sin duda, es, como en cualquier ensayo clínico, la exposición de pacientes a los posibles efectos adversos de un fármaco que todavía no ha demostrado su eficacia desde el punto de vista terapéutico. Por todo ello, una etapa preclínica en modelos animales de lesión arterial es fundamental tanto para el estudio de la fisiopatología, cuanto para la evaluación de las dianas terapéuticas potenciales. No obstante, es esencial reconocer y comprender las limitaciones de los estudios de experimentación animal antes de extrapolar directamente los resultados a la práctica clínica.

En el estudio de la respuesta celular a la lesión se han empleado varias especies animales incluyendo ratas, conejos, perros, cerdos y primates. Todos los modelos exhiben cierta analogía con el modelo humano de angioplastia, pero cada uno de ellos tiene sus ventajas y limitaciones y todos distan de la perfección.

3.1 Estudios en ratas

Este fue el primer modelo diseñado para el estudio de la lesión vascular. Inicialmente se empleó para estudiar la proliferación celular en relación con la aterosclerosis y es anterior al desarrollo de la angioplastia coronaria. Habitualmente el daño o lesión vascular se induce en la arteria carótida con un catéter Fogarty introducido quirúrgicamente.⁶³ Típicamente, los efectos sobre la arteria se evalúan a las dos semanas del procedimiento. La extensión del daño se

limita a una denudación del endotelio vascular. Entre las ventajas de este modelo figuran su facilidad de aplicación y rapidez del análisis, además del bajo coste. De hecho, la mayoría de los estudios iniciales sobre la proliferación de CML se han realizado en este modelo experimental. Sin embargo, este tipo de daño es diferente del producido durante una angioplastia, ya que el balón de Fogarty dilata o distiende la arteria a una presión mucho más baja que el balón de angioplastia e induce un daño limitado a la íntima, sin rotura de la capa media del vaso. Además la lesión se produce sobre una arteria que tiene propiedades diferentes a las coronarias, que son arterias con mayor componente muscular. Algunos fracasos importantes de ensayos clínicos de fármacos frente a la reestenosis estaban basados en resultados positivos previos en este modelo experimental murino.^{64,65}

3.2 Modelos en conejos

El modelo de lesión vascular en conejos habitualmente se basa en una doble lesión. La lesión inicial suele ser la denudación endotelial con balón de angioplastia en la arteria ilíaca. Esta abrasión se complementa con una dieta aterogénica con alto contenido de colesterol. Se forma así una lesión angiográficamente definible y después de algunas semanas se realiza una angioplastia bajo control fluoroscópico en esta zona de estenosis. Esta maniobra prácticamente garantiza la reestenosis del segmento dilatado, que se analiza histológicamente cuatro semanas después. Los aspectos más positivos de este modelo están en la similitud de los componentes de la lesión con los de la angioplastia en humanos: existe disección de la media, formación de trombo y además el tejido de reparación contiene CML, células inflamatorias y desarrollo de una matriz extracelular similar a la observada en humanos. Sin embargo, aunque el modelo es más cercano a la reestenosis humana que el descrito en ratones, persisten las diferencias en cuanto al tipo de arteria abordada y sobre todo en cuanto a algunas de las características biológicas del tejido neointimal, como la mayor presencia de células espumosas en este modelo experimental.⁶⁶

3.3 Modelo canino

Este modelo se ha utilizado sobre todo para probar dispositivos de intervencionismo nuevos, dada la similitud con la anatomía coronaria humana. Sin

embargo, la reacción de la pared coronaria a la lesión con balón o stent suele provocar una respuesta neointimal muy leve que resulta poco apropiada para la evaluación de diferentes fármacos frente a la reestenosis.

3.4 Modelo porcino

El modelo porcino permite la inducción de lesiones en varios puntos del árbol vascular, incluyendo las arterias coronarias, ilíacas y carótidas. La anatomía coronaria es también muy similar a la humana, con importantes ventajas respecto al modelo canino, como es el que la respuesta trombótica y proliferativa es más cercana al modelo clínico. La forma más frecuente de inducir la lesión ha sido la sobredilatación con balón de angioplastia, aunque en los últimos años se viene utilizando el stent sobredimensionado con mayor frecuencia. Algunas semanas después de la lesión el animal es sacrificado y se analizan histológicamente los segmentos lesionados. Una importante dificultad para estudios a más largo plazo es el gran incremento de peso que experimentan estos animales en un período de tiempo relativamente corto (pocos meses). En contraste con el modelo de doble lesión en conejos, en el cerdo no se suele inducir aterogénesis con una dieta rica en colesterol ya que es necesario un tiempo muy prolongado para inducir este tipo de lesiones.⁶⁶ Si bien es factible actuar en modelos porcinos con un modelo de doble lesión, por ejemplo induciendo una lesión con balón o radiofrecuencia y algunas semanas más tarde aplicando una nueva dilatación o implantación de stent, no se suele utilizar esta aproximación por el alto coste y nuevamente por las limitaciones de tiempo.

Tanto si se utiliza el balón solamente, como si el modelo utilizado es el del stent o aterectomía, es necesario que exista una fractura de alguna de las diferentes capas de la arteria para lograr una respuesta neointimal fácilmente cuantificable.^{67,68} En particular, la cantidad de tejido neointimal formado se correlaciona con la severidad del daño a la lámina elástica externa.⁶⁹ En el caso específico de los stents, los cambios crónicos en el estrés de corte y la presencia de una superficie metálica en contacto con la sangre funcionan también como estímulos adicionales para la proliferación neointimal.⁶⁸ Todo esto guarda una importante similitud con el modelo clínico, lo que hace que el cerdo sea el animal

más idóneo para estudios de nuevas estrategias antireestenosis. La principal limitación está en el hecho de actuar sobre un segmento sano de arteria, muy diferente del sustrato de base presente en los pacientes sometidos a intervención coronaria percutánea.

3.5 Modelos de primates no humanos

Estos animales son los más parecidos a la especie humana. Es posible inducir lesiones ateroscleróticas mediante una dieta rica en colesterol, pero tardan varios meses o años en desarrollar lesiones.⁷⁰⁻⁷² Una vez desarrolladas sería posible tratarlas con balón, aterectomía o stents, pero el alto coste y las dificultades de manejo de estos animales hacen impracticable utilizar este tipo de modelo para el estudio experimental de la reestenosis.

3.6 Perspectiva general de los diferentes modelos experimentales

A pesar de la aceptación de los estudios animales *in vivo* para el estudio de la aterosclerosis y de la reestenosis, es relativamente frecuente encontrar disparidad entre lo observado en ciertos modelos experimentales y la práctica clínica rutinaria.⁷³ Estas discrepancias pueden deberse a muy diversas razones, entre ellas la frecuente elección de modelos experimentales inapropiados.

Existe una considerable variabilidad entre los modelos disponibles con respecto al grado de respuesta neointimal.^{66,67,73-76} Esta respuesta varía en función del tipo de animal estudiado, así como del grado de lesión arterial provocada y tipo de vaso escogido. Por ejemplo, la denudación endotelial es generalmente suficiente para inducir una reacción neointimal en las carótidas, aorta e ilíacas de la rata o conejo. Sin embargo, el grado de lesión debe ser sustancialmente mayor, con rotura de la lámina elástica interna, en modelos de animales grandes, como el canino y el porcino para lograr proliferaciones neointimales significativas, esto mismo parece suceder en los pacientes tratados con angioplastia. En este aspecto se puede encontrar una cierta analogía con los hallazgos clínicos, ya que un grado mayor de lesión arterial inducida por la angioplastia también se asocia a una mayor pérdida luminal en el seguimiento.⁷⁷ Otra diferencia entre las especies animales está en la participación de la trombosis mural en el modelo. Ésta es poco

evidente en el modelo de animales pequeños pero tiene una gran relevancia en la respuesta neointimal del cerdo,⁶⁶ y probablemente también en el humano.

Las diferencias estructurales entre la pared vascular de las arterias periféricas y de las coronarias son otro factor a tener en cuenta. Extrapolar las conclusiones obtenidas con estudios en arterias iliaca, carótida o aorta al modelo de reestenosis coronaria puede no ser correcto. Estas últimas son arterias musculares, con un contenido distinto de elastina y un origen filogenético de las células musculares lisas diferente al de los grandes vasos. Asimismo, el grosor de la íntima varía y es en general mucho más fina en animales pequeños. Las arterias coronarias del cerdo se aproximan en tamaño y presentan características morfológicas muy similares a las humanas, por lo que son consideradas por muchos expertos como los más apropiados para el estudio experimental de la reestenosis postangioplastia coronaria. La principal limitación en el modelo porcino, ya mencionada previamente, radica en el hecho de que normalmente se induce la lesión sobre segmentos arteriales sanos.

En cuanto al método utilizado para provocar la lesión arterial existen considerables diferencias entre las distintas técnicas disponibles. La sobredilatación con balón es sin duda la más sencilla técnicamente y la de más bajo coste. Pero en la práctica el efecto de la dilatación sobre la pared vascular suele no ser uniforme provocando variabilidad entre diferentes animales en un mismo grupo de estudio. Es decir, utilizando la misma relación balón/arteria en ocasiones se logrará inducir daño hasta la adventicia de la arteria con una respuesta reparadora adecuada para el análisis y sin embargo en otros casos el daño estará limitado a la íntima y el volumen de tejido neointimal será escaso para valorar el efecto de cualquier intervención terapéutica.

La colocación de un stent sobredimensionado para el tamaño del vaso prácticamente garantiza la formación de tejido neointimal, aunque muchas veces el volumen de tejido es relativamente pequeño. Al no permitir el remodelado constrictivo de la arteria, el único mecanismo de reestenosis en esta situación es la proliferación de tejido neointimal, lo que restringe la actuación experimental a la observación de los efectos sobre este último mecanismo de pérdida luminal. Esto no representa necesariamente una limitación porque los stents son los dispositivos

utilizados en la mayoría de los procedimientos de intervencionismo actual, lo que además ofrece la posibilidad de utilizar una herramienta muy cercana al terreno clínico. La implantación de stents como modelo de lesión experimental tiene, no obstante, el inconveniente del coste, ya que solo se puede utilizar una unidad para cada segmento arterial a estudiar. Además, se hace necesaria la disponibilidad de técnicas especiales para el corte histológico de la arteria por la presencia de la estructura metálica del stent en la pared vascular.

3.7 La aterectomía direccional como modelo experimental

En el presente estudio se utiliza la aterectomía direccional para la inducción del daño arterial. La aterectomía direccional se basa en la extracción de parte del tejido arterial mediante el paso de una cuchilla de formato esférico que gira a gran velocidad en el interior de una superficie cilíndrica de metal, que está parcialmente abierta para permitir el contacto de la cuchilla con el tejido (figura 1). La particularidad de esta forma de aterectomía es su capacidad de realizar un corte excéntrico en la arteria y no circunferencial como los demás. El dispositivo lleva incorporado en el extremo opuesto al de la cuchilla un pequeño balón que, una vez inflado, sirve para empujar el catéter hacia la pared contralateral de la arteria. Los restos del tejido cortado quedan atrapados en una estructura cónica acoplada al extremo más distal del catéter. La aterectomía direccional es muy conocida en la práctica intervencionista y en la actualidad se sigue utilizando en determinadas situaciones como el tratamiento de lesiones en bifurcación.⁷⁸⁻⁸¹

La realización de un corte de tamaño uniforme en la pared arterial garantiza el daño en la lámina elástica interna y de parte de la capa media en prácticamente todos los segmentos abordados. Para que se produzca este corte en la pared, no obstante, es necesario que se utilice una relación adecuada entre el tamaño del dispositivo y el diámetro de la arteria. Si el corte es profundo y el daño se extiende a la adventicia, como ocurre en determinados casos en la práctica clínica, la reacción vascular resultante es muy intensa.⁴⁵ A diferencia del modelo de balón, que produce disrupciones localizadas de la capa media, muy dependiente de la elasticidad del tejido, el daño con la aterectomía es más

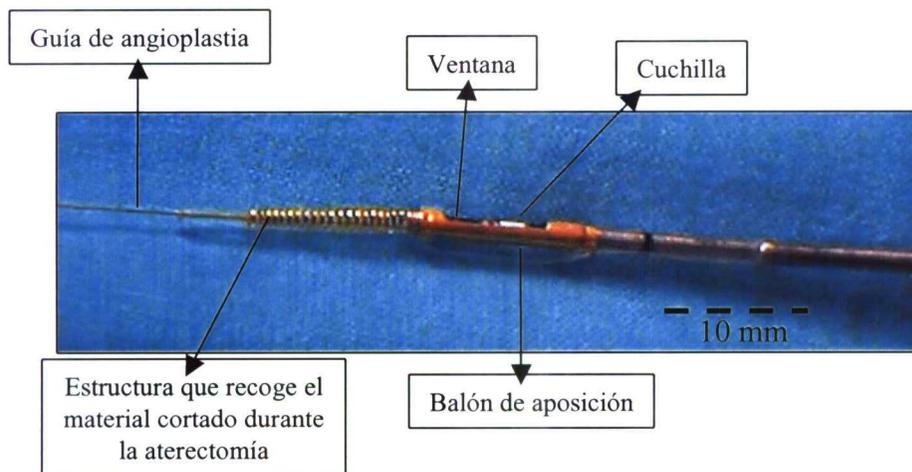
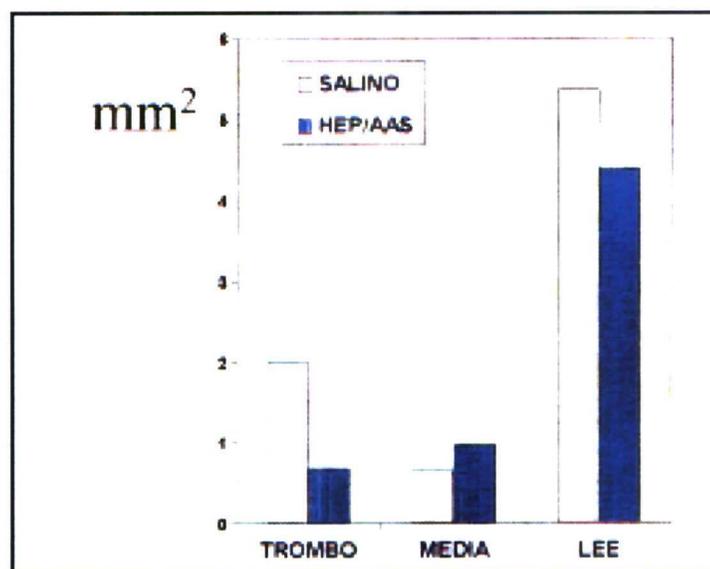


Figura 1: Detalle del extremo distal del aterotomo de Simpson.

controlado y localizado y, al menos desde el punto de vista teórico, podría dar lugar a resultados más reproducibles.

Una ventaja de la aterectomía direccional como modelo experimental de lesión coronaria en comparación con la angioplastia con balón podría ser la disponibilidad del dispositivo como vehículo de liberación local de fármacos. Durante el inflado del balón del aterotomo, la apertura o ventana del dispositivo queda en contacto directo con la pared arterial y de este modo se puede utilizar la luz interna del catéter para la instilación de drogas con potencial antiproliferativo en el sitio exacto de la lesión vascular. Este recurso técnico se ha tenido en cuenta a la hora de elegir el modelo experimental de lesión coronaria del presente proyecto. Es importante reseñar que la utilización del aterotomo como técnica de tratamiento local había sido ensayada en un estudio previo realizado por nuestro grupo.⁸² Se demostró que la administración local a través del aterotomo de una solución con elevadas concentraciones de heparina (1500 UI) y de aspirina (135 mg) inmediatamente después de la lesión vascular lograba una inhibición significativa de la respuesta trombótica que sigue a la angioplastia coronaria (figura 2).

De forma análoga a los demás modelos de lesión vascular, con la aterectomía direccional se ha demostrado una relación directa entre la profundidad y extensión del corte y el grado de respuesta neointimal.⁸¹ La secuencia de eventos disparados por la agresión vascular y la respuesta celular obtenida es también equiparable al modelo de balón o stents sobredimensionados. Gonschior y cols⁴⁵ estudiaron 200 segmentos de arterias femorales y carótidas de cerdos domésticos sometidas a una aterectomía direccional (dispositivo idéntico al utilizado en este trabajo). Las muestras fueron preparadas en diferentes momentos de la evolución tras la lesión y los animales fueron divididos en tres grupos de acuerdo con la profundidad del corte: afectación solamente de la íntima, lesión de la capa media y lesión hasta la adventicia. En los segmentos arteriales con lesión limitada a la íntima apenas había proliferación neointimal y ésta se limitaba prácticamente a la zona donde se había apoyado el balón. En cambio, cuando había daño de la capa media y de la lámina elástica externa se objetivaba una intensa reacción polimorfonuclear y mioproliferativa. Los cambios morfológicos



Tto. Local	n	Área trombo (mm ²)	Área media (mm ²)	Área LEE (mm ²)
Heparina/AAS	16	0,68 ± 0,89	0,97 ± 0,96	4,38 ± 1,85
Salino	16	2,00 ± 2,28	0,65 ± 0,37	5,37 ± 1,82
p		< 0,05	0,23	0,16

Figura 2: Efectos de la administración local de heparina y aspirina a través del aterotomo de Simpson sobre la formación de trombo y sobre el área de la media y área de la lámina elástica externa (LEE). Se observó una reducción significativa del área de trombo.

producidos después de la aterectomía tiene varias similitudes con los modelos de lesión producida por balón o stent: agregación plaquetaria y formación de trombo a las pocas horas del daño vascular, reacción inflamatoria con infiltración de células polimorfonucleares, monocitos y macrófagos y formación de un tejido de reparación compuesto por CML modificadas.⁸¹

En resumen, la aterectomía direccional en arterias coronarias porcinas parece adecuada como modelo experimental de lesión vascular y puede utilizarse en estudios de intervención farmacológica para la reestenosis. Con respecto a la elección de la aterectomía direccional como forma de inducir el daño vascular en este trabajo, se han tenido en cuenta algunas ventajas potenciales de esta técnica:

- 1) la posibilidad de inducir un daño arterial más controlado y homogéneo entre los grupos de estudio que con la técnica del balón de angioplastia sobredimensionado;
- 2) la presencia de un tejido de reparación fácilmente delimitado y cuantificable;
- 3) la posibilidad de utilizar el mismo catéter de aterectomía como instrumento de instilación local del fármaco;
- 4) el menor coste en comparación con los stents, ya que un mismo dispositivo de aterectomía podría servir para varios segmentos arteriales en animales diferentes;
- 5) la experiencia previa de nuestro grupo con esta técnica.

4. Prevención de la reestenosis

4.1) Tratamiento farmacológico sistémico para el control de la reestenosis

El control farmacológico de la reestenosis ha sido el objetivo más frecuentemente perseguido por los cardiólogos intervencionistas desde la introducción de la angioplastia coronaria. Sin embargo, hasta ahora no se ha conseguido encontrar ninguna estrategia farmacológica de uso sistémico con impacto suficiente sobre la reestenosis que apoye su utilización habitual en el terreno clínico.

Se han probado numerosos fármacos en modelos experimentales y clínicos, incluyendo agentes antitrombóticos, antiinflamatorios, antineoplásicos, inmunosupresores, inhibidores directos o indirectos de factores mitogénicos, fármacos hipolipemiantes y terapia génica. Muchos de estos estudios no han avanzado más allá de la fase preclínica de ensayo en modelos animales. En otros, los resultados positivos en modelos experimentales o en ensayos clínicos pequeños no se han visto luego confirmados por estudios clínicos más apropiados.⁸³⁻⁸⁷ La tabla 3 ofrece una lista de varios de los diferentes grupos farmacológicos hasta ahora ensayados. Gran parte de estos agentes presentan excesiva toxicidad para su utilización por vía sistémica, como por ejemplo los inmunosupresores o antineoplásicos, y han sido probados únicamente en alguna forma de tratamiento local. A continuación se resumen los hallazgos más relevantes con los principales grupos farmacológicos probados por vía sistémica en la investigación contra la reestenosis.

4.1.a) Fármacos antitrombóticos

Dado el importante papel de las plaquetas y de la formación de trombo en los estadios iniciales del proceso de reparación vascular tras la angioplastia es fácil entender porque la atenuación de la acción de las plaquetas o de la trombina ha sido objeto de varios estudios.

La aspirina es parte del tratamiento rutinario de los pacientes sometidos a intervenciones vasculares percutáneas por su eficacia contra la oclusión precoz del vaso.^{88,89} No obstante, a pesar de alguna evidencia positiva en un modelo experimental en conejos,⁹⁰ su utilización no parece reducir la incidencia de reestenosis según los resultados de los estudios clínicos realizados.^{91,92}

Otros antiagregantes plaquetarios más potentes que la aspirina, como los bloqueantes específicos de los receptores de tromboxano A₂, el vapiprost o el sulotroban, también fracasaron en demostrar reducción de la reestenosis angiográfica después de una angioplastia.^{93,94} La prostaciclina que es un vasodilatador y antiagregante plaquetario natural producido por las células endoteliales ha sido valorado en dos ensayos clínicos con resultados igualmente negativos.^{95,96} No obstante, un estudio con un análogo de la prostaciclina, el ciprostone, sí encontró una reducción significativa de eventos adversos que pudieron estar relacionados con la reestenosis (revascularización coronaria repetida, infarto o muerte)⁹⁷ pero lamentablemente este fármaco no ha sido evaluado en otros ensayos más robustos y con seguimiento angiográfico que demostrara la reducción de la incidencia de reestenosis.

Otras drogas antitrombóticas de uso frecuente en combinación con la aspirina para prevenir las complicaciones agudas tras la angioplastia también han sido evaluadas para la reestenosis. La ticlopidina se utiliza durante las primeras semanas después de la implantación de un stent o en algunos casos en sustitución a la aspirina. A pesar de su papel en la prevención de la trombosis subaguda del stent,⁹⁸ diversos ensayos clínicos muestran que es ineficaz en la prevención de la reestenosis postangioplastia.⁹⁹⁻¹⁰¹ Se ha explorado también el papel antiproliferativo de la heparina sobre la respuesta postangioplastia. La heparina que in vitro tiene una acción directa, no dependiente de su acción antitrombótica, sobre las CML inhibiendo la síntesis de DNA y RNA,^{102,103} ha demostrado ausencia de beneficios sobre la tasa de reestenosis en un ensayo clínico aleatorizado con un tratamiento más prolongado que el habitual después de una angioplastia.¹⁰⁴ Otros ensayos clínicos también han demostrado la ineficacia de heparinas de bajo peso molecular, como la enoxaparina y la reviparina,^{105,106} y de inhibidores directos de la trombina como la hirudina.¹⁰⁷

La potente acción antiplaquetaria del abciximab, un anticuerpo monoclonal dirigido contra los receptores IIb/IIIa de las plaquetas, llevó a la realización de un importante ensayo clínico para valorar su papel en la reducción de las complicaciones inmediatas derivadas de la ACTP.¹⁰⁸ El estudio incluyó a casi tres mil pacientes aleatorizados a recibir abciximab o placebo y demostró una reducción significativa de los eventos isquémicos tras la intervención con este fármaco, así como un beneficio inesperado sobre la tasa de revascularización repetida a los 6 meses (reducción de 26%). Estos datos motivaron la realización de otro estudio que analizó específicamente el aspecto de la reestenosis utilizando ecografía intravascular y que demostró la ineficacia del abciximab para prevenir la reestenosis.⁸⁵ Otros antagonistas de las glicoproteínas IIb/IIIa, como el eptifibatide y el tirofiban también demostraron resultados favorables en cuanto a la reducción de complicaciones isquémicas tras las intervenciones coronarias percutáneas, pero ningún efecto sobre la reestenosis.¹⁰⁹

4.1.b) Fármacos antiinflamatorios

Tratando de inhibir la participación de las células inflamatorias en la respuesta a la lesión, se ha estudiado el valor de los corticoesteroides en la prevención de la reestenosis. Los resultados de los ensayos clínicos demuestran la ausencia de beneficios con la metilprednisolona administrada por vía intravenosa un día antes de la ACTP.^{110,111} El uso más prolongado de esteroides no ha sido evaluado.

El tranilast, un fármaco con actividad antiinflamatoria y capacidad demostrada para inhibir la proliferación de CML y formación de matriz extracelular,¹¹² ha sido estudiado en el mayor ensayo clínico aleatorizado para la prevención de reestenosis realizado hasta el momento (ensayo “*Prevention of Restenosis with Tranilast and its Outcome*” o “PRESTO”).⁸⁷ En este estudio 11500 pacientes fueron asignados de forma aleatoria a recibir 600 o 900 mg de tranilast durante 1 o 3 meses, o placebo, y seguidos por un año después de la intervención coronaria. Los resultados del ensayo fueron negativos mostrando ausencia de beneficio clínico o sobre la incidencia de reestenosis angiográfica.

Previamente, esta droga había sido probada con éxito en modelos experimentales^{113,114} e incluso en un ensayo clínico más pequeño.¹¹⁵

4.1.c) Inhibidores de factores de crecimiento

En la respuesta postangioplastia, el diálogo entre CML, plaquetas activadas y células inflamatorias se efectúa mediante una serie de mediadores bioquímicos, algunos de ellos conocidos como factores de crecimiento. Uno de los más importantes es el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF – “*platelet derived growth factor*”-), liberado por las plaquetas, células endoteliales, monocitos y las propias CML, que funciona como un potente estímulo de quimioatracción y mitogénico para las CML. Algunos estudios en modelos experimentales sugieren que se puede conseguir una reducción de la respuesta reparadora tras la lesión vascular con la inhibición del PDGF mediante anticuerpos policlonales¹¹⁶ o con trapidil.¹¹⁷ El trapidil fue evaluado en dos ensayos clínicos con resultados muy prometedores.^{118,119} En el “*Studio Trapidil versus Aspirina nella Restenosi Coronarica*” (STARC), 384 pacientes sometidos a intervención coronaria percutánea fueron aleatorizados a recibir trapidil o placebo y evaluados con angiografía a los 6 meses.¹¹⁹ En los 254 pacientes que pudieron ser evaluados, la reestenosis ocurrió en 24,2% de los pacientes que tomaron trapidil y en 39,7% en el grupo placebo ($p < 0,01$). Sin embargo, más tarde, la eficacia antiproliferativa del trapidil no pudo ser comprobada en otros dos ensayos clínicos.^{120,121}

La angiopeptina es un análogo sintético de la somatostatina capaz de inhibir la secreción hipofisaria de la hormona de crecimiento y de disminuir la formación del factor de crecimiento similar a la insulina (“*insulin-like growth factor*” o IGF-1).¹²² La angiopeptina demostró ser un inhibidor de la proliferación neointimal en modelos animales de reestenosis¹²³ y también fue objeto de evaluación en ensayos clínicos. Después de resultados prometedores en un estudio escandinavo con 112 pacientes,¹²⁴ la evidencia en otros ensayos clínicos de mayor tamaño es contraria a la eficacia de la angiopeptina como atenuador de la reestenosis postACTP.^{125,126} Recientemente se ha probado también la angiopeptina en una forma de liberación local utilizando un stent recubierto con el

fármaco, y tampoco se ha apreciado una reducción significativa del tejido neointimal en este estudio experimental.¹²⁷ Otro ensayo con el octreotide, también un análogo de la somatostatina, tampoco ha demostrado beneficios en cuanto a la reducción de la reestenosis.¹²⁸

La intervención farmacológica sobre otros factores de crecimiento, como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento tumoral (TGF-beta1), ha sido también evaluada en modelos de proliferación neointimal, con resultados favorables.^{129,130} No obstante, el papel de estos grupos farmacológicos, tanto por vía sistémica como local, está pendiente de estudio en modelos animales adecuados.

Otros mediadores importantes de la interacción entre plaquetas, células inflamatorias y CML son una serie de sustancias vasoactivas con funciones en la regulación fisiológica del tono vascular y también en la respuesta proliferativa del músculo liso, como son la angiotensina II, la serotonina y las endotelinas. La serotonina es un autacoide liberado por las plaquetas activadas que tiene una acción mitogénica, vasoconstrictora y proagregante plaquetaria. El antagonista de la serotonina, ketanserina, ha demostrado ya ser ineficaz en reducir la reestenosis angiográfica en un ensayo clínico aleatorizado.¹³¹

Los antagonistas de la enzima de conversión de angiotensina y los antagonistas de la angiotensina II también han sido objeto de estudio en ensayos clínicos, con resultados negativos.^{64,65,132-134}

Los donantes de óxido nítrico, como la molsidomina, se han evaluado en modelos experimentales y subsecuentemente en ensayos clínicos con resultados favorables tras angioplastia con balón.¹³⁵⁻¹³⁸ Lamentablemente, esta línea de investigación no se ha seguido en la era actual, en que los stents son herramientas casi rutinarias en las intervenciones percutáneas.

El antagonismo de las endotelinas representa otra vía de tratamiento antiproliferativo que permanece inexplorada en estudios clínicos. Las endotelinas son importantes favorecedores de la proliferación de las CML y pueden representar una diana terapéutica más en la prevención de la reestenosis como describiremos más adelante.

4.1.d) Otros fármacos de uso sistémico: hipolipemiantes, vasodilatadores

No todas las drogas de uso sistémico han sido ineficaces. El probucol es un fármaco con una doble acción hipolipemiente y antioxidante que demostró reducción de la reestenosis en modelos experimentales.¹³⁹⁻¹⁴¹ Posteriormente, un ensayo clínico multicéntrico, doble ciego y controlado con placebo, que incluyó 317 pacientes (estudio de probucol y multivitaminas) demostró una reducción de 58% en la necesidad de una nueva revascularización después de una angioplastia coronaria cuando se administraba probucol desde cuatro semanas antes del procedimiento hasta el sexto mes de la angioplastia.¹⁴² En el análisis por ecografía intravascular, la reducción en la pérdida luminal progresiva observada en los pacientes tratados con probucol en este ensayo se atribuyó fundamentalmente a una atenuación del remodelado concéntrico del vaso tras la angioplastia. La eficacia de este fármaco se ha atribuido en su mayor parte al efecto antioxidante y parece fundamental el tratamiento durante las cuatro semanas previas a la intervención para alcanzar niveles tisulares adecuados de la droga en la pared vascular, lo que representa una importante limitación práctica de esta estrategia terapéutica. En otro ensayo, que evaluó el probucol y la lovastatina después de una angioplastia coronaria y en el que se había iniciado el fármaco solo una semana antes de la angioplastia no se consiguió demostrar ningún beneficio con ninguno de estos dos agentes.¹⁴³ Además, el probucol tiene efectos negativos sobre los niveles de HDL-colesterol por lo que se desaconseja su uso continuado.

También, se han realizado algunos ensayos clínicos utilizando inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa o estatinas. Las estatinas tienen efectos antiproliferativos en modelos experimentales que pueden ser no dependientes de su acción hipolipemiente.^{144,145} No obstante, ya se ha comentado que un ensayo clínico multicéntrico demostró que el tratamiento con lovastatina iniciado una semana antes de la ACTP y continuado por seis meses es ineficaz para reducir la reestenosis postangioplastia.¹⁴⁶ Tampoco se han obtenido resultados beneficiosos en otros estudios con pravastatina¹⁴⁷ o fluvastatina.¹⁴⁸

Dada la contribución de la pérdida luminal secundaria al retroceso elástico y las consideraciones relacionadas al mantenimiento de un estrés de corte

favorable mediante un flujo coronario adecuado, los vasodilatadores han sido frecuentemente utilizados como tratamiento coadyuvante en la ACTP. Los calcioantagonistas son los más frecuentemente utilizados. Además de su efecto reductor del vasoespasmo, se ha argumentado sobre un papel atenuador de la migración de CML.⁷³ Algunos ensayos clínicos sirvieron para demostrar la ausencia de efectos antireestenosis del diltiazem y del nifedipino,¹⁴⁹⁻¹⁵¹ aunque hay datos positivos con el verapamil¹⁵² y un metaanálisis publicado posteriormente deja dudas cuanto a la eficacia de los calcioantagonistas como grupo.¹⁵³ Más recientemente se revisó el papel del verapamil a dosis de 240 mg diarios después de una angioplastia en vasos periféricos en un ensayo clínico controlado con placebo.¹⁵⁴ Los resultados fueron muy favorables al grupo de tratamiento con verapamil. Se desconoce si este fármaco o grupo de fármacos podría ofrecer respuestas diferentes después de una angioplastia periférica en comparación con la angioplastia coronaria.

Tabla 3: Agentes farmacológicos estudiados para la prevención de la reestenosis (adaptado de la referencia 73)

Agentes antiplaquetarios y antitrombóticos
Aspirina
Dipiridamol
Antagonistas del tromboxano (vapiprost, sulotroban, S-1452)
Inhibidores de la sintetasa de tromboxano
Prostaciclina y análogos (ciprostone, beraprost)
Aceites de pescado (omega-3, ácido eicosapentanoico, maxepa)
Ticlopidina
Dextrano
Heparina no fraccionada y heparinas de bajo peso molecular
Antitrombina III exógena
Inhibidores de trombina (hirudina, hirulog, antistasina)
Inhibidores del factor Xa (antistasina)

Cont. Tabla 3.

Warfarina

Inhibidor de factor tisular

Trombolíticos (tPA, urokinasa)

Antagonistas IIb/IIIa (abciximab, tirofiban, eptifibatide)

Antagonistas Ib (VCL)

Agentes defibrinogenezantes (ancrod)

Inhibidores de la fosfodiesterasa del AMPc (cilostazol)

Agentes antiinflamatorios

Esteroides

Antiinflamatorios no esteroideos (ebselen, sulfinpyrazona)

Antialérgicos (tranilast, pemirolast)

Antagonistas de factores de crecimiento

Antagonistas del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF): trapidil, anticuerpos policlonales.

Antagonistas de la hormona del crecimiento (angiopeptina, octreotide, lanreotide)

Inhibidor Receptor de la Tirosina Kinasa (tyrohostin-47)

Antagonistas de serotonina (ketanserina)

Inhibidores de la enzima de conversión de angiotensina (cilazapril, captopril, fosinopril, enalapril)

Antagonistas de la angiotensina II (irbesartán)

Antagonistas de la endotelina

Estrógeno

Antagonistas beta-adrenérgicos (carvedilol)

Donantes de óxido nítrico (l-arginina, linsidomina, molsidomina)

Antagonistas de moléculas de adhesión de leucocitos y endotelio

Factor de crecimiento derivado del endotelio (VEGF)

Factor de crecimiento humano HGF

Vasodilatadores

Antagonistas calcio (diltiazem, nifedipino, nisoldipino, verapamil)

Antiproliferativos y antineoplásicos

R *Cont. Tabla 3.* ina,

Inhibidores de microtúbulos (colchicina, taxol)

Antineoplásicos varios (etoposide, vincristina, actinomycina D, azatioprina, metotrexate)

Terapia Fotodinámica

8-metoxipsoralen

Photofrin

Hipolipemiantes

Aféresis de LDL

Estatinas (lovastatina, pravastatina, fluvastatina)

Probucol

Antioxidantes

Vitaminas E y C

Probucol

Moleculares – Genéticas

Toxinas recombinantes

Oligonucleotídeos (“antisenses”)

4.2) Tratamiento farmacológico local

La mayor parte de los fármacos ensayados en estudios clínicos de prevención de reestenosis fueron previamente experimentados con éxito en modelos animales de proliferación neointimal tras lesión vascular, pero frecuentemente las dosis utilizadas en los modelos de experimentación animal fueron mucho mayores de las consideradas fisiológicas o adecuadas en terapia clínica.¹⁵⁵ La toxicidad y el riesgo de efectos adversos importantes de estos fármacos cuando se utilizan a dosis altas por vía sistémica en ensayos clínicos constituyen la principal limitación de estas estrategias. En este sentido y teniendo en cuenta que la reestenosis es un problema local, la aplicación del fármaco o sus efectos selectivamente en el lugar de la angioplastia supone un abordaje mucho más atractivo.

Los dispositivos de tratamiento local para la prevención de la reestenosis se empezaron a utilizar a principio de los años 90 y la mayor parte de los estudios se basan en la infusión de fármacos antiproliferativos mediante catéteres-balón

específicamente diseñados para ello.⁷³ Algunos fármacos ensayados en modelos de tratamiento local se han administrado únicamente por esta vía, ya que serían excesivamente tóxicos para la administración sistémica, como son los antineoplásicos o inmunosupresores. Otro tipo de aproximación farmacológica típicamente utilizada solo por vía local son varias formas de manipulación génica, por ejemplo, la inyección de toxinas quiméricas o de oligodeoxinucleótidos (“antisenses”), técnicas impracticables por vía sistémica.⁷³ En la actualidad están en marcha diversos estudios experimentales y clínicos basados en diferentes técnicas de tratamiento local con diferentes fármacos o terapia génica.

A pesar de que el concepto es enormemente atractivo, las varias formas de tratamiento local tienen también sus limitaciones potenciales. Una de las más importantes es el tiempo de permanencia o retención del fármaco en el sitio de la lesión, que es frecuentemente insuficiente. Esta limitación podría resolverse con diferentes aproximaciones, como la utilización de fármacos con efecto más prolongado, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales dirigidos a antígenos clave en el proceso de reestenosis; la inyección de fármacos encapsulados en microesferas de polímeros especiales,¹⁵⁶⁻¹⁵⁹ o la administración del fármaco en una plataforma de liberación lenta como los stents recubiertos de polímeros.¹⁶⁰⁻¹⁶²

Además del problema de la pobre eficiencia, la administración local de una droga a elevadas concentraciones en la pared vascular puede funcionar en algunas situaciones como un estímulo adicional a la proliferación celular inducida por el propio fármaco,¹⁶³ o bien por el propio mecanismo o dispositivo de infusión local.¹⁶⁴

Recientemente se ha empezado a explorar el papel de diversos fármacos con actividad antiproliferativa en la superficie del stent utilizando para ello, en la mayoría de los casos, polímeros especiales adheridos a la superficie del stent. Esta aproximación permite reunir las ventajas de la intervención con stent en cuanto a resultados inmediatos y abolición del retroceso elástico y remodelado constrictivo, junto con la inhibición de la proliferación neointimal con fármacos que pueden ser liberados localmente de forma lenta y a elevadas concentraciones. Los resultados iniciales en modelos experimentales y clínicos son muy esperanzadores¹⁶⁵⁻¹⁷⁰ y es probable que esta combinación de tratamiento local con un stent-fármaco sea en el

futuro la estrategia habitual en la mayoría de las intervenciones coronarias percutáneas. Particularmente eficaz parece ser el recubrimiento del stent con un polímero que contiene rapamicina, un inmunosupresor con capacidad de inhibición de la proliferación de linfocitos y CML. En el primer estudio de análisis de seguridad y eficacia de este modelo de stents, implantado en 60 pacientes con lesiones relativamente sencillas se observó prácticamente ausencia de crecimiento neointimal según las observaciones de la ecografía intravascular a los 6 meses.¹⁶⁶ Recientemente se publicaron los resultados del primer ensayo clínico con el mismo modelo de stent.¹⁶⁷ En este estudio, 238 pacientes fueron divididos de forma aleatoria en dos grupos: un grupo tratado con el stent farmacoactivo y el otro con el mismo modelo de stent pero sin polímero y sin fármaco. A los seis meses, la pérdida luminal era prácticamente nula en el grupo de stents con rapamicina, mientras que en el grupo control un 27% tenía reestenosis. Estos resultados son únicos en la historia del intervencionismo coronario y de confirmarse en otros estudios más grandes representaría un paso de gigante en el tratamiento percutáneo de la enfermedad coronaria.¹⁶⁸ Además, están actualmente en marcha otros ensayos clínicos con diferentes stents recubiertos de diferentes fármacos.^{169,170}

Sin embargo, no todos los stents con fármacos tienen la capacidad de reducir las tasas de reestenosis y ya se han comunicado resultados desfavorables con determinados modelos.¹⁷¹ Algunos problemas con estos dispositivos todavía sin aclarar son: 1) la posibilidad que el propio fármaco o el polímero tenga un efecto directo tóxico sobre la íntima;^{162,171} 2) la presencia de un crecimiento neointimal tardío, en un período en que el fármaco ya no esté actuando pero la malla metálica del stent sirva de estímulo a la inflamación y proliferación celular;¹⁷¹ 3) la presencia de reestenosis en aquellas zonas que fueron dañadas por el instrumental de angioplastia pero no cubiertas por el stent farmacoactivo, por ejemplo en los bordes del stent o en ramas laterales, o 4) la posibilidad de que, al menos con algunos modelos, la trombosis tardía sea más frecuente que con stents no recubiertos por la ausencia de un proceso “fisiológico” de cicatrización.¹⁷² Las respuestas a todas estas dudas están pendientes de análisis en los varios estudios actualmente en marcha.

4.3) Braquiterapia, Sonoterapia

Además de la estrategia farmacológica, en los últimos años ha aparecido la braquiterapia intracoronaria también como arma muy prometedora en la lucha frente a la reestenosis.¹⁷³⁻¹⁸² La braquiterapia utiliza el efecto antiproliferativo de la radiación ionizante para reducir la pérdida luminal progresiva en el segmento dilatado. Se ha demostrado ya su eficacia en el tratamiento de la reestenosis intrastent y de lesiones largas o en injertos venosos. Sin embargo, existen ciertas dudas acerca de su eficacia a más largo plazo y sobre todo del beneficio en lesiones *de novo*, que representan la gran mayoría de las lesiones tratadas.¹⁸² La recurrencia de la lesión después de la irradiación suele incidir sobre los bordes del segmento tratado, especialmente en aquellas zonas dañadas con el dispositivo de angioplastia pero que no son irradiadas (“geographical miss”).¹⁸² Estos aspectos, junto con la necesidad de una antiagregación potente durante un tiempo prolongado y, además, las dificultades logísticas propias de la técnica, en concreto la necesidad de coordinación estrecha entre cardiólogos intervencionistas, radiooncólogos y radiofísicos, suponen una importante limitación para la aplicación generalizada de esta estrategia en pacientes sometidos a angioplastia coronaria.

Más recientemente se viene explorando también la eficacia de la aplicación de ultrasonidos de alta intensidad por vía intravascular mediante un catéter específicamente diseñado para este fin (sonoterapia). El método se basa en observaciones *in vitro* de que los ultrasonidos que producen cavitación pueden inhibir la migración y proliferación de las CML.¹⁸³⁻¹⁸⁵ Se ha demostrado inhibición del área neointimal en un modelo porcino de reestenosis coronaria.¹⁸⁶ Esta estrategia está pendiente de evaluación en ensayos clínicos.

5. Papel biológico de las endotelinas

5.1) Concepto y descripción de las endotelinas

En 1985 se describió la existencia de un factor vasoconstrictor en un cultivo de células endoteliales bovinas.¹⁸⁷ Pocos años más tarde, Yanagisawa y cols publicaron la secuencia de aminoácidos del factor y lo llamaron endotelina.¹⁸⁸ Las endotelinas (ET) son una familia formada por cuatro péptidos de 21 aminoácidos: ET-1, ET-2, ET-3 y ET-4. La ET-1 es la isoforma predominante en los tejidos biológicos.¹⁸⁹ Desde su descripción inicial ha sido intensa e incesante la investigación sobre su importancia en la fisiología vascular y en varios estados patológicos como la hipertensión arterial sistémica, insuficiencia cardíaca, la disfunción endotelial y el shock.

Las ET son producidas a partir de un precursor común, la preproendotelina, que es clivada por una endopeptidasa resultando en una forma intermedia, la “big-ET”. La big-ET, a su vez, da origen a las ET sobretudo por la acción de la enzima convertidora de ET (ECE) (figura 3). Se han identificado varias isoformas de la ECE.¹⁸⁹ Las ECE-1 y ECE-2 clivan big ET-1, big ET-2 y big ET-3 y se sabe de la existencia de una ECE-3 que es específica para la big ET-3.

Las ECEs se localizan en las células endoteliales, cardiomiocitos, macrófagos y en las células musculares lisas.¹⁸⁹ Estas enzimas no son específicas para las ET, sino también hidrolizan otros péptidos como la bradikina, sustancia P y la insulina.^{190,191} La acción de las ECEs no es la única vía por la que se forman las ET. En ratas deficientes en ECE-1, los niveles de ET-1 se reducen un tercio únicamente, lo que indica una importante producción no dependiente de la ECE.¹⁹² La expresión celular de las ECEs varía en función de una serie de mediadores locales, como por ejemplo determinadas citocinas¹⁹³ o la propia ET-1,¹⁹⁴ y de mediadores sistémicos como las lipoproteínas de baja densidad.¹⁹⁵

La regulación de la síntesis y expresión de la ET-1 es multifactorial, como se resume en la tabla 4. Uno de los aspectos más interesantes en este proceso es la liberación inmediata de ET-1 en respuesta a estímulos mecánicos, como el estiramiento del vaso¹⁹⁶ y el estrés de corte en la pared.¹⁹⁷ Hasdai y cols¹⁹⁶ estudiaron los niveles sistémicos e intracoronarios de ET-1 en 20 pacientes

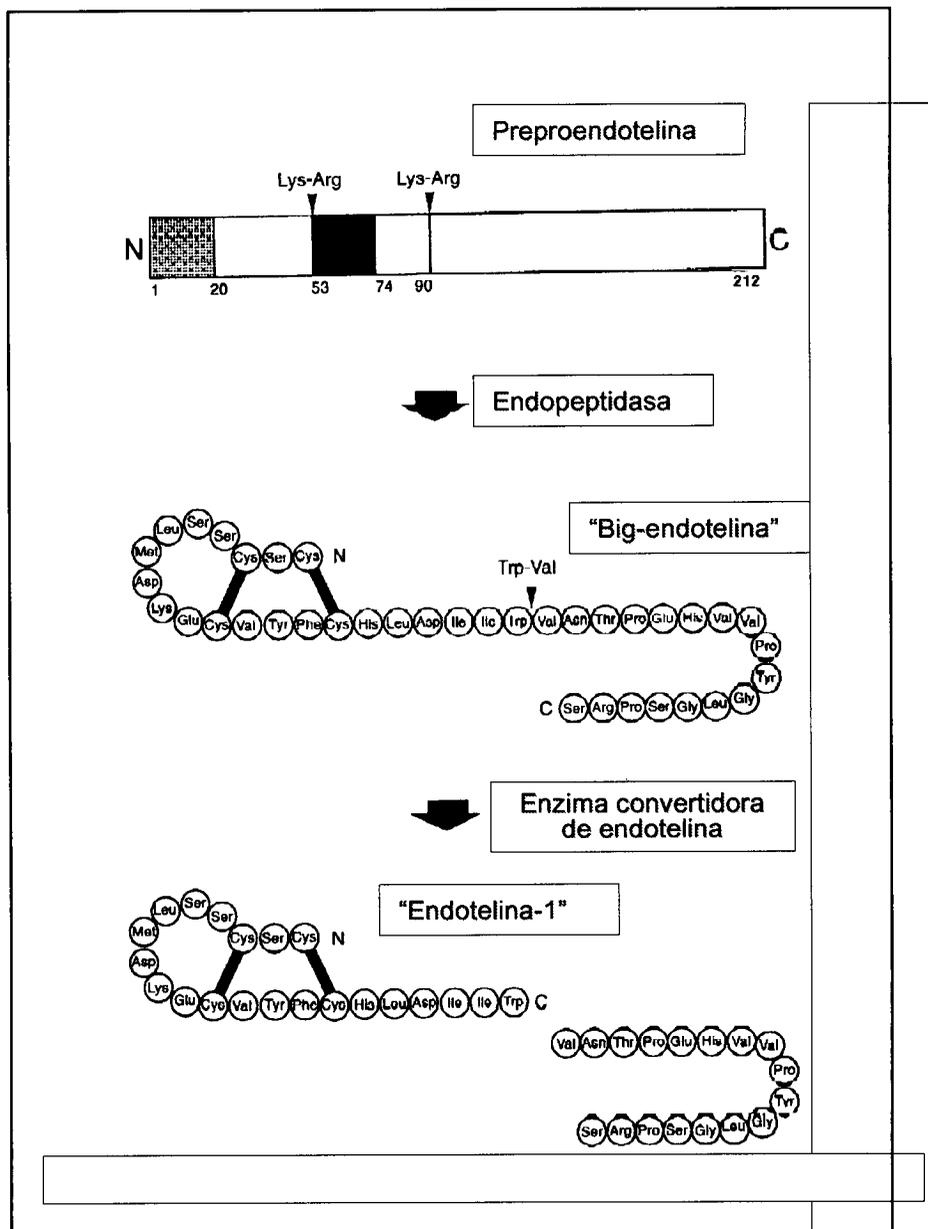


Figura 3: Formación de la endotelina-1 a partir del clivaje de preproendotelina y big-endotelina.

sometidos a una angioplastia coronaria con balón. Los niveles aumentaban en las muestras sanguíneas obtenidas en la zona distal al segmento dilatado (8.4 ± 0.9 a 16.4 ± 2 pg/mL, $p < 0,05$) y no se modificaban en la coronaria proximal o en las

Tabla 4: Factores reguladores de la síntesis de endotelina (ref 189)

Factores estimuladores	Factores inhibidores
Estiramiento pulsátil	Óxido Nítrico
Estrés de corte	Prostaciclina
Acidosis	Peptídeos natriuréticos
Hipoxia	Estrógenos
LDL oxidada	
Glucosa	
Bajos niveles de estrógenos	
Obesidad	
Cocaína	
Trombina	
Angiotensina II	
Vasopresina	
Factores de crecimiento: VEGF	

VEGF = factor de crecimiento vascular dependiente del endotelio

muestras obtenidas en arteria femoral. Estos datos apuntan hacia una participación precoz de la ET-1 en el proceso de reparación vascular, aparte de implicarla en el espasmo arterial observado en algunos casos durante la instrumentalización de los vasos necesaria para una intervención terapéutica. Varios factores de riesgo para la enfermedad aterosclerótica sirven también de estímulo para la producción de ET-1, como las lipoproteínas de baja densidad,¹⁹⁷ la hiperglucemia,¹⁹⁸ la obesidad,¹⁹⁹ y el déficit de estrógeno.²⁰⁰ La hipoxia es otro importante estímulo para la síntesis de ET-1.²⁰¹

5.1.a) Receptores para las endotelinas: ET_A y ET_B

Las acciones biológicas de las ET se producen en los mamíferos por intermedio de dos tipos de receptores: ET_A y ET_B.^{202,203} Estos receptores difieren en la afinidad con las ET y también en la acción. El receptor ET_A se localiza básicamente en las CML, su activación produce vasoconstricción y tiene alta afinidad por la ET-1 y ET-2 y baja afinidad por la ET-3. Los receptores ET_A actúan en la membrana celular elevando los niveles citosólicos de inositol-trifosfato y de calcio, a través de la estimulación de fosfolipasa C. El receptor ET_B se encuentra predominantemente en el endotelio,²⁰³ donde produce vasodilatación a través de la liberación de óxido nítrico y prostaciclina, pero también está presente en el músculo liso vascular,²⁰⁴ donde su acción es vasoconstrictora.²⁰⁵ Otra función de los receptores ET_B es la de aclaramiento de la ET-1 circulante, particularmente durante el paso de la sangre por la circulación pulmonar.²⁰⁶ El mecanismo de acción y los mediadores intracelulares de los receptores ET_B son escasamente conocidos, pero, al menos en las CML donde la acción es similar a la de los receptores ET_A, los efectos sobre los niveles citosólicos de calcio deben ser similares.

En la actualidad se dispone de bloqueantes específicos de los receptores ET_A y ET_B, así como de bloqueantes mixtos ET_A/ET_B (tabla 5). La utilización de estos fármacos ha permitido ampliar enormemente los conocimientos sobre el papel de la ET-1 en los tejidos biológicos, así como su participación en varios estados patológicos como la insuficiencia cardíaca, hipertensión arterial, insuficiencia renal y aterosclerosis.

5.1.b) Acciones cardiovasculares de la ET-1

El control del tono vascular depende de un equilibrio entre factores vasodilatadores y vasoconstrictores, liberados en la circulación sanguínea en función de una serie de estímulos reguladores. El mantenimiento de este equilibrio a nivel local es función del propio endotelio vascular, mediante la producción de algunos de los principales agentes, como son el óxido nítrico y la prostaciclina

con una acción relajadora del músculo liso y por otro lado de las ET, con un papel vasoconstrictor. La ET-1 es uno de los más potentes vasoconstrictores conocidos.

Tabla 5: Principales antagonistas de los receptores de endotelina disponibles.

Fármaco	Línea de investigación
Antagonistas ET_A	
BQ-123	Varios –uso intravenoso solamente
BMS-193884	IC
L-754142	Isquemia renal
LU-135252 (darusentán)	IC, HP, Aterosclerosis, IR
PD-156707	IC
Ro-61-1790	Hemorragia subaracnoidea
TA-0115	IC
ZD-1611	HP
Antagonistas ET_A/ET_B	
J-104132	HTA
PD-142893	IR
PD-145065	Hemorragia subaracnoidea
Ro-47-0203 (bosentán)	IC, HTA, IM, Transplante, IR, HP, aterosclerosis
Ro-61-0602 (tezosentán)	IC – uso intravenoso
SB-209670	Nefropatía por contraste
TAK-044	Hemorragia subaracnoidea, transplante, aterosclerosis
Antagonistas ET_B	
BQ-788	Varios- uso intravenoso solamente
A-192621	Varios

IC = insuficiencia cardíaca, HP = hipertensión pulmonar, IR = insuficiencia renal, HTA = hipertensión arterial, IM = infarto de miocardio

Modificada de la ref 207.

En el endotelio, la producción de ET-1 va dirigida predominantemente hacia la capa muscular de la arteria (secreción abluminal)²⁰⁸ donde, mediante estimulación predominantemente ET_A, pero también ET_B, induce la contracción del músculo liso vascular. La ET-1 tiene además una acción mitogénica para las CML,²⁰⁹ aparte de favorecer la liberación de citocinas^{210,211} y de factores de crecimiento.²¹² Otras acciones de la ET-1 son la de estimular la formación de proteínas de la matriz extracelular,^{213,214} la atracción de macrófagos²¹⁵ y adhesión de neutrófilos.²¹⁶ La estimulación del crecimiento de la población de las CML se produce a partir de la producción endógena de ET-1, es decir, proveniente del propio tejido muscular (acción autócrina)²¹⁷ y parece mediada sobre todo por los receptores ET_A,^{189,217} aunque podrían participar también en cierta medida los receptores ET_B.^{217,218} Por todo lo expuesto, parece razonable atribuir a la ET-1 un papel clave en la respuesta hiperplásica de las CML relacionadas a la aterogénesis, hipertensión arterial y reestenosis.

5.1.c) Distribución de los receptores ET_A y ET_B en los tejidos

La acción biológica de la ET-1 depende fundamentalmente de las concentraciones relativas de receptores ET_A y ET_B. La subpoblación de receptores de ET-1 y su distribución varía en función de la especie animal utilizada como modelo experimental. En ratas sometidas a angioplastia de las carótidas se ha observado un incremento marcado de los niveles de RNAm de receptores ET_A y menos llamativo de los receptores ET_B pocos días después de la lesión vascular.²¹⁹ En cambio, en conejos sometidos a denudación endotelial de las carótidas predomina la expresión de los receptores ET_B en el tejido neointimal.²²⁰ En el modelo porcino, más parecido con el humano, la relación ET_A:ET_B en la capa media tras lesión coronaria es aproximadamente 2:1.²²¹

La mayor parte de los receptores presentes en las CML humanas son del subtipo ET_A.^{222,223} En cambio, en el endotelio, los receptores ET_B son los que predominan. Como se ha señalado anteriormente, la activación de los receptores ET_B en el endotelio produce un efecto vasodilatador y antiproliferativo, por intermedio de la acción del óxido nítrico y prostaciclina. Por lo tanto, cabría suponer que, en condiciones normales, la respuesta predominantemente

vasoconstrictora producida por la ET-1 se debe a un efecto mayor de los receptores ET_A y ET_B presentes en el músculo liso vascular, contrarrestados por la acción de los receptores ET_B del endotelio. De hecho, Verhaar y cols²²⁴ demostraron que un antagonista selectivo ET_A, el BQ-123 tiene un efecto vasodilatador directo cuando administrado en arterias braquiales de voluntarios sanos. Dicho efecto vasodilatador era atenuado con la infusión concomitante de un antagonista ET_B (BQ-788), o cuando se inhibía la síntesis de óxido nítrico. El antagonista ET_B, administrado de forma aislada, tenía un efecto vasoconstrictor. En concordancia con estos hallazgos, la respuesta sistémica a la administración de BQ-788 en individuos sanos es el incremento de la resistencia vascular periférica, aunque no se produce un incremento significativo de la presión arterial media.²²⁵

Las diferentes acciones de los subtipos de receptores de ET-1 sugieren que el antagonismo selectivo ET_A sería el más apropiado para bloquear la participación de la ET-1 en la patogénesis de la hipertensión arterial, insuficiencia cardíaca y del proceso aterosclerótico. No obstante, en contraste con las arterias de individuos normales, en las que predominan los receptores ET_A en la capa media, en presencia de enfermedad coronaria aterosclerosa, la proporción de los receptores ET_A y ET_B en el tejido de proliferación es similar (ET_A 51% y ET_B 49%),²²⁶ lo que argumenta a favor de la importancia de bloquear también los receptores ET_B. Además, en la insuficiencia cardíaca parece existir una mayor acción vasoconstrictora sistémica de los receptores ET_B de la que está presente en individuos sanos.²²⁷ Si consideramos la mayor participación de los receptores ET_B una vez producida la hiperplasia celular propia de determinados procesos patológicos como la aterosclerosis y la hipertensión arterial, el bloqueo no selectivo ET_A/ET_B parece el más apropiado en el terreno clínico, y, por lo tanto, también en el experimental.

5.1.d) Endotelinas, aterogénesis e hiperplasia vascular

Existe suficiente evidencia para sugerir que las ET son péptidos con propiedades aterogénicas. Se ha demostrado que la ET-1 es capaz de estimular de forma directa la proliferación de las CML.²¹⁷ Además, la actuación farmacológica sobre los receptores ET_A en ciertos modelos experimentales de aterogénesis

reduce la aparición de los cambios ateroscleróticos iniciales.^{228,229} Por ejemplo, en ratas deficientes en apolipoproteína-E, la inhibición de los receptores ET_A reduce la aterosclerosis sin alterar la concentración plasmática de colesterol o la presión arterial.²²⁹ Los efectos favorecedores de la aterogénesis no se limitan al estímulo de la proliferación de CML; también incluyen una mayor producción de los componentes de la matriz extracelular,^{213,214} así como la participación de células inflamatorias.^{215,216} Por lo tanto, la hipótesis de una relación entre ET y arteriosclerosis está correctamente respaldada por modelos experimentales.

También en el terreno clínico se puede encontrar evidencia de la relación entre ET y enfermedad aterosclerosa. Por ejemplo, los niveles de ET-1 están aumentados en el plasma de pacientes con enfermedad coronaria,²³⁰ y también en el tejido aterosclerótico humano.²³¹⁻²³³ Además, se ha observado una asociación entre factores de riesgo clásicos para arteriosclerosis y ET-1.¹⁹⁵ La presencia de LDL oxidada aumenta la expresión de ET-1 por el endotelio porcino y humano.²³⁴

Las ET también parecen estar involucradas en la hipertrofia vascular producida por la hipertensión arterial,²³⁵⁻²³⁷ aparte de un efecto sobre el miocardio, induciendo hipertrofia ventricular,²³⁸ lo que influye de forma clara sobre la morbilidad y mortalidad de los pacientes hipertensos. La ET-1 puede tener además un papel directo en la patogénesis de la hipertensión arterial, aunque los niveles plasmáticos de ET-1 no están sistemáticamente elevados en la hipertensión arterial esencial.²⁰⁷

Los pacientes trasplantados tienen niveles elevados de ET-1 tanto a nivel plasmático cuanto en el tejido vascular coronario.²³⁸ Estos datos, aunados a la similitud entre varios aspectos de la fisiopatología del proceso de arteriosclerosis y la enfermedad vascular del injerto, hacen suponer que las ET pueden también estar involucradas en la arteriopatía obliterante propia del trasplante cardíaco.

En resumen, la inhibición de la acción de la ET con fármacos bloqueantes de sus receptores aparece como un objetivo terapéutico muy atractivo en aquellas situaciones en las que la hipertrofia del músculo liso vascular participa en la patogénesis y tiene impacto pronóstico, como la enfermedad aterosclerosa o la hipertensión arterial sistémica.

6. Antagonismo de los receptores de endotelina para la prevención de la reestenosis

Dado el papel de las ET en el estímulo a la proliferación del músculo liso y formación de matriz extracelular, el bloqueo de los receptores de ET es una buena alternativa a explorar en el intento de controlar la reestenosis postangioplastia. De forma análoga a lo que ocurre en el tejido aterosclerótico humano, en determinados modelos experimentales de reestenosis, la expresión tisular de ET-1 está aumentada después de la lesión vascular.²¹⁶ Además, la propia infusión de ET-1 puede aumentar el grado de proliferación neointimal, lo que sugiere una relación causa/efecto, más que un simple marcador de la enfermedad.²⁴⁰

El papel de los antagonistas de la ET-1 en la prevención de la reestenosis ha sido objeto de estudio en diferentes modelos experimentales de reestenosis.²⁴¹⁻²⁵² La respuesta obtenida con el antagonismo de la ET-1 es variable según el modelo experimental y la metodología aplicada. Por ejemplo, en ratas tratadas tanto con antagonistas selectivos ET_A, como no selectivos ET_A/ET_B y después sometidas a denudación endotelial, la respuesta en general es la atenuación de la respuesta neointimal y la reducción de la incorporación de timidina,²⁴¹⁻²⁴⁵ aunque en algunos estudios no ha sido así.²⁴⁶ En conejos sometidos a denudación carotídea con balón, el antagonismo específico ET_A con BQ 123 ha sido, sin embargo, ineficaz, probablemente por una mayor participación de los receptores ET_B en este modelo animal.²⁴⁷ La información obtenida de estos modelos experimentales sirve de base para profundizar en el conocimiento del papel de la ET-1 en el proceso de reparación vascular, pero difícilmente se puede extrapolar al proceso de aterosclerosis o reestenosis humana y se hace necesario la confirmación de estos hallazgos en otros estudios *in vivo* más apropiados. El modelo porcino presenta mayor similitud con el modelo humano y por lo tanto es más apropiado para estudiar los efectos de las diferentes actuaciones sobre la reestenosis.

En el modelo porcino, algunos estudios sugieren que el tratamiento sistémico con bloqueantes específicos de los receptores ET_A pueden reducir el grosor de neointima secundario a la lesión vascular.²⁴⁸⁻²⁵⁰ Burke y cols²⁴⁸

estudiaron los efectos de un antagonista específico ET_A (A-127722.5) en un modelo porcino de angioplastia con balón en arterias carótida e iliaca. El fármaco se administró por vía oral empezando tres días antes de la angioplastia y se continuó un total de 4 semanas. Se compararon los resultados con un grupo de animales que recibieron placebo y un tercer grupo que recibió un antagonista de los receptores de angiotensina (captopril). A las 4 semanas se observó una reducción significativa del área neointimal, en las arterias ilíacas de los animales tratados con el antagonista ET_A , aunque los efectos fueron menos marcados en las arterias carótidas. Los animales tratados con captopril también presentaron menor proliferación neointimal comparados con el grupo placebo, pero el efecto antiproliferativo fue menos llamativo que con el bloqueo de los receptores ET_A .

McKenna y cols²⁴⁹ analizaron los efectos de tres dosis diferentes de ABT147627, otro bloqueante específico ET_A , administrado por vía oral en un modelo de stent intracoronario sobredimensionado. Estos investigadores encontraron una reducción significativa de la respuesta neointimal, aunque la magnitud de esta reducción no fue uniforme entre los grupos debido a diferencias en el grado de lesión inducida. Los segmentos con lesión tenían una concentración de ET-1, medida por inmunohistoquímica, más elevada que los segmentos no lesionados, particularmente en las zonas próximas a la superficie metálica del stent, indicando una participación directa de la ET-1 en los tejidos dañados. Otro grupo describió resultados similares con un fármaco diferente (LU135252), también con una acción específica para los receptores ET_A .²⁵⁰ Un hallazgo interesante de este estudio fue el aumento similar encontrado en la concentración de los dos tipos de receptores ET_A y ET_B en el tejido de reparación (relación ET_A/ET_B de 1,6:1). El bloqueo selectivo ET_A se asoció a una reducción de la expresión de las dos poblaciones de receptores. Estos hallazgos sugieren que un bloqueo no selectivo ET_A/ET_B podría ser más eficaz en la atenuación de los efectos de la ET-1 sobre el tejido de reparación.

Con base a lo expuesto hasta aquí, se puede suponer que el bloqueo no selectivo ET_A/ET_B debería ser similar o más eficaz que el antagonismo ET_A aislado, considerando que ambos receptores están presentes en el tejido neointimal formado.^{250,251} De hecho, en un estudio de cultivo de venas safenas

humanas, un modelo validado de hiperplasia intimal, se observó una reducción significativa de la proliferación de CML con un antagonista ET_A/ET_B (bosentán) y con un antagonista ET_B (BQ 788), pero no con un bloqueante específico ET_A (BQ 123).²¹⁸ Sin embargo, en el único estudio *in vivo* que analizó los efectos de un antagonista dual ET_A/ET_B (L-749,329), también en un modelo porcino de stents intracoronarios, los efectos sobre la respuesta neointimal intrastent parecen discretos.²⁵¹

Las discrepancias entre estos resultados pueden ser debidas a diferentes propiedades farmacocinéticas de las drogas analizadas o a una diferencia real entre el bloqueo selectivo ET_A y el bloqueo mixto ET_A/ET_B . El bloqueo de los receptores ET_B presentes en el endotelio sano teóricamente podría ser perjudicial al reducir las concentraciones de sustancias vasodilatadoras y antiproliferativas. Considerando las diferentes concentraciones de receptores ET_B en el tejido muscular liso en relación con estados patológicos como la aterosclerosis y probablemente la reestenosis,²²⁶ parece evidente la necesidad de ampliar el conocimiento sobre los posibles efectos de un antagonismo dual ET_A/ET_B sobre el proceso de reestenosis antes de extrapolar la información disponible a la investigación clínica.

7. Antagonismo de los receptores de endotelina con bosentán: efectos cardiovasculares

El bosentán (Ro 47-0203, Actelion Ltd., Allschwil, Suiza) es un antagonista no peptídico mixto ET_A/ET_B activo por la vía oral (figura 4). Mientras son varios los fármacos disponibles con propiedades bloqueantes de los receptores de ET (tabla 5), el bosentán es el único que se encuentra en una avanzada fase de investigación clínica²⁵² y ya está aprobado para el tratamiento de enfermedades como la hipertensión pulmonar primaria.²⁵³

Los efectos hemodinámicos agudos del bosentán van a depender de las condiciones experimentales. En la rata no se objetivan cambios en la tensión arterial cuando se administra bosentán intravenoso.²⁵⁴ De forma similar, Choussat y cols²⁵⁵ demostraron que en perros no anestesiados una dosis de 3 mg/kg de bosentán por vía intravenosa no tiene efectos significativos sobre la presión aórtica, gasto cardíaco o índices de contractilidad ventricular. Sin embargo, después de inducir insuficiencia cardíaca con estimulación ventricular a alta frecuencia, la misma dosis de bosentán es capaz de reducir la presión arterial media y la resistencia arterial periférica y aumentar el volumen de eyección a partir del primer minuto de la infusión y con el pico de acción ocurriendo a los 25 minutos. La administración de bosentán produce un aumento sistemático de las concentraciones plasmáticas de ET-1 y no de big-ET, lo que indica un desplazamiento del péptido de sus receptores ET_A o ET_B y no un incremento de la producción.²⁵⁵⁻²⁵⁷

En pacientes con insuficiencia cardíaca crónica, la administración de bosentán produce una disminución de las resistencias sistémica y especialmente de la pulmonar, así como un incremento en el gasto cardíaco, particularmente en los pacientes con niveles elevados de ET-1 en plasma.²⁵⁷ Wenzel y cols²⁵⁸ estudiaron los efectos del bosentán intravenoso (200 mg) sobre la circulación coronaria en 14 pacientes con enfermedad aterosclerótica diagnosticada. Después de la administración de bosentán, se produjo una disminución significativa de la presión arterial sistólica, pero no de la diastólica, y un discreto aumento de la

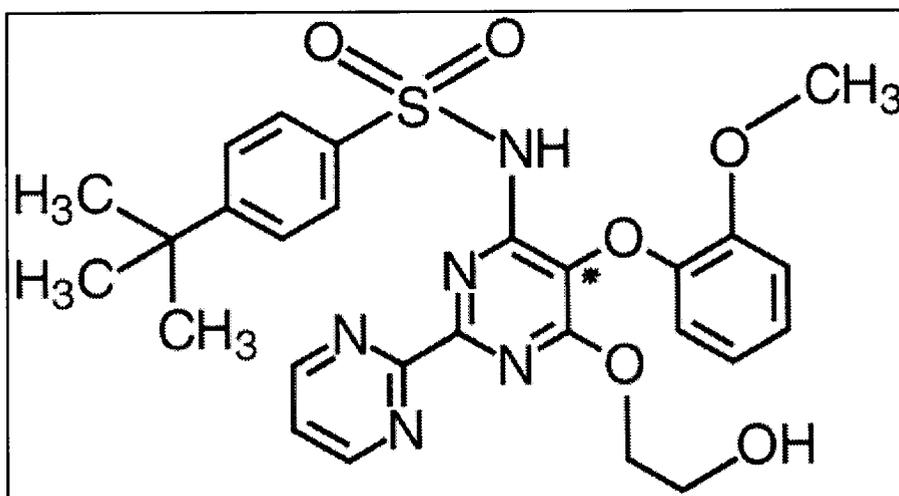


Figura 4: Estructura química del bosentán

frecuencia cardíaca. Se observó un aumento en el diámetro de las coronarias, tanto en el vaso estenótico como en otras arterias, tomadas como control. No se produjeron cambios significativos en la velocidad de flujo coronario o en el flujo de reserva coronario. Estos hallazgos sugieren que las ET contribuyen a la regulación del tono vascular coronario y que el bosentán podría ser útil en el control de las manifestaciones derivadas de la isquemia coronaria.

El bosentán tiene una biodisponibilidad de aproximadamente 45-50% cuando se administra por vía oral en voluntarios sanos.²⁵⁹⁻²⁶¹ La droga se tolera bien tanto por la vía oral cuanto por la vía intravenosa y no produce cambios significativos en la tensión arterial o frecuencia cardíaca basales.²⁵⁹⁻²⁶² La ingesta de alimentos no tiene efectos relevantes sobre la absorción.²⁶² Las concentraciones pico en plasma ocurren a las 6,5 horas aproximadamente y la vida media es de poco más de 7 horas.²⁶¹ El bosentán es metabolizado mayoritariamente en el hígado y se elimina en casi su totalidad por vía biliar.²⁶¹ Los metabolitos no llegan a tener concentraciones activas en plasma.

El bosentán está disponible comercialmente en algunos países para el tratamiento de la hipertensión pulmonar primaria. Mientras son varios los estudios experimentales y clínicos que analizan el papel de este fármaco en el tratamiento de enfermedades como la hipertensión arterial e insuficiencia cardíaca,²⁵² no se dispone de información sobre sus efectos en la respuesta reparativa de la pared arterial en un modelo porcino de angioplastia coronaria.

8. Antagonismo de los receptores de endotelina con bosentán: estudios experimentales y clínicos.

8.1) Bosentán en la hipertensión arterial sistémica

La ET-1 puede ejercer un papel en la patogénesis de la hipertensión arterial, aunque los niveles plasmáticos no están elevados de modo consistente en pacientes con hipertensión arterial esencial.^{263,264} Individuos con hemangioendoteliomas productores de ET-1 manifiestan hipertensión arterial que revierte tras la cirugía.²⁶⁵ Varios estudios en el campo experimental sugieren que el antagonismo de los receptores de ET puede ser una forma atractiva de controlar la hipertensión arterial.

La administración de bosentán reduce la presión arterial sistémica en los modelos de hipertensión arterial sensibles a la sal en ratas, pero no en los modelos de ratas espontáneamente hipertensas.²⁵² De todos modos, aunque la caída de la presión arterial es discreta en ciertos modelos experimentales, el bosentán ha demostrado una reducción de la hipertrofia ventricular y de la fibrosis perivascular y subendocárdica en animales con hipertensión.²⁶⁶⁻²⁶⁷

Debido a los efectos del receptor ET_B en la liberación de óxido nítrico y el papel vasoconstrictor predominante del receptor ET_A, existe una controversia aun no resuelta sobre si el antagonismo de la ET-1 a utilizar en el tratamiento de la hipertensión arterial debe ser exclusivamente sobre los receptores ET_A o mixto ET_A/ET_B.^{189,252} El bloqueo selectivo ET_A, pero no el combinado ET_A/ET_B, es capaz de mejorar la función endotelial, independiente de sus efectos sobre la tensión arterial.²⁶⁸⁻²⁶⁹ Por otro lado, el bloqueo solo de los receptores ET_A puede ejercer un efecto paradójico vasoconstrictor en determinadas circunstancias debido a la potenciación de la acción sobre los receptores ET_B libres en el músculo liso.²⁷⁰ En ratas hipertensas de tipo Dahl se consigue un mejor control de la tensión arterial con el bosentán, comparado con el BQ-123, un antagonista selectivo ET_A, aunque los efectos de estos dos fármacos son similares en otro modelo experimental.²⁵²

El posible papel terapéutico del bosentán en la hipertensión arterial esencial fue analizado en un ensayo clínico con 293 pacientes con hipertensión arterial leve o moderada.²⁷¹ Los pacientes fueron aleatorizados y agrupados en uno de cuatro regímenes diferentes de bosentán oral (100 mg, 500 mg, 1000 mg y 1000mg/12 h), enalapril (20 mg/24 h) o placebo. Se observó una buena tolerancia al bosentán y una reducción significativa de la presión arterial de magnitud similar a la del enalapril, sin evidencia de taquicardia refleja o activación neurohormonal. El beneficio terapéutico del bosentán a largo plazo en la hipertensión arterial queda pendiente de evaluar en ensayos clínicos específicamente diseñados.

8.2) Bosentán en la insuficiencia cardíaca.

La ET-1 es un factor neurohormonal importante en la fisiopatología de la insuficiencia cardíaca. En los modelos experimentales de insuficiencia cardíaca, la ET-1 circulante²⁷² y la ET-1 miocárdica²⁷³ están marcadamente elevadas. También se demuestran niveles plasmáticos elevados de ET-1 en los pacientes con insuficiencia cardíaca crónica. Las concentraciones en plasma de ET-1 se correlacionan de forma directa con los trastornos hemodinámicos y con los síntomas.²⁰⁷ Además, se ha demostrado una correlación entre los niveles de big-ET-1 y la supervivencia.²⁰⁷

Los mecanismos de la elevación de la ET-1 en la insuficiencia cardíaca no están claros. Posiblemente la distensión vascular en la circulación pulmonar, relacionada con la elevación de las presiones de llenado intracardíacas sirva de estímulo para la producción de ET-1.²⁷⁴ Otros mecanismos adicionales podrían ser la activación de mecanismos baroreflejos, la depresión de la actividad de los receptores ET_B pulmonares y la activación de otros sistemas neurohormonales como la angiotensina II y catecolaminas, que también estimulan la producción de ET-1.²⁰⁷

Aparte de los efectos en la elevación de la resistencia vascular periférica y pulmonar, la ET-1 tiene un impacto negativo en la insuficiencia cardíaca por facilitar la hipertrofia y fibrosis vascular y miocárdica. Además, la ET-1 influye en la regulación de la eliminación renal de sal y agua.²⁰⁷ La infusión de ET-1 en

voluntarios sanos produce una reducción del flujo plasmático renal y de la tasa de filtración glomerular.²⁷⁵

Dados los efectos hemodinámicos deletéreos de la ET-1 en la insuficiencia cardíaca y teniendo en cuenta los beneficios terapéuticos de la manipulación farmacológica de la reacción neurohormonal en el pronóstico de estos pacientes, parece razonable que el antagonismo de los receptores de ET sea un objetivo a evaluar. Aquí, como en la hipertensión arterial, también existe controversia en cuanto al bloqueo selectivo ET_A o mixto ET_A/ET_B. La mayor parte de los estudios clínicos están hechos, hasta el momento, con el bosentán.

Los modelos experimentales de insuficiencia cardíaca demuestran un importante beneficio potencial del tratamiento con bosentán. Cuando se induce disfunción ventricular secundaria a infarto en la rata o en el modelo canino, la administración de bosentán reduce la postcarga, aumenta el flujo sanguíneo renal, atenúa la hipertensión pulmonar y aumenta la supervivencia.^{207,254,276,277} Hasta ahora, se ha probado el bosentán en dos ensayos clínicos de fase II y en otros dos de fase III. En el primero de estos estudios, 24 pacientes con insuficiencia cardíaca crónica fueron divididos en dos grupos de forma aleatoria: bosentán intravenoso (100 mg y después de 60 minutos otros 200 mg) o placebo.²⁵⁷ Comparado con el placebo, el bosentán redujo significativamente la presión arterial sistémica y las presiones de llenado ventricular y aumentó el índice cardíaco. Más marcada fue la reducción de las presiones pulmonares (reducción de 33% en la resistencia vascular pulmonar). El segundo estudio de fase II, también aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo, incluyó a 36 pacientes con insuficiencia cardíaca sintomática, función sistólica ventricular izquierda reducida, ya tratados con digoxina, diuréticos e inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina.²⁷⁸ El bosentán se administró por vía oral (1,0 g/12 h) durante 14 días y se analizaron los efectos hemodinámicos y sobre la actividad neurohormonal. De forma similar a lo encontrado previamente con el fármaco intravenoso, el bosentán se asoció a una reducción de las resistencias vasculares sistémica y pulmonar, incremento del gasto cardíaco, sin aumento de la frecuencia cardíaca o de la actividad simpática. Uno de los pacientes no toleró las dosis

administradas del fármaco por hipotensión. No se registraron otros efectos secundarios.

Se han diseñado dos ensayos clínicos de fase III con bosentán.^{252,279} En un estudio piloto (ensayo “*Research on Endothelin Antagonism in Chronic Heart Failure*” o REACH-1”) se evaluó la seguridad y papel terapéutico del bosentán en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica, en clase funcional III o IV, a pesar del tratamiento estándar. El estudio se interrumpió precozmente por elevación de las transaminasas hepáticas en el grupo tratado con bosentán a dosis de 500 mg/12 horas. Los resultados presentados sugieren mejoría funcional y reducción de las hospitalizaciones. A raíz de este ensayo se diseñó otro estudio con criterios de inclusión similares y con una dosis más baja de bosentán, 125 mg/12 horas (el “*Endothelin Antagonist Bosentán for Lowering Cardiac Events*” o ENABLE). Los pacientes fueron seguidos por un mínimo de 9 meses. Los resultados divulgados hasta el momento sugieren ausencia de beneficios clínicos en cuanto a la combinación de mortalidad global y hospitalización por insuficiencia cardíaca.²⁷⁹

En conclusión, aunque existe un beneficio teórico del bloqueo de las ET en la insuficiencia cardíaca crónica, no se han podido demostrar efectos favorables del bosentán cuando se administra de forma crónica en pacientes ya tratados con otros vasodilatadores. Lógicamente, estos datos no se pueden extrapolar a los demás antagonistas de las ET selectivos para los receptores ET_A o mixtos ET_A/ET_B. Queda pendiente aclarar si estos efectos adversos, no observados en otros estudios con bosentán, tiene relación con la situación hemodinámica de los pacientes con insuficiencia cardíaca grave o guardan relación con interacciones medicamentosas.

8.3) Bosentán en la hipertensión pulmonar primaria

Los efectos del antagonismo de las ET sobre la resistencia vascular pulmonar hacen que esta aproximación farmacológica sea especialmente atractiva para el tratamiento de la hipertensión pulmonar primaria. La hipertensión pulmonar primaria es una enfermedad muy debilitante caracterizada por el aumento de las resistencias en el árbol pulmonar y frecuentemente asociada a fallo

cardíaco derecho. Las alternativas de tratamiento disponibles se limitan a la anticoagulación con dicumarínicos, calcioantagonistas y epoprostenol. Sin embargo, la mayoría de los pacientes permanecen muy sintomáticos a pesar del tratamiento, y además la infusión de epoprostenol de manera continua tiene el inconveniente de necesitar el implante de un dispositivo de infusión, es costosa y los efectos adversos son frecuentes.²⁸⁰ Recientemente se han introducido análogos de la prostaciclina por vía oral (beraprost)²⁸¹ y por vía nasal (iloprost)^{282,283} con resultados clínicos muy esperanzadores.²⁸³

Existe una evidencia sustancial de que las ET pueden estar involucradas en la patogénesis de la hipertensión pulmonar primaria o de la hipertensión pulmonar asociada a esclerodermia. La ET-1 está aumentada en el plasma y en los pulmones de los pacientes afectados.²⁸⁴ El antagonismo de la ET-1 reduce de forma consistente las presiones pulmonares en todos los modelos experimentales de insuficiencia cardíaca.²⁰⁷ En ratas con hipertensión pulmonar inducida por hipoxia, el tratamiento previo con bosentán previene la aparición de la vasoconstricción pulmonar, reduce la hipertrofia ventricular derecha y el remodelado vascular propios de este modelo experimental.²⁸⁵ En un modelo porcino de hipertensión pulmonar, tanto el antagonismo ET_A cuanto el dual ET_A/ET_B con bosentán tenía un efecto atenuador de la respuesta hipertensiva asociada a hipoxia.²⁸⁶

En pacientes con hipertensión pulmonar primaria o secundaria a esclerodermia, la administración de bosentán por vía intravenosa reduce la resistencia vascular pulmonar de manera dosis-dependiente.²⁸⁷ Lamentablemente, también produce hipotensión sistémica lo que limita los posibles beneficios del tratamiento agudo por vía intravenosa.²⁸⁷ La experiencia clínica con bosentán oral en la hipertensión pulmonar primaria o asociada a esclerodermia es favorable. Channick y cols²⁸⁸ realizaron un estudio controlado, aleatorizado y doble ciego, en 32 pacientes que recibieron bosentán oral hasta un máximo de 125 mg/12 horas durante 3 meses o placebo. Se observó una caída marcada en la resistencia vascular pulmonar con bosentán e incremento del gasto cardíaco, asociado a una mejoría de los índices objetivos de capacidad funcional. Más recientemente se publicaron los resultados de un ensayo clínico multicéntrico de diseño similar que

agrupó a 213 pacientes asignados de forma aleatoria a recibir placebo o bosentán (125 mg/12 horas o 250 mg/12 horas).²⁸⁹ Los resultados fueron también positivos, con una mejoría significativa en la capacidad funcional de los pacientes tratados con bosentán. Estos hallazgos han servido de base para la aprobación del bosentán en Estados Unidos para el tratamiento de la hipertensión pulmonar.²⁵³

8.4) Bosentán en la prevención del vasoespasmo cerebral.

El vasoespasmo cerebral asociado a la hemorragia subaracnoidea se caracteriza por una vasoconstricción persistente y cambios estructurales de la pared arterial relacionados a disfunción endotelial, proliferación del músculo liso y trombosis. Se considera que la ET-1 puede estar implicada en la fisiopatología de este fenómeno. De hecho, en los modelos experimentales de vasoespasmo inducido por hemorragia subaracnoidea, la administración de bosentán disminuye significativamente la respuesta vasoconstrictora en los vasos cerebrales.^{290,291}

Los resultados de un ensayo clínico aleatorizado y controlado con placebo sugieren que el bosentán, administrado por vía intravenosa, es capaz de atenuar el espasmo arterial cerebral en pacientes con hemorragia subaracnoidea.²⁵²

8.5) Bosentán en la prevención de la reestenosis

Ya hemos visto como los antagonistas de la ET-1 parecen tener un posible papel en la reducción de la proliferación intimal que se produce como respuesta a la agresión vascular. A pesar de su avanzada fase de investigación experimental y clínica en comparación con otros antagonistas de la ET-1, la posible acción antiproliferativa del bosentán no ha sido evaluada hasta el momento de forma apropiada.

El antagonismo dual ET_A/ET_B puede atenuar la respuesta proliferativa en modelos de lesión vascular de pequeños animales de una forma similar a como lo hacen los bloqueantes ET_A .^{221,247,292,293} Específicamente, la eficacia antiproliferativa del bosentán solo se ha probado en estudios experimentales preliminares. En ratas sometidas a daño endotelial en la aorta torácica, la

incorporación de timidina, un marcador de proliferación celular, se redujo un 35% cuando los animales eran pretratados con bosentán.²⁹² El bosentán tiene un efecto atenuador de la proliferación neointimal que sigue al daño vascular producido de distintas formas en las carótidas de conejos.²⁹³ Por último, se ha demostrado que el tratamiento oral con bosentán puede reducir la enfermedad vascular del injerto en un modelo de trasplante cardíaco heterotópico en ratas.²⁹⁴ Cabe pues pensar que el bloqueo no selectivo ET_A/ET_B con bosentán pueda ser beneficioso en la prevención de la respuesta exagerada a la lesión vascular. En el presente estudio se evalúa el papel del bosentán administrado por vía oral y también mediante una novedosa técnica de infusión local sobre la respuesta neointimal generada en arterias coronarias porcinas sometidas a una angioplastia.

II. HIPÓTESIS

El bloqueo de los receptores de endotelina reduce la respuesta proliferativa tras la angioplastia coronaria. La administración local de concentraciones elevadas de bosentán durante la intervención coronaria y directamente sobre la zona de la pared arterial lesionada es tan o más eficaz reduciendo la respuesta mioproliferativa como la administración por vía oral del mismo compuesto, y sin los efectos secundarios que esta pueda tener.

III. OBJETIVOS

- 1- Evaluar los efectos de un antagonista no selectivo ET_A/ET_B de los receptores de endotelina-1 (bosentán) sobre la respuesta mioproliferativa tras la lesión vascular en coronarias porcinas.
- 2- Comparar los efectos de la administración local y administración sistémica por vía oral del antagonista de receptores de endotelina-1 en la formación de tejido neointimal.
- 3- Correlacionar los efectos conseguidos tras el bloqueo local o sistémico de los receptores con la expresión de la endotelina en el tejido neointimal o reestenótico.
- 4- Evaluar la utilidad de la aterectomía direccional como modelo experimental de reestenosis coronaria.

IV. METODOLOGIA

1. Animales de experimentación

Para los experimentos se utilizaron 34 cerdos comunes (Yorkshire) con pesos entre 30-40 kg. El estudio cumplió estrictamente el Real Decreto 223/1988 de 14 de Marzo (B.O.E. del 18 de Marzo) y la Orden de 13 de Octubre de 1989 (B.O.E. del 18 de Octubre) sobre protección de los animales utilizados para experimentación. Se utilizaron 6 animales para el estudio de la eficacia del bosentán oral en el modelo porcino y 28 animales para el estudio de valoración del efecto antiproliferativo del fármaco propiamente dicho.

2. Estudio de eficacia del bosentán oral en el modelo porcino

Dado que los datos por ahora existentes sobre la utilización de bosentán en modelos experimentales se han obtenido en otras especies animales o utilizando vías de administración del fármaco diferentes a la vía oral, en este proyecto se hizo necesario evaluar en primer lugar si la dosis utilizada generalmente en otras especies animales por vía oral es eficaz en nuestro modelo porcino bloqueando de forma significativa los receptores de ET-1 en la pared vascular. Para ello se estudiaron 6 animales en los que, tras inducción anestésica con ketamina (3 mg/kg), propofol (2 mg/kg) y fentanilo (0,15 mg), se procedió a intubación endotraqueal y ventilación mecánica, seguida de canulación quirúrgica de la arteria carótida derecha con un introductor valvulado 6 French (Axxess 6F, Maxxim Medical, Athens, TX, USA). En cada animal se canularon además al menos dos venas superficiales en la oreja para garantizar una administración adecuada de la medicación durante los experimentos. A través del introductor carotídeo se monitorizó de forma continua la presión arterial y la frecuencia cardíaca utilizando un polígrafo convencional de 4 canales (Monitor H-200-XL,

Mennen Medical Inc., NY, USA). Ambas señales se digitalizaron y grabaron en un ordenador personal convencional utilizando el programa DI-200 (DATAQ Instruments, Inc., Akron, EEUU)

Se estudiaron dos grupos de 3 animales (diseño experimental en la figura 5). El grupo de tratamiento recibió una dosis de 30 mg/kg de bosentán por vía oral 2 horas antes de la inducción anestésica y canulación arterial. El fármaco fue amablemente cedido por Actelion Ltd., Allschwil, Suiza y las dosis utilizadas están basadas en otros modelos experimentales (Dr. M. Clozel, comunicación personal). El grupo control no recibió tratamiento previo alguno antes de la inducción anestésica. Se registraron la presión arterial y frecuencia cardíaca basales tras la canulación arterial y siempre después de 10 minutos de espera para la estabilización de las condiciones hemodinámicas del animal. Después de este registro basal se administraron 0,3 nmol/kg de big-ET porcina (Big Endothelin 1, 1-39, Porcine, Novabiochem, Suiza) por vía intravenosa y se registró y grabó la señal de presión y el electrocardiograma de forma continua durante los siguientes 30 minutos. La dosis administrada de big-ET se calculó según el resultado de otros estudios en modelos experimentales similares.^{248,295} Para el análisis de los resultados se utilizaron los valores máximos registrados durante el periodo de monitorización. Se compararon los valores hemodinámicos en condiciones basales y tras la administración de big-ET entre ambos grupos utilizando el análisis de la t de Student (SPSS 8.0, SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Se rechazó la hipótesis nula de igualdad si el valor de p era menor de 0,05.

En condiciones basales, la presión arterial sistólica, diastólica y media estaban significativamente más bajas en el grupo tratado con bosentán que en el grupo control (Tabla 6). La frecuencia cardíaca basal fue similar en ambos grupos. Tras la administración de un bolo intravenoso de big-ET se observó un incremento marcado de la presión sistólica, diastólica y media en el grupo control, mientras este incremento fue significativamente menor en el grupo tratado con bosentán (tabla 7 y figura 6).

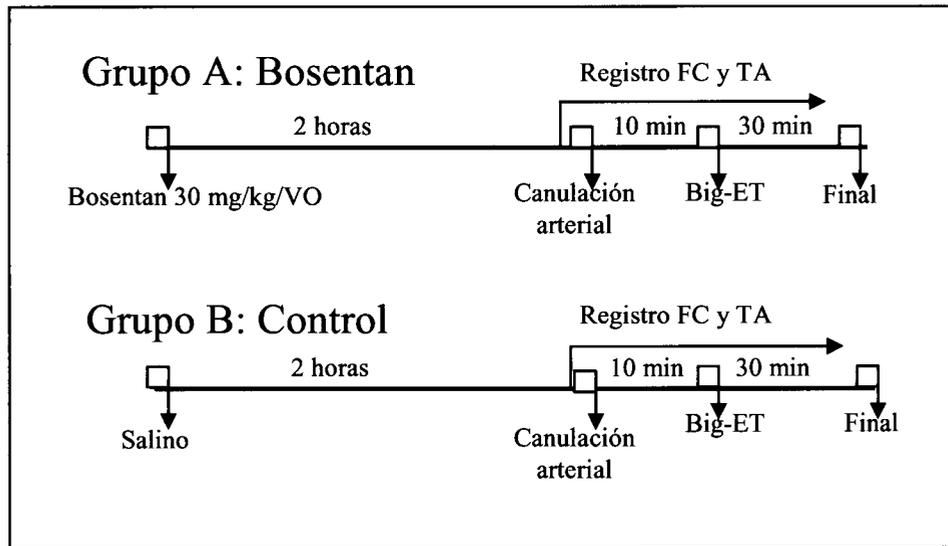


Figura 5: Diseño experimental del estudio de análisis de dosis (detallado en el texto). FC= frecuencia cardíaca, PA= presión arterial, Big-ET= big-endotelina

Tabla 6: estudio de análisis de dosis. Variables hemodinámicas basales.

	Grupo Control	Grupo Bosentán	Valor p
PA sistólica (mm Hg)	151 (12)	109 (6)	0,006
PA diastólica (mm Hg)	112 (11)	80 (6)	0,01
PA media (mm Hg)	128 (13)	95 (7)	0,02
Frecuencia cardíaca (lpm)	99 (11)	104 (12)	0,59

PA= presión arterial. Los valores están representados como media (DE)

Tabla 7: estudio de análisis de dosis. Valores hemodinámicos tras administración de Big-ET.

	Grupo Control	Grupo Bosentán	Valor p
PA sistólica (mm Hg)	209 (11)	128 (3)	< 0,0001
PA diastólica (mm Hg)	146 (1)	100 (5)	< 0,0001
PA media (mm Hg)	171 (6)	115 (4)	< 0,0001
Frecuencia cardíaca (lpm)	98 (9)	93 (3)	0,43
Incremento en la PA media (mm Hg)	42 (8)	20 (10)	0,05
Incremento en la PA sistólica (mm Hg)	58 (3)	19 (9)	0,002
Incremento en la PA diastólica (mm Hg)	34 (12)	19 (10)	0,19

PA= presión arterial. Los valores están representados como media (DE).

Con estos datos se concluyó que, en nuestras condiciones experimentales, una dosis de 30 mg/kg de bosentán por vía oral es capaz de atenuar de forma significativa los efectos fisiológicos de la ET en el cerdo, considerándose esta dosis como apropiada para su uso en el estudio del efecto antiproliferativo del bosentán planteado en este proyecto.

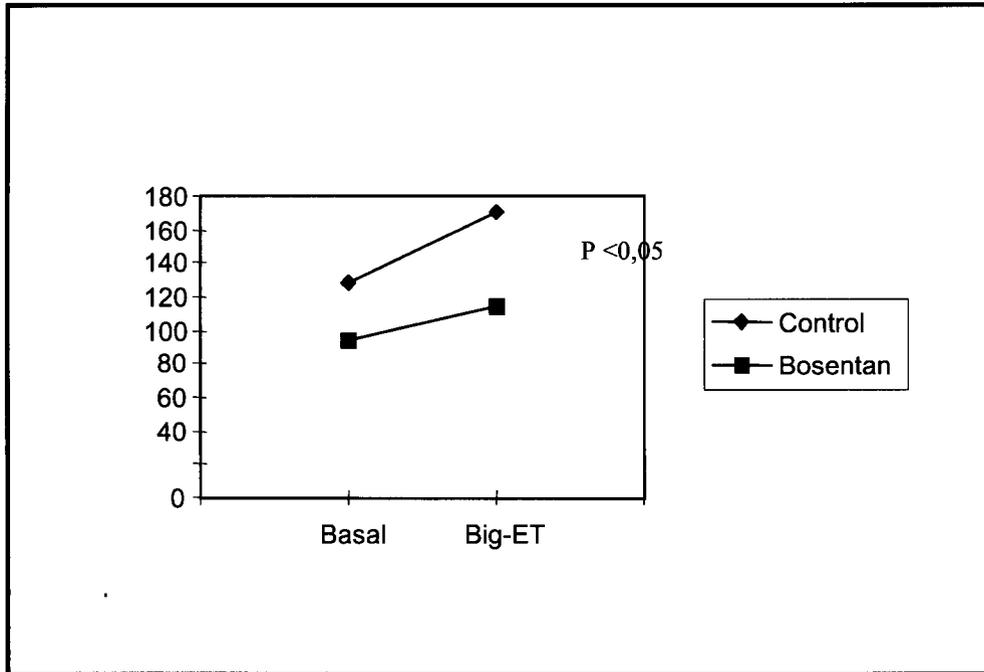


Figura 6: Variación en la presión arterial media entre un grupo de animales tratado con bosentan 30 mg/kg/VO antes de la administración de big-endotelina y un grupo control. El incremento de la presión arterial es significativamente mayor en el grupo control.

3. Grupos de estudio

Para el estudio del efecto antiproliferativo del bosentán como consecuencia de la lesión vascular, los animales fueron asignados a 3 grupos de tratamiento:

- 1) grupo control: no tratamiento farmacológico (n=10);
- 2) grupo de tratamiento sistémico con bosentán (n=9);
- 3) grupo de tratamiento local con bosentán (n=9).

Los animales del grupo control solo recibieron la dosis de heparina no fraccionada inicial tras la canulación arterial y no recibieron ningún otro tratamiento farmacológico durante ni después de la angioplastia. Los animales del grupo de tratamiento sistémico fueron tratados durante los 30 días siguientes a la intervención con bosentán administrado por vía oral (mezclado con pienso en polvo) a una dosis única diaria de 1000 mg (aprox. 30 mg/kg para un animal de 30-35 kg de peso) comenzando dos horas antes de la angioplastia. Esta dosis está basada en la demostración de una inhibición funcional significativa con bosentán de los efectos de la big-ET en el subestudio descrito previamente.

Los animales del grupo de tratamiento local recibieron una dosis única de bosentán (30 mg en 1 ml de suero salino isotónico), administrado a través de la ventana del aterotomo y sobre la superficie vascular dañada inmediatamente después de realizados los cortes en la pared arterial y antes de la retirada del aterotomo. Esta dosis es empírica y se eligió por ser la máxima concentración posible para el volumen total administrado a través de la ventana del aterotomo. La infusión local se hizo de forma lenta (durante 1 minuto) y habiéndose rellenado previamente el interior del aterotomo con la solución del fármaco para asegurarse que, desde el inicio de la instilación local el fármaco entraba en contacto con la superficie vascular dañada.

4. Aterectomía direccional en coronarias porcinas

Tras inducción anestésica, intubación endotraqueal y ventilación mecánica, se canuló la arteria femoral derecha donde se colocó un introductor valvulado 10 French (Fast-cath, Diag Corporation, Minnetonka, MN, USA). Previa administración de 100 U/Kg de heparina no fraccionada (Heparina 5%, ROVI S.A., Madrid) por vía intraarterial, se realizó el sondaje selectivo de la arteria coronaria izquierda o derecha utilizando un catéter guía 9,5 French (DVI, Inc. Temecula, CA, USA). A continuación se avanzó una guía de angioplastia de 0.014" hasta el segmento proximal de la arteria coronaria a tratar, y sobre la guía se avanzó el aterotomo direccional de Simpson (AtheroCath GTO 7F, DVI, Inc. Temecula, CA, USA). Para inducir la lesión en la pared coronaria, se infló el balón del dispositivo hasta una presión de 2 atmósferas y a continuación se realizó un total de 4 avances de la cuchilla sobre la pared arterial sin modificar la posición del aterotomo (figura 7). Tras desinflar el balón, se retiró el aterotomo y se realizó una angiografía de control para valorar la permeabilidad del vaso lesionado.

5. Tratamiento local con el aterotomo direccional de Simpson

Los animales asignados a tratamiento local con bostentán recibieron el fármaco únicamente a través del aterotomo (figura 8). El aterotomo de Simpson dispone de tres luces: una para permitir el paso de la guía de angioplastia, otra para inflar y desinflar el balón y una tercera para permitir el purgado de la ventana distal que permite el contacto entre la cuchilla y la pared vascular. La infusión local se realizaba en este modelo experimental a través de esta última. Para ello, antes de situar el dispositivo en el interior de la coronaria, esta luz era debidamente purgada y después rellenada con la solución que contenía el fármaco de estudio, en un total de 1 ml, para asegurar que todo el volumen administrado durante la infusión en la pared arterial a través de la ventana del aterotomo contenía la misma concentración del fármaco. Se dejaba conectada la jeringa con

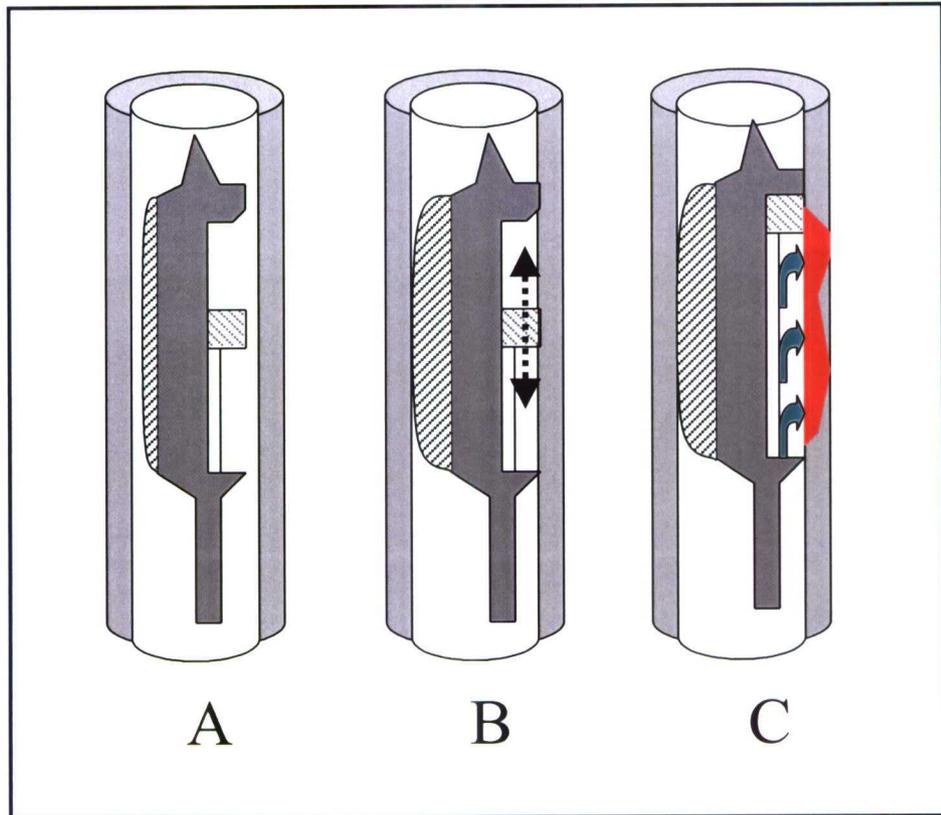


Figura 7: Representación esquemática del procedimiento de aterectomía. A: el aterotomo es situado en un segmento de la coronaria libre de ramas laterales importantes. B: tras el inflado del balón la cuchilla del dispositivo se apoya en la pared contralateral de la arteria, se acciona el movimiento de la misma y se efectúan los avances para lograr una lesión en la pared. C: en los animales asignados a tratamiento local se infunde el fármaco antes del desinflado del balón sobre la zona lesionada.

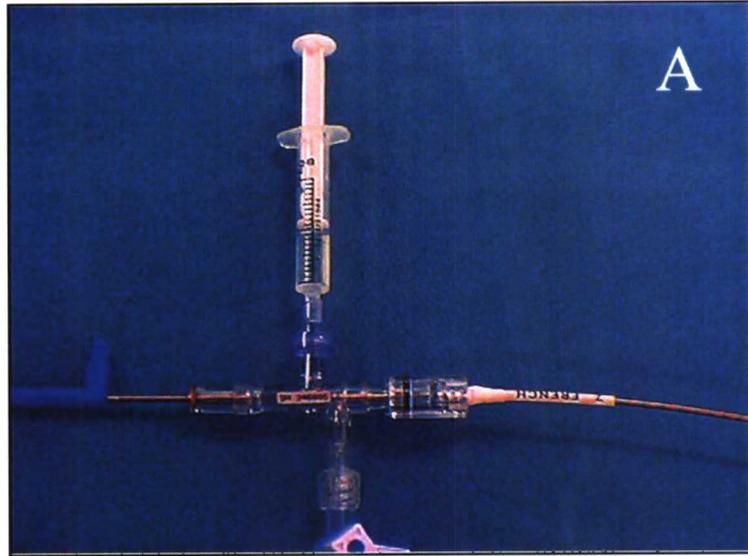


Figura 8: Detalle del extremo proximal del aterotomo de Simpson (figura 8A), con la solución farmacológica preparada para la infusión local (figura 8B).

la solución farmacológica conteniendo 1 ml adicional para la infusión local, para su administración después de realizada la aterectomía (figura 8 A).

Tras realizar los cortes en la pared arterial tal y como se describe en el apartado previo, se mantenía el balón del dispositivo inflado para asegurar una correcta aposición de la ventana del aterotomo sobre la superficie vascular dañada. En esta situación se infundía la solución conteniendo 30 mg de bosentán en un volumen total de 1 ml a través de la luz del dispositivo.

6. Procesamiento y análisis morfométrico de las muestras

Después de 30 días con dieta normal administrada *ad libitum*, los animales fueron sacrificados y sus arterias coronarias se procesaron para valoración histomorfométrica de la respuesta mioproliferativa tras la angioplastia coronaria. En el momento del sacrificio, se anestesiaron de nuevo los animales y tras intubación endotraqueal y ventilación mecánica, se les practicó una esternotomía media seguida de clampaje de la aorta ascendente, apertura de drenaje venoso y perfusión a presión fisiológica (80 mmHg) de las arterias coronarias con una solución de PBS (tampón fosfato salino, 1 l) seguida de paraformaldehído al 4% hasta la correcta fijación en distensión del árbol coronario. Después se procesaron los segmentos coronarios intervenidos para histomorfometría realizándose 10 secciones transversales a intervalos de 2 mm en cada área vascular de interés. Todas las secciones fueron teñidas convencionalmente con hematoxilina-eosina, tinción tricrómica de Masson y orceína. Para la estimación del grado de daño vascular inducido por la aterectomía, se utilizó una clasificación basada en el “score” previamente publicado por Schwartz y cols,⁵⁸ con las modificaciones necesarias para ajustarse a las características específicas del dispositivo de angioplastia utilizado en nuestro estudio (tabla 8). En el análisis morfométrico se midió el área del vaso (área contenida en la lámina elástica externa -LEE), el área de neointima, el área de la capa media y el área de la luz. Todas las mediciones se realizaron en la sección con mayor grado de lesión en cada arteria y en un segmento de referencia sin lesión de la pared vascular.

Tabla 8: Clasificación o “score” del grado de lesión de la pared arterial.

Grado	Hallazgos
0	Ausencia de daño vascular
1	Daño limitado a la íntima. LEI íntegra.
2	LEI rota. Afectación $\leq 25\%$ de la circunferencia del vaso. La adventicia está respetada.
3	LEI rota. Afectación $>25\%$ de la circunferencia arterial. La adventicia está respetada.
4	LEE rota. Afectación $\leq 25\%$ de la circunferencia del vaso.
5	LEE rota. Afectación $>25\%$ de la circunferencia del vaso.

LEI = lámina elástica interna, LEE = lámina elástica externa.

Para el análisis morfométrico se excluyeron aquellas arterias sin lesión vascular apreciable o con lesión leve sin discontinuidad de la lámina elástica interna (LEI) (score < 2), ya que al igual que en otros modelos experimentales similares, es necesario la existencia de lesión vascular significativa, con rotura al menos de la LEI, para inducir una respuesta mioproliferativa suficiente y susceptible de inhibición con intervenciones farmacológicas o de otro tipo.⁵⁸ Las mediciones morfométricas fueron realizadas por dos investigadores de forma independiente y los valores discrepantes fueron resueltos mediante consenso y participación de un tercer investigador. Para el análisis morfométrico se utilizó el programa informático Qwin de Leica v. 5,0 (Leica Imaging Systems Ltd, Cambridge, Inglaterra).

7. Inmunohistoquímica para endotelina en la pared vascular

Para la localización inmunohistoquímica de endotelina en la pared vascular, se escogió la sección con mayor daño de la pared en cada una de las arterias tratadas. Las secciones así seleccionadas fueron desparafinadas, rehidratadas e incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente con una

solución de albúmina bovina al 3% y solución salina tamponada Triton-X 0,5M Tris (TBT) al 0,05%. Después, las secciones se incubaron durante la noche con una dilución 1:800 de un anticuerpo policlonal de conejo anti-ET-1 (Peninsula Laboratories, Inc., Belmont, USA). Posteriormente, se incubaron durante 20 minutos con un anticuerpo secundario marcado con biotina (anticuerpo de ratón antiinmunoglobulina de conejo) según las directrices del fabricante. A continuación y tras un lavado, las secciones se incubaron durante 20 minutos con estreptavidina fosfatada alcalina. Después, la actividad fosfatasa se pone de manifiesto utilizando un colorante rojo (Fast Red chromogen, Sigma, St Louis, USA) que tiñe las zonas de inmunoreacción del anticuerpo primario con el antígeno específico, en nuestro caso la endotelina. Finalmente, las secciones fueron teñidas suavemente con hematoxilina de Mayer. Como controles, se utilizaron secciones de tejido incubadas con el anticuerpo primario previamente tratado con una solución de 10nM de ET-1 y secciones incubadas con suero normal de conejo en lugar de anticuerpo primario.

8. Análisis estadístico

Se comparó la respuesta proliferativa tras la lesión vascular en los 3 grupos de tratamiento considerándose el área neointimal en términos absolutos como variable dependiente. Las variables continuas se compararon, por grupos de tratamiento, con el test de Kruskal-Wallis.

Se realizó un análisis de regresión lineal múltiple para la evaluación de la proliferación neointimal en los distintos grupos de tratamiento, utilizando en el modelo como variables independientes el score o grado de lesión vascular, el área de referencia del vaso, y el área total del vaso en la zona de lesión para la corrección de las posibles diferencias en el tamaño de los vasos y los cambios geométricos debidos al corte en la pared arterial. Se evaluaron las interacciones entre tratamiento y las variables independientes. Se presentan los betas ajustados y su intervalo de confianza al 95%. Se consideraron significativos los valores de p inferiores a 0,05.

V. RESULTADOS

Durante la angioplastia coronaria 2 animales fallecieron debido a oclusión trombótica aguda y fibrilación ventricular (1 en el grupo de tratamiento local y 1 en el grupo de tratamiento sistémico). Además, se excluyeron del análisis morfométrico 2 arterias en el grupo control y 3 arterias en el grupo de tratamiento local por no presentar lesión de la pared arterial más allá de la LEI a pesar de haber realizado la aterectomía coronaria, y 1 arteria más en cada uno de los 3 grupos de tratamiento por presentar una rotura vascular masiva (afectando a la práctica totalidad de la circunferencia arterial) haciéndose imposible la realización de las mediciones morfométricas descritas. Componen pues, finalmente, los grupos de estudio 7 arterias en el grupo control, 7 arterias en el grupo de tratamiento sistémico, y 4 arterias en el grupo de tratamiento local.

1. Tamaño del vaso, grado de lesión y proliferación neointimal

En la tabla 9 se detallan las mediciones morfométricas realizadas en los 3 grupos de estudio. Como dato a destacar, se observó de manera generalizada un aumento significativo en el área del vaso en el segmento sometido a la aterectomía, con respecto al área del vaso en la zona de referencia en los tres grupos de estudio (área del vaso en el segmento lesionado $4,16 \pm 1,40 \text{ mm}^2$; área del vaso en el segmento de referencia $3,25 \pm 1,52 \text{ mm}^2$, $p = 0,026$). Existía una correlación positiva entre este incremento, o estiramiento del vaso, producido por la aterectomía y el área de proliferación neointimal medida a los 30 días de la intervención ($r = 0,69$; $p < 0,001$) (Figura 9). También se encontró una correlación positiva entre el grado de lesión valorado mediante el score, y el área de proliferación neointimal ($r = 0,71$; $p < 0,001$) (Figura 10).

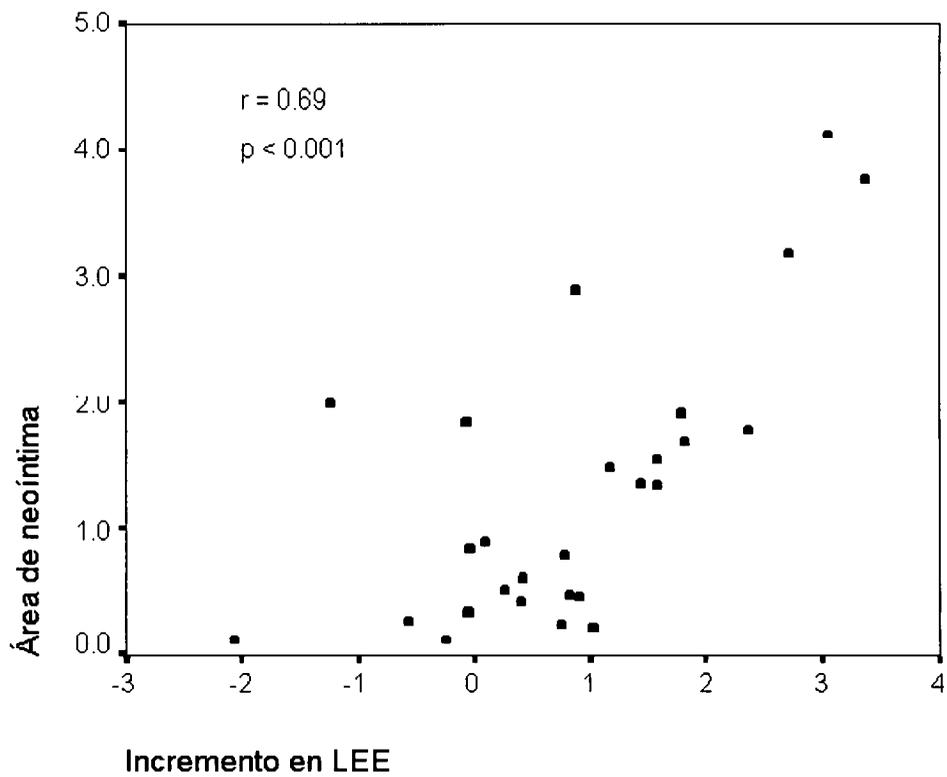


Figura 9: Gráfico de regresión lineal que demuestra la correlación entre el incremento del área de lámina elástica externa (LEE) y el área de neointima. Incremento en LEE = (LEE en el segmento con mayor grado de daño) – (LEE en el segmento de referencia)

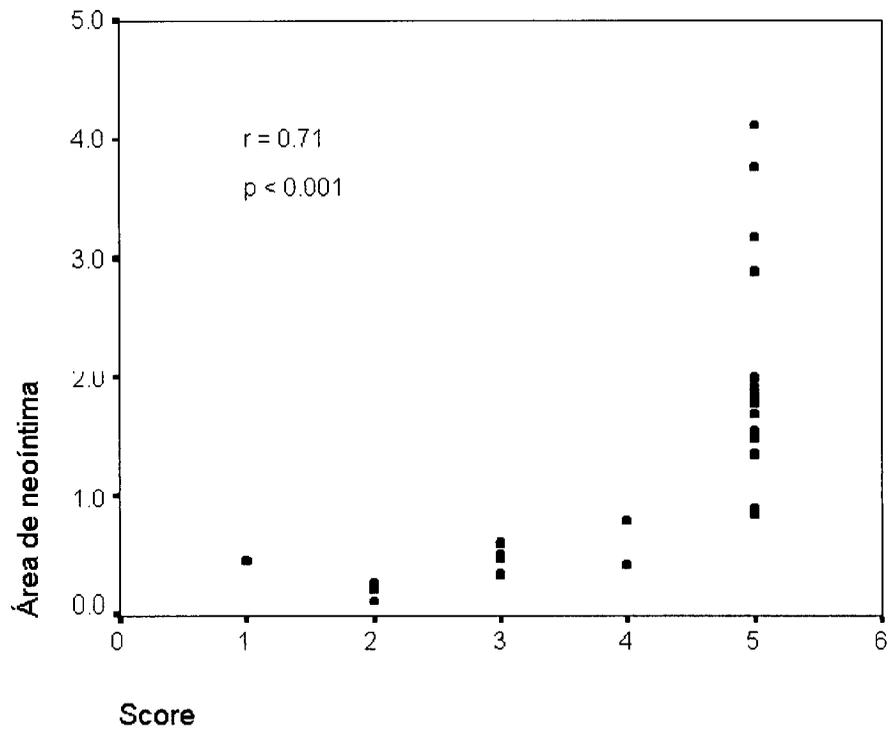


Figura 10: Correlación entre el score de daño y el crecimiento neointimal.

Tabla 9: Variables morfométricas medidas en los tres grupos de estudio. Los valores están representados como medias (desviación estándar).

	Control (n = 7)	Sistémico (n = 7)	Local (n = 4)	P (k-w)
Área LEE-ref (mm ²)	3,07 (1,98)	3,61 (1,49)	2,91 (0,48)	0,53
Área LEE-les (mm ²)	4,09 (1,70)	4,59 (1,24)	3,54 (1,10)	0,39
Score	4,6 (0,8)	4,6 (0,8)	4,0 (1,2)	0,59
Área neoíntima (mm ²)	1,60 (1,10)	1,15 (0,53)	1,13 (0,80)	0,69
Neoíntima/Área LEE-les	0,37 (0,14)	0,26 (0,12)	0,30 (0,19)	0,30

LEE-les = lámina elástica externa del segmento lesionado. LEE-ref = lámina elástica externa del segmento de referencia.

2. Tratamiento con bosentán y proliferación neointimal

En términos absolutos el área de neoíntima fue algo mayor en el grupo control que en ambos grupos de tratamiento, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa (tabla 9). Cuando la respuesta proliferativa se corrigió para el tamaño del vaso (relación neoíntima/área de LEE) se observó una tendencia a una menor respuesta proliferativa en los dos grupos de tratamiento ($0,30 \pm 0,19$ en el grupo local y $0,26 \pm 0,12$ en el grupo sistémico, frente a $0,37 \pm 0,14$ en el grupo control), a pesar de un grado de daño similar (score $4,6 \pm 0,8$ en grupo control, $4,0 \pm 1,2$ en grupo local y $4,6 \pm 0,8$ grupo sistémico).

Se construyó un modelo de regresión lineal múltiple incluyendo los dos grupos de tratamiento, el score de daño y áreas de LEE en el segmento de referencia y en el segmento de lesión (tabla 10). Mediante este análisis se observó una correlación negativa independiente significativa entre el tratamiento sistémico con bosentán y el grado de proliferación neointimal (coeficiente beta = $-0,56 \text{ mm}^2$; IC 95% $-1,1/-0,02$; $p = 0,045$). Por otro lado, no se observó correlación significativa entre el tratamiento local con bosentán y el área neointimal (coeficiente beta = $-0,02 \text{ mm}^2$; IC 95% $-0,67/0,64$; $p = 0,96$). El gráfico de la

figura 11 expresa la relación entre el tamaño del vaso y la proliferación neointimal observada en los 3 grupos de estudio. Se observa que la pendiente de la relación entre el área de neointima y el tamaño de la arteria era significativamente menor en el grupo de tratamiento sistémico comparado con el grupo control y el grupo de tratamiento local ($p = 0,001$). Para un análisis más preciso de los efectos del tratamiento sistémico con bosentán sobre la proliferación neointimal se construyó un segundo modelo de regresión lineal múltiple que incluye la interacción entre el grupo de tratamiento sistémico y el área de LEE (interacción grupo sistémico-área LEE). Los datos se encuentran reflejados en la tabla 11. En la figura 12 se muestran ejemplos representativos de las secciones arteriales de cada grupo.

Tabla 10: Análisis de regresión para el estudio del área de neointima ($R^2 = 0,78$; $p = 0,001$)

	<i>Coefficiente B</i>	<i>IC 95%</i>	<i>p</i>
Univariado			
Control x Sistémico	-0,44	-1,41 / 0,53	0,53
Control x Local	-0,46	-1,60 / 0,68	0,40
Área LEE-les	0,38	0,14 / 0,62	0,005
Área LEE-ref	0,09	-0,20 / 0,38	0,51
Score	0,65	0,26 / 1,03	0,003
Multivariado			
Control x Sistémico	-0,56	-1,11 / -0,02	0,045
Control x Local	-0,02	-0,67 / 0,64	0,96
Área LEE-les	0,54	0,24 / 0,84	0,002
Área LEE-ref	-0,28	-0,52 / -0,04	0,024
Score	0,34	-0,01 / 0,70	0,054

LEE-les = lámina elástica externa medida en el segmento lesionado; LEE-ref = lámina elástica externa medida en el segmento de referencia,

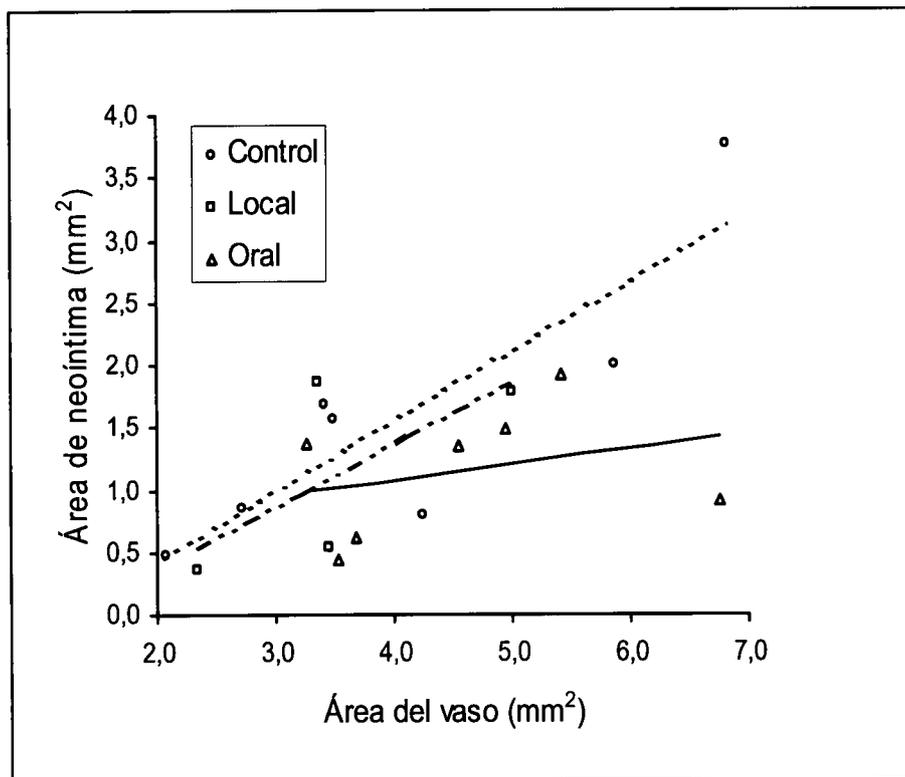


Figura 11: Correlación entre el área del vaso (área de la lámina elástica externa) y área neointimal entre los diferentes grupos de tratamiento. La pendiente de la interacción es diferente en el grupo I (grupo de tratamiento sistémico) comparada con los demás grupos.

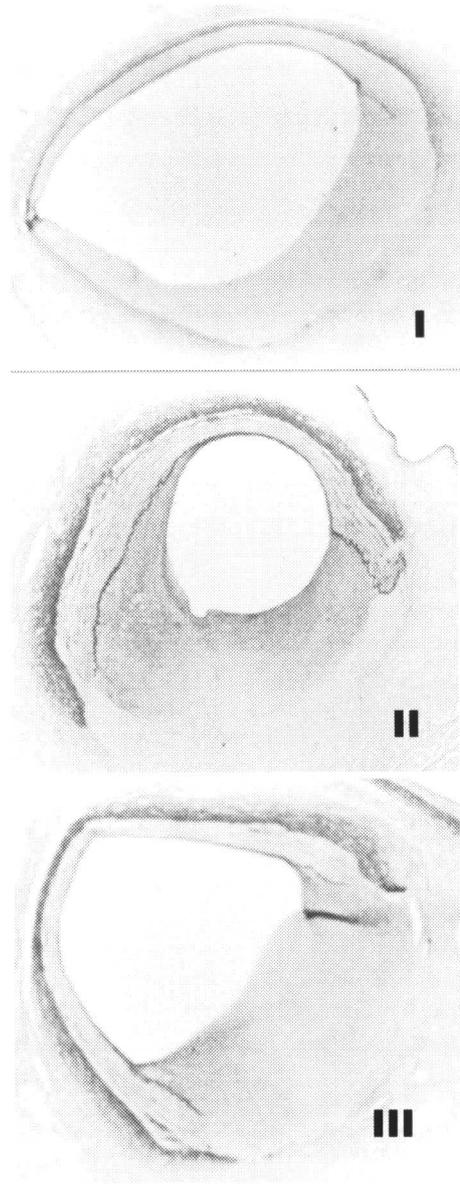


Figura 12: Secciones representativas (orceína) de los animales tratados con bosentán por vía sistémica (I), bosentán administrado por la ventana del aterotomo (II) y control (III). Se observa como la administración del fármaco por vía oral reduce la cantidad de neointima en comparación con los demás grupos, a pesar de una profundidad de corte similar (daño a la adventicia).

Tabla 11: Análisis de regresión lineal múltiple incluyendo la interacción entre área de LEE y asignación a grupo de tratamiento sistémico ($R^2 = 0,91$; $p < 0,001$). La variable dependiente es el área de neointima.

	Coefficiente B	IC 95%	p
Control x Sistémico	1,045	-0,40 / 2,49	0,13
Interacción grupo-área LEE	-0,37	-0,68 / -0,06	0,026
Área LEE-les	0,77	0,51 / 1,03	0,0001
Área LEE-ref	-0,34	-0,54 / -0,14	0,005
Score	0,30	-0,03 / 0,62	0,068

LEE-les = lámina elástica externa medida en el segmento lesionado; LEE-ref = lámina elástica externa medida en segmento de referencia. Interacción grupo-área LEE representa la variable construida a partir de la interacción entre el tratamiento sistémico con bosentán y el tamaño del vaso.

3. Inmunolocalización de la endotelina en la pared vascular.

Las secciones controles incubadas con suero de conejo normal o con anticuerpo primario preincubado con ET-1 no demostraron tinción específica alguna. En los segmentos no dañados de los vasos se observó inmunoreactividad para ET en el endotelio y en la adventicia, en zonas adyacentes a las células endoteliales capilares. En las zonas dañadas, se encontró tinción para ET también en el tejido neointimal, sobre todo en los bordes rotos de la capa media. Mediante una escala semicuantitativa de tinción roja de leve a moderada y severa, se demostró que las arterias de los animales tratados con bosentán oral tenían menos zonas ET-positivas que los animales tratados con bosentán local o los del grupo control (figura 13).

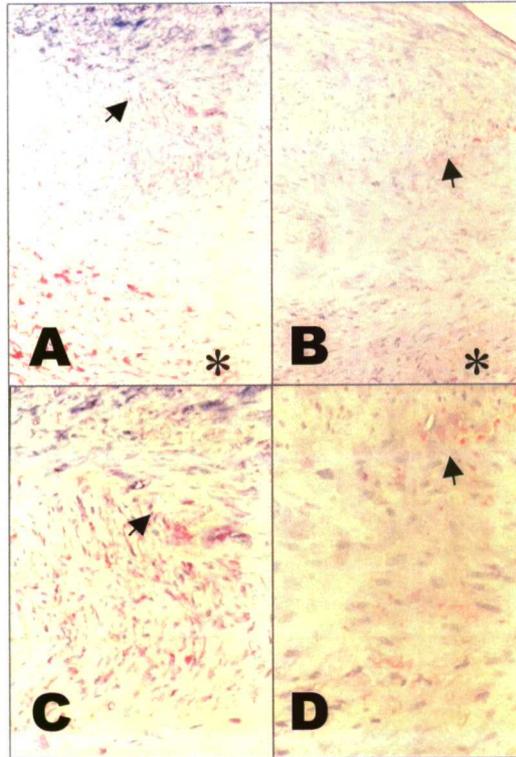


Figura 13: Inmunohistoquímica para endotelina-1.

(A) Segmento arterial de un animal control: abundante ET-1 (tinción en rojo) en el tejido neointimal (flecha) y en la adventicia (*). (B) animal tratado con bosentán oral. Se observa menor tinción de ET-1 en tejido neointimal (flecha) y adventicia (*) (A y B= x250). (C) y (D) las imágenes A y B, respectivamente, están magnificadas (x400); se observa una imagen más cercana del tejido neointimal.

VI. DISCUSIÓN

En el presente estudio se analizan los efectos del antagonismo de los receptores ET_A y ET_B con bosentán sobre el proceso de reparación vascular en un modelo porcino de lesión coronaria. Se evaluó el papel del fármaco administrado por vía oral y también a través de la instilación local directamente sobre la zona de lesión, haciendo uso de ciertas características especiales del aterotomo direccional. Los datos obtenidos demuestran que la administración oral de bosentán inhibe parcialmente la proliferación neointimal que sigue a la intervención coronaria en este modelo experimental. La cantidad de tejido neointimal, medido por el área de neointima a los 30 días de la angioplastia, se correlacionó de forma positiva con el incremento del área del vaso en la zona de lesión y con la profundidad del corte realizado. Después de la corrección para estos dos indicadores del grado de lesión vascular, y también para el tamaño total del vaso, la formación de neointima fue significativamente menor en los animales tratados con bosentán oral que en los animales del grupo control (tablas 10 y 11). Por otro lado, la vía de administración local utilizada en este estudio resultó ineficaz reduciendo la proliferación neointimal tras la intervención coronaria.

1. Aterectomía direccional y proliferación neointimal

En este estudio se utilizó la aterectomía direccional como herramienta de lesión vascular. En el modelo porcino de reestenosis coronaria la forma más frecuente de inducir la lesión es la dilatación con balón y, más recientemente, la implantación de stents sobredimensionados. No obstante, se decidió utilizar el aterotomo de Simpson en base a una serie de potenciales ventajas. En primer lugar, por la posibilidad de conseguir un daño más severo y controlable que el producido por el balón de angioplastia o los stents. De hecho, en más de la mitad de las muestras arteriales el corte llegaba a la adventicia, en contraste con la severidad del daño conseguido en otros estudios similares, donde la lesión suele limitarse a la capa media.^{58,251} Considerando que la profundidad y extensión del daño se correlacionan con la severidad de la respuesta reparadora,^{45,58} se puede

inferir que este método induce una reacción vascular muy apropiada para la evaluación de fármacos con potencial antiproliferativo. En contrapartida, el número de animales con muestras válidas para el análisis final era más reducido que lo esperado, ya que 5 de los 28 cerdos no pudieron ser utilizados debido a la agresividad de la técnica, incluyendo 2 animales fallecidos debido a complicaciones agudas de la intervención coronaria. Con respecto a estos últimos datos, cabe reseñar que la no utilización de agentes antiplaquetarios en nuestros experimentos pudo influir en la tasa de trombosis aguda.

La severidad del daño vascular con la aterectomía, medida por el score diseñado en este estudio, tenía una correlación positiva clara con el grado de proliferación ($R = 0,71$; $p < 0,001$), de una forma similar a la observada en otros estudios.⁴⁵ Sin embargo, la clasificación del grado de lesión no fue la única variable utilizada para la cuantificación del daño. La aterectomía direccional, al modificar la arquitectura vascular, produce un aumento global de la circunferencia del vaso como parte del mecanismo de dilatación.^{41,42} En este estudio se pudo comprobar una relación muy estrecha entre esta dilatación y la severidad del daño, y consecuentemente una correlación clara con el grado de proliferación neointimal en todos los grupos de estudio ($R = 0,69$; $p < 0,001$). Estos hallazgos parecen específicos de la aterectomía, ya que no están descritos en otros modelos experimentales. Para permitir una correcta valoración de los efectos del fármaco en este modelo, esta expansión de la circunferencia arterial fue una de las variables incorporadas al análisis multivariado.

Además de las consideraciones relacionadas a la severidad de la lesión, la aterectomía aportaba como ventaja adicional la posibilidad de, con el mismo dispositivo de dilatación, realizar una infusión local del fármaco a elevadas concentraciones y que impactara contra la pared arterial. A pesar de que existen dispositivos específicamente diseñados para el tratamiento farmacológico local, la utilización de la ventana del aterotomo permitía infundir la droga en el exacto sitio de la lesión y además de una forma menos costosa. Este estudio no estaba diseñado para analizar la eficacia de esta metodología como vehículo de instilación de drogas y en este sentido se desconoce el tiempo de permanencia del fármaco en el local de infusión. No se puede descartar, por lo tanto, que una de las

razones para el fracaso del grupo de bosentán local en inhibir el crecimiento neointimal podría ser la escasa actuación del fármaco en el sitio de lesión.

Por último, con respecto al modelo experimental con stents intracoronarios, la aterectomía direccional cuenta con la ventaja de un coste económico mucho más reducido, ya que un mismo aterotomo puede servir para varios experimentos. Además, la preparación histológica de las arterias sometidas a aterectomía no necesita ningún dispositivo especial para el corte de las muestras, como en el caso de los stents intracoronarios. En la época en que se diseñó este estudio, el desarrollo de los stents recubiertos por polímeros que pueden servir como vehículo de tratamiento local estaba en su fase más preliminar.

2. Antagonismo de los receptores de endotelina y proliferación neointimal: estudios previos

La mayoría de los datos que apoyan un papel antiproliferativo de la inhibición de la ET-1 procede de experimentos con fármacos selectivos para los receptores ET_A.²²¹ El receptor ET_A es el que predomina en las CML y es el principal mediador de la respuesta vasoconstrictora y proliferativa producida por la ET-1. Por otro lado, el receptor ET_B tiene, en condiciones fisiológicas, una acción relajante del músculo liso y antiproliferativa, mediada de forma indirecta a través del endotelio.²⁰³ Teniendo en cuenta estos factores, parecería más apropiado el bloqueo selectivo ET_A. Sin embargo, los receptores ET_B también están presentes en las CML en una concentración variable que depende de la especie animal y de las condiciones experimentales, donde ejercen una acción similar a la de los receptores ET_A.²⁰⁵ El equilibrio habitual entre los efectos de los dos subtipos de receptores puede estar alterado cuando ya se ha avanzado en el proceso de aterosclerosis o reestenosis, condiciones en las que aumenta la subpoblación de receptores ET_B en la pared vascular⁵⁸ y en las que no se cuenta con un endotelio funcionalmente normal. El presente estudio demuestra por primera vez en el modelo porcino de angioplastia coronaria que un antagonista mixto ET_A/ET_B de los receptores de ET-1 es capaz de atenuar la respuesta celular. No es posible, sin embargo, comparar la magnitud de estos efectos con los

producidos por los bloqueantes selectivos ET_A en otros trabajos. La controversia sobre la estrategia antiproliferativa más eficaz, en concreto, antagonismo dual ET_A/ET_B o selectivo ET_A, solo se podrá resolver con estudios específicamente diseñados.

Los resultados aquí presentados contrastan con los de un estudio reciente en el que se evalúa un bloqueante mixto ET_A/ET_B (L-749,329) en un modelo porcino de daño vascular con stents,²⁵¹ en el que se observó una reducción no significativa de la proliferación neointimal. Estas diferencias se pueden explicar por varios factores. En primer lugar, el tipo y el grado de daño producido por la aterectomía direccional es considerablemente diferente del que produce la implantación de stents. Al realizarse un corte profundo de parte de la pared arterial, con pérdida de parte de las tres capas de la arteria, incluida la lámina elástica externa, se induce la formación de una cantidad de tejido de reparación mucho mayor que la provocada por las fracturas puntuales de los stents sobre la estructura vascular. De hecho, en el estudio del L-749,329²⁵¹ el score medio estimado en el grupo de tratamiento con el fármaco era de 2,07, lo que refleja daño de la lámina elástica interna y de la capa media, con rotura de la lámina elástica externa en la minoría de los casos. Es posible, por lo tanto, que el mayor grado de lesión y mayor volumen de tejido neointimal formado permita una mejor apreciación de los efectos antiproliferativos del antagonismo de la ET-1. En segundo lugar, entre los dos estudios se han utilizado métodos diferentes de cuantificar el tejido neointimal formado. La práctica de medir el grosor de la neointima en lugar del área, como utilizado en el estudio con L-749,329, puede llevar a diferentes conclusiones. En general, es más difícil observar diferencias en el cambio de la cantidad de tejido midiendo solamente su grosor. En el caso de la aterectomía direccional se produce un corte selectivo en la pared que tiene profundidad variable y, a diferencia de la implantación de stents, la proliferación neointimal no es uniforme a lo largo de la circunferencia del vaso, por lo que las mediciones del área son las únicas válidas. Por último, las diferentes vías de administración del fármaco (oral frente a intravenosa) pueden haber resultado en una distribución diferente del antagonista de la ET-1 en los tejidos diana, favoreciendo la mayor eficacia del bosentán en nuestro estudio.²⁵¹

3. Tratamiento local frente a tratamiento sistémico

En el presente trabajo se intentó aprovechar las características del aterotomo para infundir el fármaco directamente sobre el lugar de la lesión. Esta técnica permite utilizar de forma sencilla un mismo dispositivo para inducir la lesión coronaria y el tratamiento local con fármacos, aunque es importante reseñar que no ha sido evaluada previamente en otros estudios. El bosentán se administró en una única dosis a elevadas concentraciones, pocos segundos después de los cortes en la pared arterial. En estas condiciones experimentales no se observó una reducción del área de neoíntima respecto al grupo control.

La administración local de fármacos para la prevención de la reestenosis es una alternativa muy atractiva de tratamiento, ya ensayada por varios grupos de investigadores y con algunos resultados positivos, básicamente en estudios preclínicos. En muchos casos, el tratamiento local supone la utilización de un catéter diferente del utilizado para tratar las estenosis coronarias, lo que representa un coste adicional y aumenta la complejidad de la revascularización percutánea, además de no asegurar que toda la superficie vascular dañada esté adecuadamente cubierta con el fármaco. Por este motivo, los dispositivos que pueden servir al mismo tiempo para el tratamiento percutáneo de las lesiones y para la aplicación local de sustancias antiproliferativas tienen un interés evidente. En este contexto, el recubrimiento de los stents con fármacos con potencial antiproliferativo, recientemente incorporado al campo experimental y clínico, representa el mayor avance en la búsqueda de una solución eficaz de la reestenosis.^{165,167}

Son varias las razones que explicarían la falta de efecto antiproliferativo del bosentán administrado por vía local y en dosis única en la pared arterial en nuestro estudio. El aumento en la expresión de receptores de ET-1 en la pared vascular tiene lugar entre los días 1 y 3 para el receptor ET_B y 3 y 7 para el receptor ET_A tras la angioplastia, según un estudio hecho en un modelo de angioplastia carotídea en ratas.²¹⁹ Esta secuencia temporal de eventos sugiere que

una inhibición muy precoz y no continuada de estos receptores no actuaría durante todas las etapas en que la ET-1 pueda jugar su papel en el proceso reparador de la pared vascular. En nuestro estudio, no se valoró el tiempo de permanencia del bosentán instilado en la pared vascular, y, a pesar de infundirse el fármaco con la arteria coronaria ocluida y la ventana del aterotomo firmemente incrustada en la pared vascular, no se puede descartar que una vez retirado el catéter de aterectomía se produzca un rápido lavado del fármaco hacia la circulación distal. Finalmente, no se puede descartar tampoco que la aplicación directa del fármaco sobre la pared tuviera un efecto tóxico o irritante que contrarrestara cualquier efecto antiproliferativo. De todos modos, no sería adecuado extrapolar estos resultados a otras estrategias de tratamiento local con bosentán. Reconociendo la eficacia del fármaco por vía sistémica, es razonable suponer que alguna forma de administración local más eficaz que la presentada en este trabajo, en una plataforma de liberación lenta como pudiera ser un stent recubierto de polímero, sería una aproximación más atractiva que el tratamiento oral a dosis elevadas y con potencial para efectos adversos.

4. Integración de los resultados en la fisiopatología de la reestenosis coronaria

Los resultados de este estudio confirman la hipótesis previa de una acción antiproliferativa del bosentán en el tejido vascular. Con base en los mecanismos biológicos involucrados en la aterogénesis y reestenosis, se entiende que las ET tienen un papel muy precoz en la transformación y proliferación celular y, posteriormente, en la formación de la matriz extracelular (figura 14). La ET-1 es liberada inicialmente por el endotelio en respuesta a una lesión, como el estiramiento del vaso producido por el dispositivo de dilatación coronaria o cambios en el estrés de corte.^{196,197} Además, una vez producida la respuesta trombótica, algunos mediadores procoagulantes como la trombina, pueden potenciar la liberación de ET-1.^{296,297} A su vez, la activación plaquetaria y de células inflamatorias promueven un estímulo adicional a la producción de ET-1 a

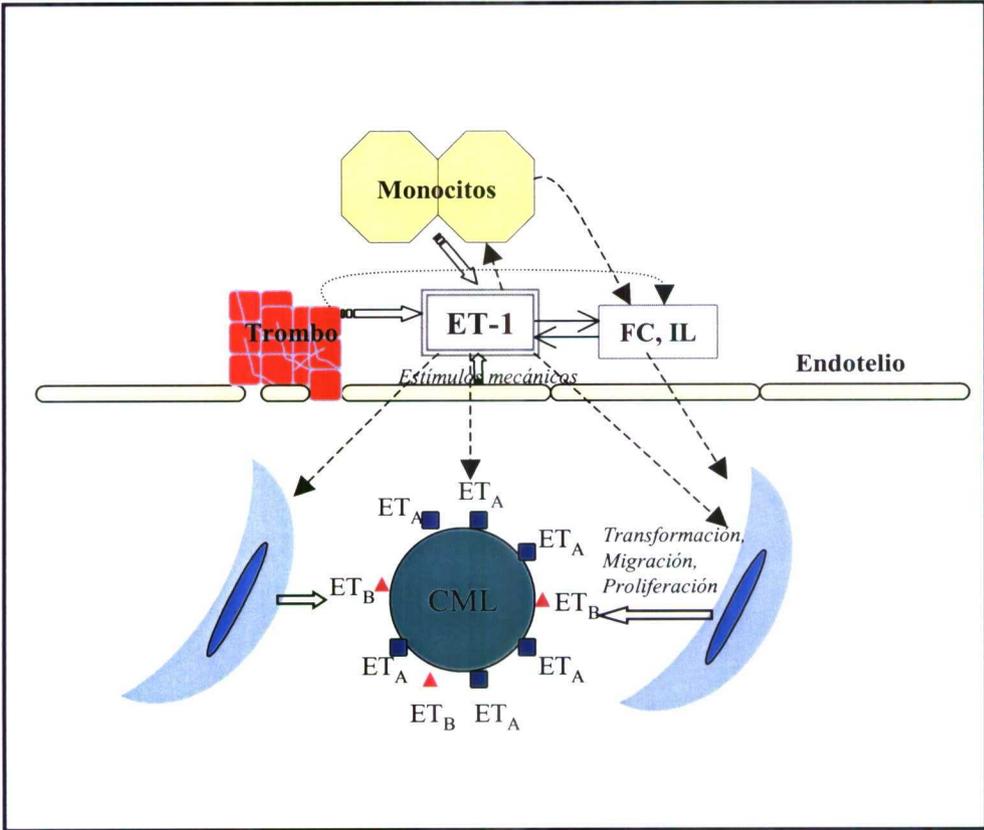


Figura 14: Papel de la endotelina-1 (ET-1) en la respuesta proliferativa tras lesión. FC = factores de crecimiento; IL = interleuquinas.

través de los mismos mediadores bioquímicos que estimulan la transformación y proliferación de las CML, como factores de crecimiento e interleuquina-1.²⁹⁸⁻³⁰⁰

La participación de la ET-1 en el proceso de reparación vascular se ve reflejada en el incremento de sus concentraciones en los segmentos arteriales sometidos a aterectomía, especialmente en el tejido neointimal formado, como ha quedado demostrado en este trabajo y en otros estudios.^{221,249,250} La población de receptores de ET-1, tanto ET_A cuanto ET_B, aumenta aproximadamente tres veces con respecto a los segmentos de referencia no dañados después de una angioplastia con balón en el modelo porcino.²⁵⁰ En cultivos *in vitro* de CML se ha visto que la densidad de estos receptores se correlaciona de modo positivo con la capacidad proliferativa.³⁰¹

Las ET estimulan de forma directa los monocitos circulantes y macrófagos activados.^{215,216} La atracción de estas células al sitio de lesión tiene la propiedad de magnificar la respuesta proliferativa, a través de la liberación de factores de crecimiento, interleuquinas y factor de necrosis tumoral.³⁰² Las ET también promueven de forma directa la proliferación de CML^{217,218,301} y fibroblastos.³⁰³ Los mecanismos de actuación de las ET sobre la proliferación celular aun son pobremente conocidos. Se ha sugerido que la actividad mitogénica se produce por la activación de la proteína quinasa C.^{305,306} Recientemente se ha identificado que la mitogénesis inducida por las ET es dependiente de la entrada de calcio en la célula a través de canales de calcio no voltaje-dependientes.^{306,307} Es probable, por lo tanto, que el mecanismo implicado tenga relación con cambios estructurales producidos en estos canales de calcio a raíz de la unión de las ET a sus receptores en CML, cuando estas células pasan de un fenotipo contráctil a un estado sintético/proliferativo.³⁰⁸

Por lo tanto, las ET, a través de su efecto sobre los receptores ET_A y ET_B, tienen un papel mediador claro en la formación de la respuesta a la lesión vascular, empezando por la fase más inicial de activación de plaquetas y células inflamatorias, hasta la transformación y proliferación de los grupos celulares implicados en la construcción del tejido de reparación.

5. Limitaciones del presente trabajo experimental

El presente trabajo tiene las limitaciones propias de los modelos experimentales de reestenosis. Una de las más importantes está en el hecho de inducir una lesión sobre una arteria sana. Si bien la respuesta proliferativa obtenida en estas arterias permite evaluar la actividad del fármaco, se desconoce si este efecto sería el mismo en coronarias con alto contenido de material aterosclerótico y en las que, por lo tanto, pueden participar otros mediadores bioquímicos en el proceso de reparación vascular. Además, la presencia de otros factores moleculares o genéticos de los pacientes con aterosclerosis pueden intervenir directamente en el proceso, como la mayor presencia de lipoproteínas de baja densidad oxidada, la hiperinsulinemia o la hipertensión arterial.

A pesar de que se considera el modelo porcino el más idóneo para el estudio de la reestenosis, en este modelo experimental existe dificultad para realizar estudios a más largo plazo. El análisis más detallado de la respuesta a la lesión implicaría la evaluación de los efectos del remodelado sobre la luz arterial. La constricción de la adventicia es la responsable por el mayor componente de pérdida luminal después de una angioplastia con balón^{36,44} y probablemente también tras aterectomía direccional.^{46,47} Aunque el período de 4 semanas utilizado en este y en la mayoría de los estudios experimentales de reestenosis es suficiente para apreciar los efectos del fármaco sobre la proliferación celular, puede que la observación completa de los mecanismos involucrados en la pérdida luminal necesitara un tiempo más prolongado.⁵² De todos modos es en las primeras semanas tras lesión cuando tiene lugar la máxima actividad proliferativa, tanto de CML cuanto de miofibroblastos, que son los promotores finales de la mayor parte de los fenómenos que ocurren en reparación vascular postlesión.

Dadas las diferencias entre la respuesta vascular producida por la aterectomía direccional y aquella secundaria a los stents, particularmente en lo que se refiere a la presencia permanente de material protésico en la pared arterial, no se puede asegurar que los efectos antiproliferativos del bosentán fueran de la misma magnitud si el fármaco fuera utilizado en una arteria tratada con stent. Por otro lado, dado que la reestenosis producida después de la colocación de un stent

se debe en casi su totalidad a la proliferación de tejido neointimal, es razonable considerar que el antagonismo dual ET_A/ET_B debiera ser igualmente eficaz.

En este estudio no se observaron diferencias en las complicaciones relacionadas a la intervención coronaria entre el grupo que recibió tratamiento local con bosentán y los demás grupos. No obstante, el tamaño de la muestra no permite descartar un efecto tóxico directo producido por el fármaco o un daño mecánico adicional inducido por el volumen administrado sobre la pared arterial. Tras el análisis de los datos morfométricos, que demuestran ausencia de beneficios del tratamiento local con respecto a la inhibición del crecimiento neointimal, se optó por no ampliar este grupo de estudio.

6. Implicaciones clínicas de nuestros resultados

El papel antiproliferativo del bosentán demostrado en el presente trabajo tiene implicaciones sobre la reestenosis y también sobre otros procesos relacionados con la respuesta vascular a la lesión endotelial, como la aterogénesis y la hipertensión arterial.

La posibilidad de atenuar la reestenosis tras intervención coronaria percutánea con un antagonista de la $ET-1$ es una de las más importantes implicaciones. Desde los primeros años de la angioplastia la búsqueda de una alternativa farmacológica para la reestenosis ha sido incesante. El bloqueo de los receptores de ET aparece como una vía más a explorar en estudios clínicos específicamente diseñados. No obstante, antes de plantear un ensayo clínico con bosentán oral con un tamaño suficiente para demostrar un beneficio sobre la reducción de la reestenosis deben considerarse algunas cuestiones. En primer lugar, es ampliamente reconocido que varios de los fármacos que fracasaron en reducir los fenómenos clínicos relacionados con la reestenosis tuvieron previamente un resultado favorable en modelos experimentales.⁶⁶ En algunos

casos el modelo experimental previamente utilizado era probablemente inapropiado.^{64,65} En otras situaciones, las dosis utilizadas eran excesivamente altas para su aplicación en el terreno clínico. Esta última puede ser una limitación importante para un ensayo con bosentán por vía sistémica. Si se planteara un estudio clínico con bosentán por vía oral éste debería realizarse con una dosis muy inferior a la utilizada en este trabajo para evitar la aparición de efectos secundarios, por lo que no se podría asegurar la inhibición suficiente de la respuesta vascular a la angioplastia. De hecho, en un ensayo clínico de insuficiencia cardíaca, en el que se utilizaron dosis orales de bosentán proporcionalmente inferiores a las de este estudio, la mayor frecuencia de elevación de transaminasas en el grupo tratado con bosentán obligó a la interrupción prematura del estudio.²⁵² Por lo tanto, antes de elaborar un ensayo clínico aleatorizado con bosentán por vía oral los beneficios sobre la proliferación neointimal deberían confirmarse, quizá en un estudio piloto, con una dosis inferior a la del presente estudio.

En segundo lugar, la situación actual en que se encuentra la investigación para la reestenosis, hace difícil justificar un ensayo clínico con cualquier fármaco administrado por vía sistémica. Recientemente se han dado a conocer los resultados de algunos estudios con stents especiales recubiertos de un polímero biocompatible que puede contener agentes antiproliferativos, como el sirolimus o el paclitaxel.¹⁶⁷⁻¹⁷⁰ Los resultados a los 6 meses con el stent de sirolimus demuestran ausencia de cualquier crecimiento neointimal apreciable por ecografía intravascular en el interior del stent.¹⁶⁷ La posibilidad de conseguir una tasa de reestenosis de 0% ha llevado al entusiasmo tanto de investigadores como de cardiólogos intervencionistas y clínicos. Aunque hacen falta más datos antes de concluir que la reestenosis ha dejado de ser un problema y que estos dispositivos son seguros a largo plazo, es muy poco probable que un fármaco administrado por vía oral consiga resultados tan atractivos como los presentados hasta ahora. No obstante, no todos los fármacos antiproliferativos son eficaces en la superficie de un stent (actinomicina D – datos todavía no publicados). En este sentido, es posible que determinados agentes sean directamente tóxicos y funcionen como un estímulo más a la respuesta trombótica e inflamatoria en las concentraciones necesarias para obtener un efecto antiproliferativo. Dado el efecto

antiproliferativo del bosentán administrado por vía sistémica, sería interesante comprobar si el mismo fármaco administrado en la plataforma de un stent podría inhibir el crecimiento neointimal de forma suficiente para tener un impacto sobre la reestenosis. Además, agentes como el bosentán u otros antagonistas de la ET-1 podrían actuar también como vasodilatadores coronarios previniendo el espasmo distal en la coronaria tratada. Por otro lado, hay que reconocer que no todas las lesiones son abordables con stents. Algunas coronarias muy tortuosas o calcificadas, lesiones ostiales o en bifurcación, con cierta frecuencia son tratadas solamente con balón o dispositivos de aterectomía. La disponibilidad de un tratamiento sistémico eficaz en la reducción de la reestenosis es deseable por lo tanto para estas situaciones, aun con la disponibilidad de stents farmacoactivos.

Además de las implicaciones de este estudio sobre la investigación de la reestenosis, hay que considerar los posibles efectos del antagonismo de las ET en otras afecciones vasculares. Numerosos estudios apoyan la relación etiopatogénica entre el sistema de ET y la enfermedad aterosclerótica.³⁰⁹ Así, se ha demostrado una relación entre la expresión de ET en células endoteliales y la presencia de lipoproteínas oxidadas de baja densidad.⁴² La ET-1, además de un efecto directo sobre las CML y sobre la síntesis de colágeno,³¹⁰ puede participar indirectamente en la formación de tejido aterosclerótico mediante interacción con otros mediadores bioquímicos, como factores de crecimiento²⁹⁹ y angiotensina II.³¹¹ Las conclusiones obtenidas con bosentán y con otros antagonistas de la ET sugieren la hipótesis de un papel de este grupo de fármacos en la prevención de la enfermedad aterosclerótica, que debiera ser corroborada en estudios clínicos.

El antagonismo de las ET es una vía atractiva para controlar la hipertensión arterial. Aparte de la eficacia de este grupo de fármacos como antihipertensivos,²⁷¹ el bloqueo de los receptores de ET podría aportar un control directo sobre la hipertrofia del músculo liso vascular y del ventrículo izquierdo,^{266,267} elementos que alteran negativamente el pronóstico.

En resumen, los hallazgos de este estudio confirman que el bloqueo de los receptores de ET es una alternativa a explorar en estudios clínicos apropiados para la prevención de la reestenosis postangioplastia coronaria y posiblemente en la

prevención de otras enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis, la hipertensión arterial o la insuficiencia cardíaca.

VII. CONCLUSIONES

1. La aterectomía direccional es un método válido de inducir lesión arterial en coronarias porcinas, en general más agresivo que los modelos experimentales basados en la dilatación con balón o implantación de stents.
2. La cantidad de neointima tras aterectomía direccional en coronarias porcinas es proporcional a la profundidad del corte sobre la pared vascular y al estiramiento o sobredilatación de la arteria en la zona de angioplastia.
3. La administración de fármacos a través del dispositivo de aterectomía direccional es factible y permite el tratamiento local en el sitio donde se ha inducido la lesión, inmediatamente después de la misma.
4. En el tejido neointimal formado tras angioplastia coronaria la expresión de endotelina está aumentada, sobre todo alrededor de las zonas de rotura de la capa media de la pared vascular.
5. La administración oral de bosentán, un antagonista de los receptores ET_A y ET_B de ET, reduce de forma significativa la cantidad de neointima que se forma tras lesión vascular en un modelo porcino.
6. La administración local del mismo fármaco en dosis única sobre la superficie vascular dañada durante la intervención coronaria resulta ineficaz en reducir la cantidad de neointima en este modelo porcino de lesión vascular.
7. La administración oral del bosentán reduce la cantidad de endotelina presente por inmunohistoquímica en el tejido neointimal tras lesión coronaria en un modelo porcino.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Dotter CT, Judkins MP. Transluminal treatment of arteriosclerotic obstruction. Description of a new technic and a preliminary report of its application. *Circulation* 1964;3:654-70).
2. Grüntzig A. Transluminal dilatation of coronary-artery stenosis. *Lancet* 1978;1:263.
3. Grüntzig AR, Senning A, Siegenthaler WE. Nonoperative dilatation of coronary artery stenosis: Percutaneous transluminal coronary angioplasty. *N Engl J Med* 1979;301:61-88.
4. Hernández JM, Goicolea J, Durán JM, Augé JM. Registro de Actividad de la Sección de Hemodinámica y Cardiología Intervencionista de la Sociedad Española de Cardiología del año 2000. *Rev Esp Cardiol* 2001;54:1426-38.
5. Topol EJ, Leya F, Pinkerton CA, et al. A comparison of directional atherectomy with coronary angioplasty in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1993;329:221-7.
6. Adelman AG, Cohen EA, Kimball BP, et al. A comparison of directional atherectomy with balloon angioplasty for lesions of the left anterior descending artery. *N Engl J Med* 1993;329:228-33.
7. Baim DS, Cutlip DE, Sharma SK, et al. Final results of the Balloon vs Optimal Atherectomy Trial (BOAT). *Circulation* 1998;97:322-31.
8. Reifart N, Vandormael M, Krajcar M, et al. Randomized comparison of angioplasty of complex coronary lesions at a single center. Excimer laser, rotational atherectomy, and balloon angioplasty comparison (ERBAC) study. *Circulation* 1997;96:91-8.
9. Holmes DR, Mehta S, George CJ, et al. Excimer laser coronary angioplasty: the New Approaches to Coronary Intervention (NACI) experience. *Am J Cardiol* 1997;80(10A):99K-105K
10. Stone GW, Marchena E, Dageforde D, et al. Prospective, randomized, multicenter comparison of laser-facilitated balloon angioplasty versus stand-alone balloon angioplasty in patients with obstructive coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1997;30:1714-21.
11. Sigwart U, Urban P, Golf S, et al. Emergency stenting form acute occlusion after coronary balloon angioplasty. *Circulation* 1988;78:1121-27.
12. Roubin GS, Cannon AD, Agrawal SK, et al. Intracoronary stenting for acute and threatened closure complicating percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Circulation* 1992;85:916-27.

13. George BS, Voorhees WE III, Roubin GS, et al. Multicenter investigation of coronary stenting to treat acute or threatened closure after percutaneous transluminal coronary angioplasty: clinical and angiographic outcomes. *J Am Coll Cardiol* 1993;88:2086-96.
14. 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.
15. Macaya C, Serruys PW, Ruygrok P, et al. Continued benefit of coronary stenting versus balloon angioplasty: one-year clinical follow-up of Benestent trial: Benestent Study Group. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27:255-61.
16. 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.
17. Versaci F, Gaspardone A, Tomai F, et al. A comparison of coronary artery stenting with angioplasty for isolated stenosis of the proximal left anterior descending coronary artery. *N Engl J Med* 1997;336:817-22.
18. Savage MP, Douglas JS Jr, Fischman DL, et al. Stent placement compared with balloon angioplasty for obstructed coronary bypass grafts. Saphenous Vein De Novo Trial Investigators. *N Engl J Med* 1997;337:740-7.
19. Serruys PW, van Hout B, Bonnier H, et al. Randomised comparison of implantation of heparin-coated stents with balloon angioplasty in selected patients with coronary artery disease (Benestent II). *Lancet* 1998;352:673-81.
20. Phillips PS, Segovia J, Alfonso F, et al. Advantage of stents in the most proximal left anterior descending coronary artery. *Am Heart J* 1998;135:719-25.
21. Sirnes PA, Golf S, Myreng Y, et al. Sustained benefit of stenting chronic coronary occlusion: long-term clinical follow-up of the Stenting in Chronic Coronary Occlusion (SICCO) study. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:305-10.
22. Rubartelli P, Niccoli L, Verna E, et al. Stent implantation versus balloon angioplasty in chronic coronary occlusions: results from the GISSOC trial. Gruppo Italiano di Studio sullo Stent nelle Occlusioni Coronariche. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:90-6.
23. Hancock J, Thomas MR, Holmberg S, et al. Randomised trial of elective stenting after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty of occluded coronary arteries. *Heart* 1998;79:18-23.
24. Erbel R, Haude M, Hopp HW, et al. Coronary-artery stenting compared with balloon angioplasty for restenosis after initial balloon angioplasty. *N Engl J Med* 1998;339:1672-8.

25. Mehran R, Mintz GS, Popma JJ, et al. Mechanisms and results of balloon angioplasty for the treatment of in-stent restenosis. *Am J Cardiol* 1996;78:618-22.
26. Eltchaninoff H, Koning R, Tron C, et al. Balloon angioplasty for the treatment of coronary in-stent restenosis: immediate results and 6-month angiographic recurrent restenosis rate. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:980-4.
27. Mehran R, Dangas G, Mintz GS, et al. Treatment of In-Stent Restenosis With Excimer Laser Coronary Angioplasty Versus Rotational Atherectomy : Comparative Mechanisms and Results. *Circulation* 2000; 101:2484-9.
28. King III, SB. Restenosis following angioplasty. Scope of the problem. En: Waksman R, editor. *Vascular Brachytherapy*; 2nd edition. Futura Publishing Company, Inc.,1999. Pgs 3-11.
29. Liu MW, Roubin GS, King SB III. Restenosis after successful coronary angioplasty: Potential biologic determinants and role of intimal hyperplasia. *Circulation* 1989;79:1374-87.
30. Casscells W. Migration of smooth muscle and endothelial cells: critical events in restenosis. *Circulation* 1992;86:723-9.
31. Kearney M, Pieczek A, Haley L, Losordo DW, Andres V, Schainfeld R, Rosenfield K, Isner JM. Histopathology of in-stent restenosis. *Circulation* 1997;95:1998-2002.
32. Scott NA, Cipolla GD, Ross CE, 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.
33. Shi Y, O'Brien JE, Fard A, et al. Adventitial myofibroblasts contribute to neointimal formation in injured porcine coronary arteries. *Circulation* 1996;94:1655-64.
34. Christen T, Verin V, Bochaton-Piallat ML, et al. Mechanisms of neointimal formation and remodeling in the porcine coronary artery. *Circulation* 2001;1093:882.
35. MJ Post, C Borst, RE Kuntz. The relative importance of arterial remodeling compared with intimal hyperplasia in lumen renarrowing after balloon angioplasty. A study in the normal rabbit and the hypercholesterolemic Yucatan micropig. *Circulation* 1994;89:2816-21.
36. Mintz GS, Popma JJ, Pichard AD, et al. Arterial remodeling after coronary angioplasty : a serial intravascular ultrasound study. *Circulation* 1996;94:35-43.
37. Mintz GS, Popma JJ, Hong MK, et al. Intravascular ultrasound to discern device-specific effects and mechanisms of restenosis. *Am J Cardiol* 1996;78:18-22.

38. Mintz G, Pichard A, Kent K, et al. Endovascular stents reduce restenosis by eliminating geometric arterial remodeling: A serial intravascular ultrasound study. *J Am Coll Cardiol* 1995;95:701-5.
39. Post MJ, de Smet BJ, van der Helm Y, et al. Arterial remodeling after balloon angioplasty or stenting in an atherosclerotic experimental model. *Circulation* 1997;96:996-1003.
40. Edelman ER, Rogers C. Pathobiologic responses to stenting. *Am J Cardiol* 1998;81(7A):4E-6E.
41. Nakamura S, Mahon DJ, Leung CY, et al. Intracoronary ultrasound imaging before and after directional coronary atherectomy: in vitro and clinical observations. *Am Heart J* 1995;129:841-51.
42. Oikawa Y, Kirigaya H, Aizawa T, et al. Mechanisms of acute gain and late lumen loss after atherectomy in different preintervention arterial remodeling patterns. *Am J Cardiol* 2002;89:505-10.
43. Dangas G, Cocks TP, Sharma SK, et al. Early Changes in Minimal Luminal Diameter After Balloon Angioplasty and Directional Coronary Atherectomy. *J Invasive Cardiol* 1998;10:372-5.
44. Di Mario C, Gil R, Camenzind E, et al. Quantitative assessment with intracoronary ultrasound of the mechanisms of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty and directional coronary atherectomy. *Am J Cardiol* 1995;75:772-7.
45. Gonschior P, Gerheuser F, Gonschior GM, et al. Experimental directional atherectomy injury in arterial vessels: impact of trauma depth on cellular response. *Am Heart J* 1995;129:1067-77.
46. de Vrey EA, Mintz GS, von Birgelen C, et al. Serial volumetric (three-dimensional) intravascular ultrasound analysis of restenosis after directional coronary atherectomy. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:1874-80.
47. Lansky AJ, Mintz GS, Popma JJ, et al. Remodeling after directional coronary atherectomy (with and without adjunct percutaneous transluminal coronary angioplasty): a serial angiographic and intravascular ultrasound analysis from the Optimal Atherectomy Restenosis Study. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:329-37.
48. Wilentz JR, Sanborn TA, Haudenschild CC, et al. Platelet accumulation in experimental angioplasty: time course and relation to vascular injury. *Circulation* 1987;75:636-42.
49. Ishiwata S, Tukada T, Nakanishi S, et al. Postangioplasty restenosis: platelet activation and the coagulation-fibrinolysis system as possible factors in the pathogenesis of restenosis. *Am Heart J* 1997;133:387-92.

50. McNamara CA, Sarembock IJ, Gimble LW, et al. Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by a proteolytically activated receptor. *J Clin Invest* 1993;91:94-8.
51. LaDelia V, Rossi PA, Sommers S, et al. Coronary histology after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Texas Heart Inst J* 1988;15:113-6.
52. Bauters C, Isner J. The Biology of Restenosis. En: Topol EJ, editor. *Textbook of Cardiovascular Medicine*. Lippincot-Raven 1998. Pg. 2465-89.
53. Furukawa Y, Matsumori A, Ohashi N, et al. Anti-monocyte chemoattractant protein-1/monocyte chemotactic and activating factor antibody inhibits neointimal hyperplasia in injured rat carotid arteries. *Circ Res* 1999;84:306-14.
54. Schwartz RS, Holmes DR, Topol EJ. The restenosis paradigm revisited: An alternative proposal for cellular mechanisms. *J Am Coll Cardiol* 1992;20:1284-93.
55. Clowes AW, Clowes MM, Kocher O, et al. Arterial smooth muscle cells in vivo: Relationship between actin isoform expression and mitogenesis and their modulation by heparin. *J Cell Biol* 1988; 107:1939-45.
56. Clark RAF, Tonnesen MG, Gailit J, Cheresch DA. Transient functional expression of avb3 on vascular cells during wound repair. *Am J Pathol* 1996;148:1407-21.
57. Fingerle J, Tina AUYP, Clowes AW, Reidy MA. Intimal lesion formation in rat carotid arteries after endothelial denudation in absence of medial injury. *Arteriosclerosis* 1990;10:1082-7.
58. Walker LN, Ramsay MM, Bowyer DE. Endothelial healing following defined injury to rabbit aorta: Death of injury and mode of repair. *Arteriosclerosis* 1983;47:123-30.
59. Mann G, Sperry A, Gray M, Jarashow D. Atherosclerosis in the Masai. *Am J Epidemiol* 1972;95:26-37.
60. Glagov S, Weisenberg G, Zarins CK, et al. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1987;316:1371-5.
61. Strauss BH, Chisholm RJ, Keeley FW, et al. Extracellular matrix remodeling after balloon angioplasty injury in a rabbit model of restenosis. *Circ Res* 1994;75:650-8.
62. Shy Y, Pieniek M, Fard A, et al. Adventitial remodeling after coronary carterial injury. *Circulation* 1996;93:340-8.
63. Clowes AW, Karnovsky MJ. Suppression by heparin of smooth muscle cell proliferation in injured arteries. *Nature* 1977;265:625-6.
64. MARCATOR Study Group. Does the new angiotensin converting enzyme inhibitor cilazapril prevent restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty?

- Results of the MERCATOR study: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Circulation* 1992;86:100-10.
65. MARCATOR Study Group. Effect of high dose angiotensin-converting enzyme inhibition on restenosis: final results of the MARCATOR Study, a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial of cilazapril. *J Am Coll Cardiol* 1995;25:362-9.
 66. 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.
 67. Muller DWM, Ellis SG, Topol EJ. Experimental models of coronary artery restenosis. *J Am Coll Cardiol* 1992;19:418-32.
 68. 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.
 69. Weiner BH, Ockene IS, Jarmolych J, et al. Comparison of pathologic and angiographic findings in a porcine preparation of coronary atherosclerosis. *Circulation* 1985;57:105-12.
 70. Geary RL, Williams JK, Golden D, et al. Time course of cellular proliferation, intimal hyperplasia, and remodeling following angioplasty in monkeys with established atherosclerosis. A nonhuman primate model of restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:34-43.
 71. Mondy JS, Williams JK, Adams MR, et al. Structural determinants of lumen narrowing after angioplasty in atherosclerotic nonhuman primates. *J Vasc Surg* 1997;26:875-83.
 72. Rudel LL. Genetic factors influence the atherogenic response of lipoproteins to dietary fat and cholesterol in nonhuman primates. *J Am Coll Nutr* 1997;16:306-12.
 73. Frishman WH, Chiu R, Landzberg BR, Weiss M. Medical therapies for the prevention of restenosis after percutaneous coronary interventions. *Curr Probl Cardiol* 1998;23(10):533-640.
 74. Schwartz RS, Edwards WD, Bailey KR, Camrud AR, Jorgenson MA, Holmes DR. Differential neointimal response to coronary artery injury in pigs and dogs. Implications for restenosis models. *Arterioscler Thromb* 1994;14:395-400.
 75. Gerdes C, Faber-Steinfeld V, Yalkinoglu O, Wohlfeil S. Comparison of the effects of the thrombin inhibitor r-hirudin in four animal models of neointima formation after arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:1306-11.
 76. Schwartz RS. Neointima and artery injury: dogs, rats, pigs and more. *Lab Invest* 1994;71:789-91.
 77. Beatt KJ, Serruys PW, Luijten HE, et al. Restenosis after coronary angioplasty: the paradox of increased lumen diameter and restenosis. *J Am Coll Card* 1992;19:258-66.

78. Hopp HW, Baer FM, Ozbek C, et al. A synergistic approach to optimal stenting: directional coronary atherectomy prior to coronary artery stent implantation--the AtheroLink Registry. AtheroLink Study Group. *J Am Coll Cardiol* 2000 Nov 15;36(6):1853-9
79. Karvouni E, Di Mario C, Nishida T, et al. Directional atherectomy prior to stenting in bifurcation lesions: a matched comparison study with stenting alone. *Catheter Cardiovasc Interv* 2001;53:12-20.
80. Kosuga K, Tamai H, Ueda K, et al. Initial and long-term results of directional coronary atherectomy in unprotected left main coronary artery. *Am J Cardiol* 2001;87:838-43.
81. Tsuchikane E, Sumitsuji S, Awata N, et al. Final results of the STent versus directional coronary Atherectomy Randomized Trial (START). *J Am Coll Cardiol* 1999;34:1050-7.
82. Fernández-Ortiz A, Aragoncillo P, Goicolea J, et al. Inhibición local de la respuesta trombótica tras aterectomía direccional en coronarias porcinas. *Rev Esp Cardiol* 1997;50(suppl 6):101 (abstract).
83. Weintraub WS, Boccuzzi SJ, Klein JL, et al. Lack of effect of lovastatin on restenosis after coronary angioplasty. *N Engl J Med* 1994;331:1331-7.
84. Emanuelsson H, Bagger JP, Balcon R, et al. Long-term effects of angiopeptin treatment in coronary angioplasty: reduction of clinical events but not of angiographic restenosis. *Circulation* 1995;91:1689-96.
85. The ERASER Investigators. Acute platelet inhibition with abciximab does not reduce in-stent restenosis (ERASER study). *Circulation* 1999;100(8):799-806.
86. Serruys PW, Foley DP, Pieper M, et al. The TRAPIST Study. A multicentre randomized placebo controlled clinical trial of trapidil for prevention of restenosis after coronary stenting, measured by 3-D intravascular ultrasound. *Eur Heart J* 2001;22(20):1938-47.
87. SoRelle R. Late-breaking clinical trials at the American Heart Association's scientific sessions 2001. *Circulation* 2001;104(21):E9046-8.
88. Bourassa MG, Schwartz L, Lesperance J, et al. Prevention of acute complications after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Thromb Res* 1990;12 Suppl:51-8.
89. Barnathan ES, Schwartz JS, Taylor L, et al. Aspirin and dypiridamole in the prevention of acute coronary thrombosis complicating coronary angioplasty. *Circulation* 1987;76:125-34.
90. Faxon DP, Sanborn TA, Haudenschild CC, et al. Effect of antiplatelet therapy on restenosis after experimental angioplasty. *Am J Cardiol* 1984;53:72C-6C.

91. Schwartz L, Bourassa MG, Lesperance J, et al. Aspirin and dipyridamole in the prevention of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *N Engl J Med* 1988;318:1714-9.
92. Taylor RR, Gibbons FA, Cope GD, et al. Effects of low-dose aspirin on restenosis after coronary angioplasty. *Am J Cardiol* 1991;68:874-8.
93. Serruys PW, Rutsch W, Heyndrickx GR, et al. Prevention of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty with thromboxane A2 receptor blockade. A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Coronary Artery Restenosis Prevention on Repeated Thromboxane Antagonism Study (CARPORT)*. *Circulation* 1991;84:1568-80.
94. Savage MP, Goldberg S, MacDonald RG, et al. Multi-Hospital Eastern Atlantic Restenosis Trial II: A placebo controlled trial of thromboxane blockade in the prevention of restenosis following coronary angioplasty. *Am Heart J* 1991;122:1239-44.
95. Knudtson ML, Flintoft VF, Roth DL, et al. Effect of short-term prostacyclin administration on restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1990;15:691-7.
96. Gershlick AH, Spriggins D, Davies SW, et al. Failure of epoprostenol (prostacyclin PGI₂) to inhibit platelet aggregation and to prevent restenosis after coronary angioplasty: results of a randomised placebo controlled trial. *Br Heart J* 1994;71:7-15.
97. Raizner AE, Hollman J, Demke D, et al. Beneficial effects of ciprostone in PTCA: a multicenter, randomised, controlled trial [abstract]. *Circulation* 1988;78(Suppl II):290.
98. Leon MB, Baim DS, Popma JJ, et al. A clinical trial comparing three antithrombotic-drug regimens after coronary-artery stenting. *N Engl J Med* 1998;339:1665-71.
99. White CW, Knudson M, Schmidt D, et al. Neither ticlopidine nor aspirin-dipyridamole prevents restenosis post PTCA: results from a randomised, placebo-controlled multicenter trial [abstract]. *Circulation* 1987;76(Suppl 4):213.
100. Bertrand ME, Allain H, Lablanche JM, et al. Results of a randomised trial of ticlopidine versus placebo for prevention of acute closure and restenosis after coronary angioplasty [abstract]. *Circulation* 1990;82(Suppl 3):190.
101. Iñiguez RA, Macaya MC, Hernandez AR, et al. The effects of ticlopidine administration at low doses on the incidence or restenosis following percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Rev Esp Cardiol* 1991;44:366-74.
102. Clowes AW, Karnovsky MJ. Suppression of heparin of smooth muscle cell proliferation in injured arteries. *Nature* 1977;265:625-6.

103. Castellot J, Cochran D, Karnovsky M. Effect of heparin on vascular smooth muscle cell. I: Cell metabolism. *J Cell Physiol* 1985;124:21-8.
104. Ellis SG, Roubin GS, Wilentz J, et al. Effect of 18-24 hour regimen administration for prevention of restenosis after uncomplicated coronary angioplasty. *Am Heart J* 1989;117:777-82.
105. Faxon DP, Spiro TE, Minor S, et al. Low molecular weight heparin in prevention of restenosis after angioplasty: results of enoxaparin restenosis (ERA) trial. *Circulation* 1994;90:908-14.
106. Karsch KR, Preisack MB, Baildon R, et al. Low molecular weight heparin (reviparin) in percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1996;28:1437-43.
107. Serruys PW, Herrman J-PR, Simon R, et al. A comparison of hirudin with heparin in the prevention of restenosis after coronary angioplasty. *N Engl J Med* 1995;333:757-63.
108. Topol EJ, Califf RM, Weisman HF, et al. Randomised trial of coronary intervention with antibody directed against platelet IIb/IIIa integrin for reduction of clinical restenosis: results at six months. *Lancet* 1994;343:881-6.
109. Tcheng JE. Glycoprotein Iib/IIIa receptor inhibitors: putting the EPIC, IMPACT II, RESTORE, and EPILOG trials into perspective. *Am J Cardiol* 1996;78:35-40.
110. Stone GW, Rutherford BD, McConahay DR, et al. A randomised trial of corticosteroids for the prevention of restenosis in 102 patients undergoing repeat coronary angioplasty. *Cath Cardiovasc Diag* 1989;18:227-31.
111. Pepine CJ, Hirshfeld JW, MacDonald RG, et al. A controlled trial of corticosteroids to prevent restenosis after coronary angioplasty. *Circulation* 1990;81:1753-61.
112. Tanaka K, Honda M, Kuramochi T, Morioka S. Prominent inhibitor effects of tranilast on migration and proliferation of and collagen synthesis by vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 1994;107:179-85.
113. Kikuchi S, Umemura K, Kondo, Nakashima M. Tranilast suppresses intimal hyperplasia after photochemically induced endothelial injury in the rat. *Eur J Pharmacol* 1996;295:221-7.
114. Fukuyama J, Ichikawa K, Hamano S, Sibata N. Tranilast suppresses the vascular intimal hyperplasia after balloon injury in rabbits fed on a high-cholesterol diet. *Eur J Pharmacol* 1996;318:327-32.
115. Tamai H, Katoh O, Suzuki S, et al. Impact of tranilast on restenosis after coronary angioplasty: tranilast restenosis following angioplasty trial (TREAT). *Am Heart J* 1999;138:968-75.

116. Ferns GA, Raines EW, Sprugel KH, et al. Inhibition of neointimal smooth muscle cells accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. *Science* 1991;253:1129-32.
117. Liu MW, Roubin GS, Robinson KA, et al. Trepidil in preventing restenosis after balloon angioplasty in the atherosclerotic rabbit. *Circulation* 1990;81:1089-93.
118. Okamoto S, Inden M, Setsuda M, et al. Effects of trapidil (triazolopyrimidine), a platelet derived growth factor antagonist, in preventing restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am Heart J* 1992;123:1439-44.
119. Maresta A, Balducelli M, Cantini L, et al: Trepidil (triazolopyrimidine), a platelet-derived growth factor antagonist, reduces restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. Results of the randomised, double-blind STARC study. *Circulation* 1994, 90:2710-5.
120. Galassi AR, Tamburino C, Nicosia A, et al. A randomized comparison of trapidil (triazolopyrimidine), a platelet-derived growth factor antagonist, versus aspirin in prevention of angiographic restenosis after coronary artery Palmaz-Schatz stent implantation. *Catheter Cardiovasc Interv* 1999;46:162-8.
121. Serruys PW, Foley DP, Pieper M, et al. The TRAPIST Study. A multicentre randomized placebo controlled clinical trial of trapidil for prevention of restenosis after coronary stenting, measured by 3-D intravascular ultrasound. *Eur Heart J* 2001;22:1938-47.
122. Grant MB, Wargovich TJ, Ellis EA, et al. Localization of insulin-like growth factor I and inhibition of coronary smooth muscle cell growth by somatostatin analogues in human coronary smooth muscle cells. A potential treatment for restenosis? *Circulation* 1994;89:1511-7.
123. Hong MK, Kent KM, Mehran R, et al. Continuous subcutaneous angiopeptin treatment significantly reduces neointimal hyperplasia in a porcine coronary in-stent restenosis model. *Circulation* 1997;95:449-54.
124. Eriksen UH, Amtorp O, Bagger JP, et al. Randomized double-blind Scandinavian trial of angiopeptin versus placebo for the prevention of clinical events and restenosis after coronary balloon angioplasty. *Am Heart J* 1995;130(1):1-8.
125. Emanuelsson H, Bagger JP, Balcon R, et al. Long-term effects of angiopeptin treatment in coronary angioplasty: reduction of clinical events but not of angiographic restenosis. *Circulation* 1995;91:1689-96.
126. Kent KM, Williams DO, Cassagneau B, et al. Double-blind, controlled trial of the effect of angiopeptin on coronary restenosis following balloon angioplasty [abstract]. *Circulation* 1993;88(Suppl I):506.
127. Armstrong J, Gunn J, Arnold N, et al. Angiopeptin-eluting stents: observations in human vessels and pig coronary arteries. *J Invasive Cardiol.* 2002;14:230-8.

- 128.von Essen R, Ostermaier R, Grube E, et al. Effects of octreotide treatment on restenosis after coronary angioplasty. Results of the VERAS Study. *Circulation* 1997;96:1482-7.
- 129.Segev A, Aviezer D, Safran M, et al. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by a novel fibroblast growth factor receptor antagonist. *Cardiovasc Res* 2002;53:232-41.
- 130.Kingston PA, Sinha S, David A, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of a secreted transforming growth factor-beta type II receptor inhibits luminal loss and constrictive remodeling after coronary angioplasty and enhances adventitial collagen deposition. *Circulation* 2001;104:2595-601.
- 131.Serruys PW, Klein W, Tijssen JP, et al. Evaluation of ketanserlin in the prevention of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. A multicenter randomised double-blind placebo-controlled trial. *Circulation* 1993;88:1588-601.
- 132.Desmet W, Vrolix M, DeScheerder I, et al. Angiotensin converting enzyme inhibition with fosinopril sodium in the prevention of restenosis after coronary angioplasty. *Circulation* 1994;89:385-92.
- 133.Kaul U, Chandra S, Bahl VK, et al. Enalapril for prevention of restenosis after coronary angioplasty. *Indian Heart J* 1993;45:469-73.
- 134.Huckle WR, Drag MD, Acker WR, et al. Effects of subtype selective and balanced angiotensin II receptor antagonists in a porcine coronary artery model of vascular restenosis. *Circulation* 1996;93:1009-19.
- 135.Marks DS, Vita JA, Folts JD, et al. Inhibition of neointimal proliferation in rabbits after vascular injury by a single treatment with a protein adduct of nitric oxide. *J Clin Invest* 1995;96:2630-8.
- 136.Lee JS, Adrie C, Jacob HJ, et al. Chronic inhalation of nitric oxide inhibits neointimal formation after balloon-induced arterial injury. *Circ Res* 1996;78:337-42.
- 137.Local intramural delivery of L-arginine enhances nitric oxide generation and inhibits lesion formation after balloon angioplasty. *Circulation* 1997;95:1863-9.
- 138.Lablanche J-M, Grollier G, Lusson J-R, et al. Effect of the direct nitric oxide donors linsidomine and molsidomine on angiographic restenosis after coronary balloon angioplasty. The ACCORD study. *Circulation* 1997;95:83-9.
- 139.Schneider JE, Berk BC, Gravanis MB, et al. Probucol decreases neointimal formation in a swine model of coronary artery balloon injury. A possible role for antioxidants in restenosis. *Circulation* 1993;88:628-37.

140. Setsuda M, Inden M, Hiraoka N, et al. Probucol therapy in the prevention of restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Clin Ther* 1993;15:374-82.
141. Watanabe K, Sekiya M, Ikeda S, et al. Preventive effects of probucol on restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am Heart J* 1996;132:23-9.
142. Tardif JC, Cote G, Lesperance J, et al. Probucol and multivitamins in the prevention of restenosis after coronary angioplasty. *N Engl J Med* 1997;337:365-72.
143. O'Keefe JH Jr, Stone GW, McCallister BD Jr, et al. Lovastatin plus probucol for prevention of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am J Cardiol* 1996;77:649-52.
144. Gellman J, Ezekowitz MD, Sarembock IJ, et al. Effect of lovastatin on intimal hyperplasia after balloon angioplasty: a study in an atherosclerotic, hypercholesterolemic rabbit. *J Am Coll Cardiol* 1991;17:251-9.
145. Constantinescu DE, Banka VS, Tulenko TN. Lovastatin inhibits proliferation of arterial smooth muscle and endothelial cells. Indication in atherosclerosis and prevention of restenosis [abstract]. *Eur Heart J* 1992;13(Suppl):82.
146. Weintraub WS, Boccuzzi SJ, Klein JL, et al. Lack of effect of lovastatin on restenosis after coronary angioplasty. *Am Heart J* 1991;121:1600-8.
147. Onaka H, Hirota Y, Kita Y, et al. The effect of pravastatin on prevention of restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Jpn Circulation J (English edition)*:1994;58:100-6.
148. Serruys PW, Foley DP, Jackson G, et al. A randomized placebo-controlled trial of fluvastatin for prevention of restenosis after successful coronary balloon angioplasty; final results of the fluvastatin angiographic restenosis (FLARE) trial. *Eur Heart J* 1999;20:58-69.
149. Corcos T, David PR, Val PG, et al. Failure of diltiazem to prevent restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am Heart J* 1985;109:926-31.
150. O'Keefe JH, Giorgi LV, Hartzler GO, et al. Effects of diltiazem on complications and restenosis after coronary angioplasty. *Am J Cardiol* 1991;67:373-6.
151. Whitworth HB, Roubin GS, Hollman J, et al. Effect of nifedipine on recurrent restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1986;8:1271-6.
152. Hoberg E, Dietz R, Frees U, et al. Verapamil treatment after coronary angioplasty in patients at high risk of recurrent stenosis. *Br Heart J* 1994;71:254-60.

153. Hillegass WB, Ohman EM, Leimberger JD, et al. A meta-analysis of randomised trials of calcium antagonists to reduce restenosis after coronary angioplasty. *Am J Cardiol* 1994;73:835-9.
154. Schweizer J, Kirch W, Koch R, et al. Effect of high dose verapamil on restenosis after peripheral angioplasty. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31(6):1299-305.
155. Gershlick AH. Treating atherosclerosis: local drug delivery from laboratory studies to clinical trials. *Atherosclerosis* 2002;160:259-71.
156. Guzman LA, Labhsetwar V, Song C, et al. Local intraluminal infusion of biodegradable polymeric nanoparticles. A novel approach for prolonged drug delivery after balloon angioplasty. *Circulation* 1996;94:1441-8.
157. Valero F, Hamon M, Fournier C, et al. Intramural injection of biodegradable microspheres as a local drug-delivery system to inhibit neointimal thickening in a rabbit model of balloon angioplasty. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;31:513-9.
158. Chandy T, Rao GH, Wilson RF, Das GS. Development of poly(Lactic acid)/chitosan co-matrix microspheres: controlled release of taxol-heparin for preventing restenosis. *Drug Deliv* 2001;8:77-86.
159. Das GS, Rao GHR, Wilson RF, Chandy T. Controlled delivery of taxol from poly(ethylene glycol)-coated poly(lactic acid) microspheres. *J Biomed Mater Res* 2001;55:96-103.
160. Aggarwal RK, Ireland DC, Azrin MA, et al. Antithrombotic potential of polymer-coated stents eluting platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antibody. *Circulation* 1996;94:3311-7.
161. Lincoff AM, Furst JG, Ellis SG, et al. Sustained local delivery of dexamethasone by a novel intravascular eluting stent to prevent restenosis in the porcine coronary injury model. *J Am Coll Cardiol* 1997;29:808-16.
162. Alt E, Haehnel I, Beilharz C, et al. Inhibition of neointima formation after experimental coronary artery stenting: a new biodegradable stent coating releasing hirudin and the prostacyclin analogue iloprost. *Circulation* 2000;101:1453-8.
163. Farb A, Heller PF, Shroff S, et al. Pathological analysis of local delivery of paclitaxel via a polymer-coated stent. *Circulation* 2001;104:473-479.
164. Kim WH, Hong MK, Kornowski R, et al. Saline infusion via local drug delivery catheters is associated with increased neointimal hyperplasia in a porcine coronary in-stent restenosis model. *Coron Artery Dis* 1999;10:629-32.



165. Heldman AW, Cheng L, Jenkins GM, et al. Paclitaxel stent coating inhibits neointimal hyperplasia at 4 weeks in a porcine model of coronary restenosis. *Circulation* 2001;103:2289-95.
166. Sousa JE, Costa MA, Abizaid AC, et al. Sustained suppression of neointimal proliferation by sirolimus-eluting stents: one-year angiographic and intravascular ultrasound follow-up. *Circulation* 2001;104:2007-11.
167. Morice MC, Serruys PW, Sousa E, 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.
168. El ensayo SIRIUS. En: <http://www.tctmd.com/clinical-trials/731/8019/9920Sirius.pdf>
169. El ensayo TAXUS. En: http://www.tctmd.com/expert-presentations/multi-slide.html?product_id=1482
170. El ensayo ELUTES. En: http://www.tctmd.com/expert-presentations/multi-slide.html?product_id=1480
171. Liistro F, Stankovic G, Di Mario C, et al. First Clinical Experience With a Paclitaxel Derivate-Eluting Polymer Stent System Implantation for In-Stent Restenosis: Immediate and Long-Term Clinical and Angiographic Outcome. *Circulation* 2002;105:1883-6.
172. Liistro F, Colombo A. Late acute thrombosis after paclitaxel eluting stent implantation. *Heart* 2001; 86:262-4.
173. Condado JA, Waksman R, Gurdiel O, et al. Long-term angiographic and clinical outcome after percutaneous transluminal coronary angioplasty and intracoronary radiation therapy in humans. *Circulation* 1997; 96: 727-32.
174. Verin V, Urban P, Popowski Y, et al. Feasibility of intracoronary beta-irradiation to reduce restenosis after balloon angioplasty. A clinical pilot study. *Circulation* 1997; 95: 1138-44.
175. Teirstein PS, Massullo V, Jani S, et al. Catheter-based radiotherapy to inhibit restenosis after coronary stenting. *N Engl J Med* 1997; 336: 1697-703.
176. King SB III, Williams DO, Chogule P, et al. Endovascular b-radiation to reduce restenosis after coronary balloon angioplasty. Results of the Beta Energy Restenosis Trial (BERT). *Circulation* 1998; 97: 2025-30.
177. Waksman R, Bhargava B, White LR, et al. Intracoronary beta-radiation therapy inhibits recurrence of in-stent restenosis. *Circulation* 2000;101:1895-98.
178. Raizner AE, Oesterle SN, Waksman R, et al. Inhibition of restenosis with beta-emitting radiotherapy. Report of the Proliferation Reduction With Vascular Energy Trial (PREVENT). *Circulation* 2000; 102: 951-8.

179. Verin V, Popowski Y, de Bruyne B, et al. Endoluminal beta-radiation therapy for the prevention of coronary restenosis after balloon angioplasty. *N Engl J Med* 2001; 344: 243-9.
180. Waksman R, Ajani AE, White RL, et al. Intravascular gamma radiation for in-stent restenosis in saphenous-vein bypass grafts. *N Engl J Med* 2002;346(16):1194-9.
181. Waksman R, Raizner AE, Yeung AC, et al. Use of localised intracoronary beta radiation in treatment of in-stent restenosis: the INHIBIT randomised controlled trial. *Lancet* 2002;359(9306):551-7.
182. Sabate M. Estado actual de la braquiterapia intracoronaria. *Rev Esp Cardiol* 2001 Oct;54(10):1197-209.
183. Lejbkowitz F, Zwiran M, Salzberg S. The response of normal and malignant cells to ultrasound in vitro. *Ultrasound Med Biol* 1993;19:75-82.
184. Alter A, Rozenszajn LA, Miller HI, et al. Ultrasound inhibits the adhesion and migration of smooth muscle cells in vitro. *Ultrasound Med Biol* 1998;24:711-721.
185. Lawrie A, Brisken AF, Francis SE, et al. Ultrasound enhances reporter gene expression after transfection of vascular cells in vitro. *Circulation* 1999;99:2617-20.
186. Fitzgerald PJ, Takagi A, Moore MP, et al. Intravascular sonotherapy decreases neointimal hyperplasia after stent implantation in swine. *Circulation* 2001;103:1828-31.
187. Hickey KA, Rubanyi GM, Paul RJ, et al. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol.* 1985;248:C550-C556.
188. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988;332:411-415.
189. Luscher TF, Barton M. Endothelins and Endothelin Receptor Antagonists. Therapeutic Considerations for a Novel Class of Cardiovascular Drugs. *Circulation* 2000;102:2434-40.
190. Johnson GD, Stevenson T, Ahn K. Hydrolysis of peptide hormones by endothelin-converting enzyme-1: a comparison with neprilysin. *J Biol Chem.* 1999;274:4053-8.
191. Uchida K, Uchida S, Nitta K, et al. Regulated expression of endothelin converting enzymes in glomerular endothelial cells. *J Am Soc Nephrol* 1996;8:580-5.
192. Yanagisawa H, Yanagisawa M, Kapur RP, et al. Dual genetic pathways of endothelin-mediated intercellular signaling revealed by targeted disruption of endothelin converting enzyme-1 gene. *Development.* 1998;125:825-36.
193. Yoshioka S, Fujiwara H, Yamada S, et al. Endothelin-converting enzyme-1 is expressed on human ovarian follicles and corpora lutea of menstrual cycle and early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:3943-50.

194. Naomi S, Iwaoka T, Disashi T, et al. Endothelin-1 inhibits endothelin-converting enzyme-1 expression in cultured rat pulmonary endothelial cells. *Circulation*. 1998;97:234-6.
195. Ruschitzka F, Moehrlen U, Quaschnig T, et al. Tissue endothelin-converting enzyme activity correlates with cardiovascular risk factors in coronary artery disease. *Circulation*. 2000;102:1086-92.
196. Hasdai D, Holmes DR, Garrat KN, et al. Mechanical pressure and stretch release endothelin-1 from human atherosclerotic coronary arteries in vivo. *Circulation* 1997; 95:357-62.
197. Malek A, Izumo S. Physiological fluid shear stress causes downregulation of endothelin-1 mRNA in bovine aortic endothelium. *Am J Physiol*. 1992;263:C389-C396.
198. Yamauchi T, Ohnaka K, Takayanagi R, et al. Enhanced secretion of endothelin 1 by elevated glucose levels from cultured bovine endothelial cells. *FEBS Lett*. 1990;267:16-8.
199. Barton M, Carmona R, Morawietz H, et al. Obesity is associated with tissue-specific activation of renal angiotensin converting enzyme in vivo: evidence for a regulatory role of endothelin. *Hypertension*. 2000;35:329-36.
200. Akashita M, Ohchi Y, Miyoshi H, et al. Estrogen inhibits endothelin-1 production and c-fos gene expression in rat aorta. *Atherosclerosis*. 1996;125:27-38.
201. Rakugi H, Tabuchi Y, Nakamaru M, et al. Evidence for endothelin-1 release from resistance vessels of rats in response to hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;169:973-7.
202. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 1990;348:730.
203. Sakumi T, Yanagisawa M, Takuwa Y, et al. Cloning of a cDNA encoding a non-iso peptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 1990;348:782.
204. Davenport AP, O'Reilly G, Molenaar P, et al. Human endothelin receptors characterised using reverse transcriptase-polymerase chain reaction, in-situ hybridisation, and subtype-selective ligands BQ123 and BQ3020: evidence for expression of ET_B receptors in human vascular smooth muscle. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1993;22(suppl 8): S22-S25.
205. Haynes WG, Strachan FE, Webb DJ, et al. Endothelin ET_A and ET_B receptors cause vasoconstriction of human resistance and capacitance vessels in vivo. *Circulation* 1995;92:357-3.
206. Dupuis J, Stewart DJ, Cernacek P, et al. Human pulmonary circulation is an important site for both clearance and production of endothelin-1. *Circulation* 1996; 94:1578-1584.

207. Spieker LE, Noll G, Ruschitzka FT, et al. Endothelin receptor antagonists in congestive heart failure: a new therapeutic principle for the future? *J Am Coll Cardiol* 2001;37:1493-505.
208. Wagner OF, Christ G, Wojta J, et al. Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *J Biol Chem*. 1992;267:16066-8.
209. Komuro I, Kurihara H, Sugiyama T, et al. Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett*. 1988;238:249-52.
210. Agui T, Xin X, Cai Y, et al. Stimulation of interleukin-6 production by endothelin in rat bone marrow-derived stromal cells. *Blood* 1994;84:2531-8.
211. Hofman FM, Chen P, Jeyaseelan R, et al. Endothelin-1 induces production of the neutrophil chemotactic factor interleukin-8 by human brain-derived endothelial cells. *Blood* 1998;92:3064-72.
212. Peifley KA, Winkles JA. Angiotensin II and endothelin-1 increase fibroblast growth factor-2 mRNA expression in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;242:202-8.
213. Guidry C, Hook M. Endothelins produced by endothelial cells promote collagen gel contraction by fibroblasts. *J Cell Biol*. 1991;115:873-80.
214. Marini M, Carpi S, Bellini A, et al. Endothelin-1 induces increased fibronectin expression in human bronchial epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;220:896-9.
215. Haller H, Schaberg T, Lindschau C, et al. Endothelin increases $[Ca^{2+}]_i$ protein phosphorylation and O_2 production in human alveolar macrophages. *Am J Physiol* 1991;261:L478-L484.
216. Lopez Farre A, Riesco A, Espinosa G, et al. Effect of endothelin-1 on neutrophil adhesion to endothelial cells and perfused heart. *Circulation* 1993;88:1166-71.
217. Alberts GF, Peifley KA, Johns A, et al. Constitutive endothelin-1 overexpression promotes smooth muscle cell proliferation via an external autocrine loop. *J Biol Chem* 1994;269: 10112-8.
218. Porter KE, Olojugba DH, Masood I, et al. Endothelin-B receptors mediate intimal hyperplasia in an organ culture of human saphenous vein. *J Vasc Surg* 1998;28:695-701.
219. Wang X, Douglas SA, Loudon C, et al. Temporal expression of endothelin-1, endothelin-3, endothelin-converting-enzyme 1, and endothelin-A and endothelin-B receptor mRNA after angioplasty-induced neointimal formation in the rat. *Circ Res* 1996;78:322-8.
220. Azuma H, Hamasaki H, Sato J, et al. Different localization of ETA and ETB receptors in the hyperplastic vascular wall. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995;25:802-9.

221. Kirchengast M, Münter K. Endothelin and restenosis. *Cardiovasc Res* 1998;39:550-5.
222. Bacon CR, Davenport AP. Endothelin receptors in human coronary artery and aorta. *Br J Pharmacol* 1996;117:986-92.
223. Bacon CR, Cary NR, Davenport AP. Endothelin peptide and receptors in human atherosclerotic coronary artery and aorta. *Circ Res* 1996;79:794-801.
224. Verhaar MC, Strachan FE, Newby DE, et al. Endothelin-A receptor antagonist-mediated vasodilatation is attenuated by inhibition of nitric oxide synthesis and by endothelin-B receptor blockade. *Circulation* 1998, 97:752-6.
225. Strachan FE, Spratt JC, Wilkinson IB, et al. Systemic blockade of the endothelin-B receptor increases peripheral vascular resistance in healthy men. *Hypertension* 1999;33:581-5.
226. Dagassan PH, Breu V, Clozel M, et al. Up-regulation of endothelin-B receptors in atherosclerotic human coronary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996;27:147-53.
227. Cowburn PJ, Cleland JG, McArthur JD, et al. Endothelin-B receptors are functionally important in mediating vasoconstriction in the systemic circulation in patients with left ventricular systolic dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 1999;33:932-8.
228. Kowala MC, Rose PM, Stein PD, et al. Selective blockade of the endothelin subtype A receptor decreases early atherosclerosis in hamsters fed cholesterol. *Am J Pathol.* 1995;146:819-26.
229. Barton M, Haudenschild CC, d'Uscio LV, et al. Endothelin ETA receptor blockade restores NO-mediated endothelial function and inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:14367-72.
230. Lerman A, Edwards BS, Hallett JW, et al. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med* 1991;325:997-1001.
231. Zeiher AM, Goebel H, Schächinger V, et al. Tissue endothelin-1 immunoreactivity in the active coronary atherosclerotic plaque: a clue to the mechanism of increased vasoreactivity of the culprit lesion in unstable angina. *Circulation* 1995; 91:941-7.
232. Minamino T, Kurihara H, Takahashi M, et al. Endothelin-converting enzyme expression in the rat vascular injury model and human coronary atherosclerosis. *Circulation* 1997;95:221-30.
233. Rossi GP, Colonna S, Pavan E, et al. Endothelin-1 and its mRNA in the wall layers of human arteries ex vivo. *Circulation* 1999;99:1147-55.
234. Boulanger CM, Tanner FC, Bea ML, et al. Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circ Res* 1992;70:1191-7.

235. Li JS, Lariviere R, Schiffrin EL. Effect of a nonselective endothelin antagonist on vascular remodeling in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats: evidence for a role of endothelin in vascular hypertrophy. *Hypertension* 1994;24:183-8.
236. Moreau P, d'Uscio LV, Takase H, et al. Angiotensin II increases tissue endothelin and induces vascular hypertrophy: reversal by ETA-antagonist. *Circulation* 1997;96:1593-7.
237. Barton M, d'Uscio L, Shaw S, et al. ETA receptor blockade prevents increased tissue endothelin-1, vascular hypertrophy and endothelial dysfunction in salt-sensitive hypertension. *Hypertension* 1998;499-504.
238. Ito H, Hirata Y, Hiroe M, et al. ET-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res* 1991;69:209-15.
239. Geny B, Piquard F, Lonsdorfer J, Haberey P. Endothelin and heart transplantation. *Cardiovasc Res* 1998;39:556-62.
240. Douglas SA, Ohlstein EH. Endothelin-1 promotes neointima formation after balloon angioplasty in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993;22:S371-S373.
241. Douglas SA, Loudon C, Vickery-Clark LM, et al. A role for endogenous endothelin-1 in neointimal formation after rat carotid artery balloon angioplasty. Protective effects of a novel nonpeptide endothelin receptor antagonist SB 209670. *Circ Res* 1994;75:190-7.
242. Ferrer P, Valentine M, Jenkins-West T, et al. Orally active endothelin receptor antagonist BMS-182874 suppresses neointimal development in balloon-injured rat carotid arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995;26:908-15.
243. Tsujino M, Hirata Y, Eguchi S, et al. Nonselective ET_A/ET_B receptor antagonist blocks proliferation of rat vascular smooth muscle cells after balloon angioplasty. *Life Sci.* 1995;56:L449-L454.
244. Takiguchi Y, Sogabe K. The selective endothelin ET_A receptor antagonist FR 129317 inhibits neointimal thickening in the rat. *Eur J Pharmacol* 1996; 309:59-62.
245. Münter K, Hergenröder S, Unger L, Kirchengast M. Oral treatment with an ET_A-receptor antagonist inhibits neointima formation induced by endothelial injury. *Pharm Pharmacol Lett* 1996;6:90-2.
246. Douglas SA, Vickery-Clark LM, Loudon C, et al. Selective ET_A receptor antagonism with BQ-123 is insufficient to inhibit angioplasty induced neointima formation in the rat. *Cardiovasc Res.* 1995;29:641-6.
247. Azuma H, Hamasaki H, Niimi Y, et al. Role of endothelin-1 in neointima formation after endothelial removal in rabbit carotid arteries. *Am J Physiol* 1994;267:H2259-H2267.

248. Burke SE, Lubbers NL, Gagne GD, et al. Selective antagonism of the ET(A) receptor reduces neointimal hyperplasia after balloon-induced vascular injury in pigs. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997;30:33-41.
249. McKenna CJ, Burke SE, Opgenorthe TJ, Padley RJ, Camrud LJ, Camrud AR, et al. Selective ET_A receptor antagonism reduces neointimal hyperplasia in a porcine coronary stent model. *Circulation* 1998;97:2551-6.
250. Dashwood MR, Noertersheuser P, Kirchengast M, Munter K. Altered endothelin-1 binding following balloon angioplasty of pig coronary arteries: effect of the ET_A receptor antagonist, LU 135252. *Cardiovasc Res* 1999;43:445-56.
251. Huckle WR, Drag MD, Acker WR, et al. Effects of L-749,329, an ET_A/ET_B endothelin receptor antagonist, in a porcine coronary artery injury model of vascular restenosis. *Circulation* 2001;103:1899-1905.
252. Clozel M, Endothelin receptor antagonists: current status and perspectives. *J Cardiovasc Pharmacology* 2000;35(suppl 2):S65-S68.
253. Fleming T, Lindenfeld J, Lipicky R, Armstrong P. Report From the 93rd Cardiovascular and Renal Drugs Advisory Committee Meeting, August 9–10, 2001. *Circulation* 2001;104:1742.
254. Teerlink JR, Löffler B-M, Hess P, et al. Role of endothelin in the maintenance of blood pressure in conscious rats with chronic heart failure. Acute effects of the endothelin receptor antagonist Ro 47-0203 (bosentan). *Circulation* 1994;90:2510-18.
255. Choussat R, Hittinger L, Barbe F, et al. Acute effects of an endothelin-1 receptor antagonist bosentan at different stages of heart failure in conscious dogs. *Cardiovasc Res* 1998;39:580-8.
256. Clozel M, Breu V, Gray GA, et al. Pharmacological characterization of bosentan a new potent orally active nonpeptide endothelin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;270:228-35.
257. Kiowski W, Sutsch G, Hunziker P, et al. Evidence for endothelin-1 mediated vasoconstriction in severe chronic heart failure. *Lancet* 1995;346:732-6.
258. Wenzel RR, Fleisch M, Shaw S, et al. Hemodynamic and coronary effects of the endothelin antagonist bosentan in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1998;98:2235-40.
259. Weber C, Schmitt R, Birnboeck H, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the endothelin-receptor antagonist bosentan in healthy human subjects. *Clin Pharmacol Ther* 1996;60(2):124-37.

260. Weber C, Schmitt R, Birnboeck H, et al. Multiple-dose pharmacokinetics, safety, and tolerability of bosentan endothelin receptor antagonist, in healthy male volunteers. *J Clin Pharmacol* 1999;39:703-14.
261. Weber C, Gasser R, Hopfgartner G. Absorption, excretion, and metabolism of the endothelin receptor antagonist bosentan in healthy male subjects. *Drug Metab Dispos* 1999;27:810-5.
262. Digemans J, Bodin F, Weidekamm E, et al. Influence of food intake and formulation on the pharmacokinetics and metabolism of bosentan, a dual endothelin receptor antagonist. *J Clin Pharmacol* 2002;42:283-9.
263. Myauchi T, Yanagisawa M, Iida K, et al. Age- and sex-related variation of plasma endothelin-1 concentration in normal and hypertensive subjects. *Am Heart J* 1992;123:1092-3.
264. Ergul S, Parish DC, Puett D, et al. Racial differences in plasma endothelin-1 concentrations in individuals with essential hypertension. *Hipertensión* 1996;28:652-5.
265. Yokokawa K, Tahara H, Kohno M, et al. Hypertension associated with endothelin-secreting malignant hemangioendothelioma. *Ann Intern Med* 1991;114:213-5.
266. Karam H, Heudes D, Gonzales MF, et al. Respective role of humoral factors and blood pressure in aortic remodeling of DOCA hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1996;9:991-8.
267. Chillon JM, Heistad DD, Baumbach GL. Effects of endothelin receptor inhibition on cerebral arterioles in hypertensive rats. *Hypertension* 1996;27:794-8.
268. d'Uscio LV, Shaw S, Moreau P, et al. Blood pressure independent effects of chronic selective ETA-receptor blockade in L-NAME-induced hypertension. *J Hypertens* 1998;16(suppl 2):S90. Abstract.
269. Moreau P, Takase H, Kung CF, et al. Blood pressure and vascular effects of endothelin blockade in chronic nitric-oxide deficient hypertension. *Hypertension* 1997;29:763-9.
270. Zhang Y, Oliver JR, Horowitz JD. Endothelin B receptor-mediated vasoconstriction induced by endothelin A receptor antagonist. *Cardiovasc Res* 1998;39:665-73.
271. Krum H, Viskoper RJ, Lacourcière Y, et al. The effect of an endothelin-receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. *New Engl J Med* 1998;338:784-90.
272. Sakai S, Yorikane R, Miyauchi T, et al. Altered production of endothelin-1 in the hypertrophied rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995;26:S452-S455.
273. Tonessen T, Christensen G, Oie E, et al. Increased cardiac expression of endothelin-1 mRNA in ischemic heart failure in rats. *Cardiovasc Res* 1997;33:601-10.

274. Cody RJ, Haas GJ, Binkley PF, et al. Plasma endothelin correlates with the extent of pulmonary hypertension in patients with chronic congestive heart failure. *Circulation* 1992;85:504-9.
275. Sorensen SS, Madsen JK, Pedersen EB. Systemic and renal effect of intravenous infusion of endothelin-1 in healthy human volunteers. *Am J Physiol* 1994;266:F411-F418.
276. Gurbanov K, Rubinstein I, Hoffman A, et al. Bosentan improves renal regional blood flow in rats with experimental congestive heart failure. *Eur J Pharmacol* 1996;310:193-6.
277. Mulder P, Richard V, Derumeaux G, et al. Role of endogenous endothelin in chronic heart failure: effect of long-term treatment with an endothelin antagonist on survival, hemodynamics, and cardiac remodeling. *Circulation* 1997;96:1976-82.
278. Sutsch G, Kiowski W, Yan XW, et al. Short-term oral endothelin-receptor antagonist therapy in conventionally treated patients with symptomatic severe chronic heart failure. *Circulation* 1998;98:2262-8.
279. Ensayos clínicos "REACH" y "ENABLE", en: <http://www.cardiosource.com/trials>
280. Barst RJ, Rubin LJ, Long WA, et al. A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension: The Primary Pulmonary Hypertension Study Group. *N Engl J Med* 1996;334:296-301.
281. Hoeper MM, Schwarze M, Ehlerting S, et al. Long-term treatment of primary pulmonary hypertension with aerosolized iloprost, a prostacyclin analogue. *N Engl J Med* 2000;342:1866-70.
282. Okano Y, Yoshioka T, Shimouchi A, Satoh T, Kunieda T. Orally active prostacyclin analogue in primary pulmonary hypertension. *Lancet* 1997;349:1365.
283. Olschewski H, Simonneau G, Galie N, et al. Inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 2002;347:322-9.
284. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, et al. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1993;328:1732-9.
285. Chen SJ, Chen YF, Meng QC, et al. Endothelin-receptor antagonist bosentan prevents and reverses hypoxic pulmonary hypertension in rats. *J Appl Physiol* 1995;79:2122-31.
286. Franco-Cereceda A, Holm P. Selective or nonselective endothelin antagonists in porcine hypoxic pulmonary hypertension? *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;3(Suppl 1):S447-52.
287. Williamson DJ, Wallman LL, Jones R, et al. Hemodynamic effects of Bosentan, an endothelin receptor antagonist, in patients with pulmonary hypertension. *Circulation* 2000;102:411-8.

- 288.Channick RN, Simonneau G, Sitbon O, et al. Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. *Lancet* 2001;358:1119-23.
- 289.Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, et al. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2002;346:896-903.
- 290.Roux S, Löffler BM, Gray GA, et al. The role of endothelin in experimental cerebral vasospasm. *Neurosurgery* 1995;37:78-85.
- 291.Zimmermann M. Endothelin in cerebral vasospasm. Clinical and experimental results. *J Neurosurg Sci* 1997;41:139-51.
- 292.Hele DJ, Birell M, Bus RC, et al. Selective ETA and mixed ETA/ETB receptor antagonists inhibit balloon catheter-induced smooth muscle cell proliferation in the rat thoracic aorta. *Br J Pharmacol* 1995;114:199 (abstract).
- 293.Marano G, Palazzesi S, Bernucci P, et al. ET(A)/ET(B) receptor antagonist bosentan inhibits neointimal development in collared carotid arteries of rabbits. *Life Sci* 1998;63:PL259-66.
- 294.Okada K, Nishida Y, Murakami H, et al. Role of endogenous endothelin in the development of graft arteriosclerosis in rat cardiac allografts: antiproliferative effects of bosentan, a nonselective endothelin receptor antagonist. *Circulation* 1998;97:2346-51.
- 295.Teerlink JR, Carteaux JP, Sprecher U, et al. Role of endogenous endothelin in normal hemodynamic status of anesthetized dogs. *Am J Physiol* 1995;268:H432-H440.
- 296.Boulanger C, Lüscher TF. Release of endothelin from the porcine aorta: inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest*. 1990;85:587-90.
- 297.Lepailleur-Enouf D, Valdenaire O, Philippe M, et al. Thrombin induces endothelin expression in arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278(5):H1606-12.
- 298.Boulanger CM, Lüscher TF. Hirudin and nitrates inhibit the thrombin-induced release of endothelin from the intact porcine aorta. *Circ Res* 1991;68:1768-72.
- 299.Matsuura A, Yamochi W, Hirata K, et al. Stimulatory interaction between vascular endothelial growth factor and endothelin-1 on each gene expression. *Hypertension* 1998;32:89-95.
- 300.Corder R, Carrier M, Khan N, et al. Cytokine regulation of endothelin-1 release from bovine aortic endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995;26(suppl 3):S56-S58.
- 301.Kanse SM, Wijelath E, Kanthou C, et al. The proliferative responsiveness of human vascular smooth muscle cells to endothelin correlates with endothelin receptor density. *Lab Invest*. 1995;72:376-82.

302. Ross R. Atherosclerosis- an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.
303. Peacock AJ, Dawes KE, Shock A, et al. Endothelin-1 and endothelin-3 induce chemotaxis and replication of pulmonary artery fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992;7:492-9.
304. Lonchamp MO, Pinelis S, Goulin J, et al. Proliferation and Na⁺/H⁺ exchange activation by endothelin in vascular smooth muscle cells. *Am J Hypertens.* 1991;4:776-9.
305. Piacentini L, Gray M, Honbo NY, et al. Endothelin-1 stimulates cardiac fibroblast proliferation through activation of protein kinase C. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:565-76.
306. Kawanabe Y, Hashimoto N, Masaki T. Effects of extracellular Ca²⁺ influx on endothelin-1-induced intracellular mitogenic cascades in C6 glioma cells. *Eur J Pharmacol* 2002;435:119-23.
307. Kawanabe Y, Hashimoto N, Masaki T. Ca(2+) channels involved in endothelin-induced mitogenic response in carotid artery vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282:C330-7.
308. Aquilla E, Whelchel A, Knot HJ, et al. Activation of multiple mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways by the endothelin B receptor requires the cytoplasmic tail. *J Biol Chem* 1996;271:31572-9.
309. Mathew V, Hasdai D, Lerman A. The role of endothelin in coronary atherosclerosis. *Mayo Clin Proc* 1996;71:769-77.
310. Rizvi M, Katwa LC, Spadone DP, Myers PR. The effects of endothelin-1 on collagen type I and type III synthesis in cultured porcine coronary vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 1996;28:243-52.
311. Weber H, Webb ML, Serafino R, Endothelin-1 and angiotensin II stimulate delayed mitogenesis in cultured rat smooth muscle cells-Evidence for common signaling mechanisms. *Mol Endocrinol* 1994;8:148-58.

