



ORIGINAL

El conejo como modelo de experimentación. Inducción de lesión vascular: técnica e incidencias

M.D. Ferrer^{a,*}, E. Esteban^a, F. Liste^b, J.M. Carrillo^b, J.J. Ramos^b, M.T. Balastegui^b y O. Cosín^a

^aRadiología Vascular Intervencionista, Departamento de Radiología, Hospital de la Ribera, Alzira, Valencia, España

^bDepartamento de Morfología Animal, Facultad de Veterinaria, CEU, Moncada, Valencia, España

Recibido el 8 de junio de 2009; aceptado el 23 de septiembre de 2009

Disponible en Internet el 24 de diciembre de 2009

PALABRAS CLAVE

Arteriosclerosis;
Angioplastia;
Hipercolesterolemia;
Técnicas
endovasculares;
Radiología
intervencionista

Resumen

Objetivo: Describir el proceso para conseguir la lesión aterogénica en el conejo, mostrar el daño vascular producido por 2 catéteres de balón de diferente calibre y el valor de la ecografía para su cuantificación.

Material y métodos: Se emplearon 36 conejos. Se estudiaron los valores de triglicéridos y colesterol, y se realizó una ecografía de aorta e ilíacas. Se realizó una arteriografía y se indujo la lesión vascular denudando la arteria ilíaca izquierda con catéter de balón: grupo A, catéter-balón 2,5 mm, y grupo B catéter-balón 3 mm de diámetro. Tras 8 semanas con dieta hiperlipídica se realizaron nuevas mediciones bioquímicas y ecográficas.

Resultados: Colesterol antes de la dieta $37,96 \pm 19,3$ mg/dl, y tras la dieta $1.761 \pm 296,91$ mg/dl. Los hallazgos ecográficos mostraron un diámetro de la aorta de $4,1 \pm 0,7$ mm, de la arteria ilíaca derecha de $3 \pm 0,3$ mm, de la arteria ilíaca izquierda de $3 \pm 0,4$ mm. Tras el daño vascular y 8 semanas de dieta, en el grupo A la luz de la aorta era de $2,78 \pm 1,21$ mm, la arteria ilíaca derecha media $2,18 \pm 0,81$ mm y la arteria ilíaca izquierda $1,16 \pm 0,63$ mm; en el grupo B la luz de la aorta fue de $3,07 \pm 1,06$ mm, la arteria ilíaca derecha $2,53 \pm 0,9$ mm y la arteria ilíaca izquierda $1,39 \pm 1,1$ mm.

Murieron 4 conejos y de los 32 restantes hubo más morbilidad con el catéter de balón de 3 mm.

Conclusiones: Tras la denudación con catéter de balón y dieta los conejos desarrollan estenosis de la arteria. El daño con catéter de 2,5 mm de diámetro disminuye las complicaciones.

© 2009 SERAM. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: lolesferrer@ono.com (M.D. Ferrer).

KEYWORDS

Arteriosclerosis;
Angioplasty;
Hypercholesterolemia;
Endovascular techniques;
Interventional radiology

The rabbit as an experimental model: technique for the induction of vascular lesions and incidents

Abstract

Objective: To describe the process for inducing atherogenic lesions in rabbits, to show the damage to vessels caused by two different caliber balloon catheters, and to show the usefulness of ultrasonography in the quantification of vascular damage.

Material and methods: We used 36 rabbits. We studied the levels of triglycerides and cholesterol and examined the aorta and iliac arteries by ultrasonography. We performed arteriography and induced a vascular lesion by denuding the left iliac artery with a balloon catheter: group A 2.5 mm diameter balloon catheter, group B 3 mm diameter balloon catheter. After 8 weeks on a hyperlipidic diet, biochemical and ultrasonographic measurements were repeated.

Results: Cholesterol before the diet: 37.96 ± 19.3 mg/dL and after the diet: 1761 ± 296.91 mg/dL. The baseline ultrasonographic measurements of vessel diameter were: aorta 4.1 ± 0.7 mm, right iliac artery 3 ± 0.3 mm, left iliac artery 3 ± 0.4 mm. After vascular damage and 8 weeks hyperlipidic diet, in group A the ultrasonographic measurements of vessel diameter were: aortic lumen 2.78 ± 1.21 mm, right iliac artery 2.18 ± 0.81 mm, and the left iliac artery 1.16 ± 0.63 mm; in group B, the aortic lumen measured 3.07 ± 1.06 mm, the right iliac artery 2.53 ± 0.9 mm, and the left iliac artery 1.39 ± 1.1 mm.

Four rabbits died; in the 32 remaining rabbits, morbidity was higher with a 3 mm balloon catheter.

Conclusion: After denudation with a balloon catheter and a hyperlipidic diet, the rabbits developed arterial stenosis. The damage with a 2.5 mm diameter catheter reduces complications.

© 2009 SERAM. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La arteriosclerosis y sus complicaciones cardiovasculares son la primera causa de morbilidad en los países desarrollados. Estudios en humanos y animales indican que ésta se inicia por cambios en la función del endotelio de los vasos¹.

Los conejos se han usado como modelo experimental para el estudio de las patologías cardiovasculares por desarrollar rápidamente lesiones ateromatosas si son alimentados con una dieta rica en colesterol^{2,3}. Estas lesiones tienen un mayor contenido en lípidos y macrófagos que las observadas en los seres humanos. El daño vascular inducido hace que sean más estables y uniformes en el tamaño y distribución⁴.

Los objetivos del trabajo son describir el proceso empleado para conseguir la lesión aterogénica en el conejo, describiendo la dieta y la técnica de lesión vascular en la arteria ilíaca con catéter de balón para que pueda ser reproducible, mostrar el daño vascular que se produce por 2 catéteres de balón de diferente calibre y analizar el valor de la ecografía en la cuantificación del daño vascular.

Material y métodos

El material animal consta de 36 conejos blancos de raza Nueva Zelanda de 3 meses de edad y un peso aproximado de 3 kg (18 machos y 18 hembras). Los conejos proceden de la granja cúnica experimental del Departamento de Ciencia Animal de la Universidad Politécnica de Valencia y han sido

mantenidos de acuerdo con la legislación española para el mantenimiento de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, reflejado en el punto 3 del artículo 11 del Real Decreto 223/1988 del 14 de marzo y en la normativa de la Unión Europea referente a la Experimentación y Protección Animal (86/609/CCE).

Examen físico de los conejos

A la recepción de los animales se les realizó un examen físico general para demostrar su viabilidad para el trabajo. Se evaluó el estado general: actitud de alerta, auscultación cardíaca y pulmonar, peso, analítica sanguínea y examen ecográfico para constatar la integridad de las arterias aorta y ambas ilíacas primitivas.

Sedación

Se realizó una sedación mediante la inyección en la musculatura dorsal del lomo de xilazina (Xylagesic 2%, Calier[®]) a dosis de 3 mg/kg y ketamina (Imalgene 1.000, Merial[®]) a dosis de 20 mg/kg. Como analgésico se añadió morfina (Morfina 2%, Braun[®]) a dosis de 0,2 mg/kg.

Una vez el animal estaba sedado e inmóvil, se rasuró la parte exterior de la oreja del conejo y se colocó un catéter intravenoso en la vena auricular marginal. Se extrajo sangre y se midieron parámetros hematológicos y bioquímicos, de los que destacan para nuestro estudio los valores de colesterol y triglicéridos.

Examen ecográfico

Se utilizó un ecógrafo de alta resolución Acusón® 128 XP/10, usando transductores de 5 y de 7,5 MHz.

Se rasuró el área paravertebral caudal izquierda del abdomen y aseguramos un buen contacto entre el transductor y la piel. Se posicionó al animal en decúbito lateral derecho, de manera que se dispuso de una ventana acústica adecuada para realizar los registros ecográficos de la aorta y de la arteria ilíaca primitiva izquierda. Se identificó en modo ecográfico bidimensional la última sección de la aorta abdominal y el inicio de la arteria ilíaca primitiva izquierda, tomando las medidas correspondientes al diámetro de la aorta y de la arteria ilíaca primitiva en un corte longitudinal. Se utilizó Doppler color verificando el correcto flujo de la aorta e ilíaca, y la ausencia de alteraciones.

Técnica de cateterización arterial

El objetivo de la cateterización fue alojar el balón de angioplastia para conseguir daño arterial (técnica de denudación) en la arteria ilíaca primitiva izquierda. La elección de esta arteria se debe a su similitud en diámetro a las arterias infrapoplíteas y coronarias, que son más afectadas por patologías arteriosclerosas y serían extrapolables al humano. Consta de 3 fases: anestesia y posicionamiento del conejo, abordaje quirúrgico para la exteriorización de la carótida y la cateterización mediante de técnica de Seldinger.

Anestesia y posicionamiento del conejo. La inducción anestésica se realizó con propofol (Propofol Lipuro® Braun) a una dosis de 3 mg/kg y, para su mantenimiento anestésico, se conectó a un perfusor continuo de propofol (Perfusor® fm, Braun) una dosis de 15 ml/h.

Posicionado el conejo en decúbito dorsal, se extiendieron caudalmente las extremidades anteriores y se inmovilizó al animal mediante bolsas de arena colocadas (fig. 1). El cuello se extendió y se mantuvo en esa posición con esparadrapo, identificando a cada animal con letras de plomo. La zona a incidir se limpió y desinfectó con solución de povidona yodada aislando la arteria mediante la colocación de un paño estéril.

Abordaje quirúrgico para la exteriorización de la arteria carótida. El abordaje se realizó mediante una incisión en la piel con un bisturí del número 10 en la zona media del cuello del conejo. Con tijeras se incidió el músculo superficial del cuello, inmediatamente debajo aparecen los músculos esternocefálico y esternohioideo, que se cortaron siguiendo longitudinalmente la línea intermuscular y se lateralizaron,



Figura 1 Posicionamiento del conejo.



Figura 2 Arteriografía normal del conejo.

apareciendo en profundidad la tráquea. Una vez ésta es desplazada lateralmente, se ve la vaina carotídea, integrada por la arteria carótida, el tronco vagosimpático y la vena yugular interna. Disecando cuidadosamente con una pinza de hemostasia (mosquito) aislamos la carótida que queda exteriorizada y preparada para la cateterización.

Cateterización mediante técnica de Seldinger. Con ayuda de un abocath de 18 g se puncionó la arteria carótida que se encontraba exteriorizada y se introdujo una guía hidrofílica (0,035" J 180 cm Terumo®) unos pocos centímetros. Con ayuda de fluoroscopia (Bennet® X-ray Technologies) se dirigió la punta de la guía a la aorta descendente torácica, ya que espontáneamente la guía se introduce en el corazón, el nivel anatómico guiado por fluoroscopia para el giro de la punta de la guía es la primera costilla. Una vez la guía estaba en la aorta abdominal se colocaba el introductor (Radiofocus introducer® II de 4 fr, Terumo) hasta que estaba completamente insertado en la aorta abdominal. Se inyectó por el introductor heparina sódica a dosis de 25 UI/ml en cada conejo para evitar trombosis.

A través del introductor se realizó una arteriografía de la aorta abdominal con todas sus ramas viscerales, que incluye la zona pélvica para asegurar la normalidad de las arterias con 10 ml de iohexol (Omnigraf 350® Schering-Plough) diluido al 50% en suero fisiológico heparinizado (fig. 2).

Técnica de denudación de la arteria con ayuda de un catéter de balón

Introdujimos directamente a través del introductor los catéteres de angioplastia (Symmetry® balloon dilatation catheter, Boston Scientific®). Todos los catéteres tenían una longitud de 20 mm. No nos ayudamos de una guía, ya que los catéteres navegan bien y alcanzan con un mínimo de manipulación la arteria ilíaca primitiva izquierda.

Se establecieron 2 grupos de trabajo: grupo A, 20 animales en los que se realizó la denudación vascular usando un balón de 2,5 mm de expansión máxima, y grupo B, 12 animales en los que se realizó la denudación vascular inflando el balón a 3 mm de grosor.

La técnica de denudación endotelial, descrita ya por otros autores^{5,6}, consistió en hinchar el balón en la zona que se pretende lesionar y una vez inflado realizar unos movimientos cortos y firmes hacia delante y hacia atrás (4 veces durante 2 s), provocando el daño endotelial deseado. A continuación se deshinchó el catéter de balón



Figura 3 Efecto inmediato de la denudación en la arteria ilíaca izquierda. Disminución de su calibre debido al espasmo que se produce tras el daño arterial.

Tabla 1 Composición de la dieta hiperlipídica

Ingredientes	%
Cebada	12,0
Salvado de trigo	30,0
Torta de girasol	10,0
Semilla de girasol	1,5
Heno de alfalfa	28,0
Pulpa de remolacha	4,0
Paja de cereal	4,0
Melaza de caña	1,0
Manteca	0,5
Aceite de palma*	6,0
Colesterol	1,0
Bicarbonato sódico	0,6
Carbonato cálcico	0,6
Cloruro sódico	0,3
Corrector de vitaminas y oligoelementos	0,5

En cursiva se resaltan los ingredientes añadidos a la dieta habitual.

*GRACOM, Silla, Valencia, España.

y se extrajo, y a través del introductor se realizó una nueva arteriografía aórtica para valorar el efecto del balón y descartar posibles complicaciones (fig. 3).

La arteria carótida se cerró intentando respetar su luz con sutura monofilamento absorbible (Safil® 5/0, Braun®). Los músculos se suturaron por planos y la piel con sutura intradérmica, ambos con material multifilamento absorbible (Safil® 3/0, Braun®).

Como terapia posquirúrgica se administró meloxicam (Metacam®, Schering-Plough®) a dosis de 1 mg/kg, enroxafacino (Baytril®, Bayer®) a dosis de 1 mg/Kkg y buprenorfina (Buprex®, Schering-Plough®) a dosis de 0,05 mg/kg.

Dieta hiperlipídica

A partir de este momento, se les administró una dieta hiperlipídica que consumían “ad libitum” durante 8 semanas. La composición de la dieta la recoge la tabla 1. A la descripción de la dieta de los conejos hay que destacar

la adición del 1% de cristales de colesterol puro y el 6% de aceite de palma para aumentar el efecto aterogénico.

Una vez transcurrido este tiempo, se les realizaba una nueva ecografía Doppler, tanto de la aorta como de las arterias ilíacas primitivas derecha e izquierda, valorando la respuesta de las arterias, tanto a la dieta como a la injuria intraarterial en la arteria ilíaca primitiva izquierda. También se realizó una nueva extracción de sangre y se volvían a medir los parámetros analíticos.

Análisis estadístico

Se utilizó estadística descriptiva y la prueba de χ^2 para la comparación de variables. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando se obtuvo una $p < 0,05$.

Resultados

De los 36 animales que empezaron el estudio, sólo lo acabaron 25, lo que representa un porcentaje de supervivencia general de un 69,44%, en 32 animales se pudo iniciar el proceso de cateterización y angioplastia, que supone un 78,13%.

A efecto de simplificar los resultados hemos considerado conveniente analizar los datos dividiéndolo en 2 fases bien definidas: el manejo anestésico y el manejo quirúrgico.

Manejo anestésico. En primer lugar, el protocolo de sedación fue útil, sin bajas y con resultados satisfactorios.

La inducción anestésica mediante propofol produjo 4 bajas en un total de 36 animales, lo que representa un 11,11%.

Manejo quirúrgico. Los resultados se dividieron en los 2 grupos de trabajo:

- En el grupo A (integrado por 20 animales en los que se usó balón de angioplastia de 2,5 mm de diámetro) superaron el posquirúrgico 17 animales (85%) y hubo 3 bajas (2 por hemorragia carotídea durante la cateterización y 1 por rotura de la arteria ilíaca).
- En el grupo B (integrado por 12 animales en los que se usó balón de angioplastia de 3 mm de diámetro) superaron el posquirúrgico 8 animales (66,67%) y hubo 4 bajas (3 por rotura de la arteria ilíaca izquierda tras manipulación con el balón y 1 por rotura aórtica) (fig. 4).

Los resultados analíticos de las pruebas de bioquímica basales y tras las 8 semanas de la dieta aterogénica se recogen en la tabla 2, destacando el aumento significativo



Figura 4 Rotura de la arteria ilíaca izquierda con extravasación de contraste.

Tabla 2 Resultados analíticos

	Predietra aterogénica	Posdieta aterogénica
Colesterol plasmático (mg/dl)	$37,96 \pm 19,3$	$1791 \pm 296,91^*$
Triglicéridos plasmáticos (mg/dl)	$30,04 \pm 11,01$	$36,16 \pm 10,20$

*Estadísticamente significativa, $p < 0,01$.

Tabla 3 Resultados de la ecografía

	Luz aorta (mm)	Luz aorta ilíaca derecha (mm)	Luz aorta ilíaca izquierda (mm)
Exploración basal	$4,1 \pm 0,7$	$3 \pm 0,3$	$3 \pm 0,4$
Grupo A. Tras daño vascular+8 semanas de dieta	$2,78 \pm 1,21$	$2,18 \pm 0,81^a$	$1,16 \pm 0,63^a$
Grupo B. Tras daño vascular+8 semanas de dieta	$3,07 \pm 1,06$	$2,53 \pm 0,9^a$	$1,39 \pm 1,1^{a,b}$

Entre el grupo A y grupo B no hay diferencias significativas, $p > 0,05$.

^aHay diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las arterias iliacas izquierda y derecha, demostrando la efectividad del daño vascular.

^bEn 2 arterias se objetivó obstrucción completa.

de los valores de colesterol en sangre mientras que los triglicéridos no presentaron diferencias significativas. Tampoco hay diferencias entre los valores de colesterol y triglicéridos entre machos y hembras.

Los resultados de la exploración ecográfica mediante la medición de la luz de los vasos, tanto basal como después de la lesión arterial con el catéter y la dieta hiperlipídica, se muestran en la tabla 3. La valoración del estudio estadístico de los diámetros de la aorta y de ambas ilíacas determina que no hay diferencias estadísticamente significativas entre el grupo A y el grupo B, con valores de $p > 0,05$. Así como tampoco se objetiva diferencia significativa entre conejos varones o hembras. En cambio, sí es estadísticamente significativa la disminución en la luz arterial de la arteria ilíaca izquierda, donde se ha practicado la angioplastia para la denudación con respecto a la luz de la arteria ilíaca derecha.

Discusión

El conejo es un animal de experimentación utilizado por su facilidad de manejo, su accesibilidad y en el que se reproducen procesos experimentales que pueden extrapolarse al ser humano^{5,7,8}. En estudios recientes, la ecografía se ha revelado como muy útil a la hora de evaluar las alteraciones producidas por las placas de ateroma en las principales arterias al ser una herramienta no invasiva que no pone en peligro la vida del animal⁹.

El manejo anestésico usado en el protocolo de sedación fue muy útil, ya que no se produjo ninguna baja en nuestro grupo de animales. En cambio, la inducción anestésica con propofol produjo 4 bajas, la razón es que los conejos son muy sensibles al estrés, lo cual se traduce en alteraciones fisiológicas, como taquicardias severas, que hace que los accidentes anestésicos sean habituales¹⁰.

Durante la manipulación quirúrgica, las 2 muertes que hubo por hemorragia carotídea en el momento de la punción las atribuimos a la curva de aprendizaje, ya que se produjeron en el segundo y octavo conejos, no sucediendo posteriormente este evento.

Como ya se ha publicado, los conejos desarrollan rápidamente lesiones ateromatosas si son alimentados con una dieta hipercolesterolémica^{2,3}, como lo demuestran los resultados de nuestro estudio con un incremento de las cifras de colesterol basal tras la dieta. La lesión que se produce en el vaso acelera la formación de placas de ateroma, y las hace más estables y uniformes en tamaño y distribución⁴. En este modelo para producir la denudación arterial, la angioplastia causa un estrechamiento radial de la arteria, así como daño por compresión de la media, hemorragia intramural y disección de la capa íntima y/o media, la respuesta vascular subsiguiente es la respuesta inflamatoria. La reestenosis resulta de la combinación del trombo mural, llenando las placas de disección y formando un crecimiento celular sumado a los depósitos de colágeno y elastina en la íntima, media y adventicia de la arteria¹¹. Esto se demuestra en este estudio con las mediciones del vaso por ecografía, ya que el diámetro de la luz arterial de la ilíaca dañada con el balón de angioplastia es menor que la ilíaca contralateral que únicamente se ha sometido a la dieta.

Importante es la elección del tamaño del balón de angioplastia para producir el daño vascular, ya que el balón de 2,5 mm produjo menos complicaciones que el catéter de balón de 3 mm de diámetro, por lo que la consecuencia práctica es que, puesto que los 2 tamaños de balones infieren lesiones ateromatosas de similar magnitud, aconsejamos usar un balón de menor diámetro que la arteria sana para minimizar las complicaciones.

Hay que tener en cuenta que la imagen arteriográfica de estenosis que se produce después de la denudación arterial se debe al espasmo arterial como respuesta del vaso a la

lesión y los valores fiables son los obtenidos con ecografía 8 semanas después (fig. 3).

Como conclusión, el conejo es un animal válido para desarrollar un modelo aterogénico y el daño vascular con balón de angioplastia es preferible realizarlo con un balón de diámetro menor que el diámetro del vaso. La ecografía se considera el método diagnóstico de elección para la valoración de la respuesta arterial tras el daño vascular.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Autoría

M.D. Ferrer ha realizado la concepción y diseño del estudio, la obtención de datos y su interpretación.

E. Esteban y F. Liste han contribuido en la concepción y diseño del estudio así como en una revisión crítica de la redacción del trabajo.

J.M. Carrillo y J.J. Ramos han contribuido en la obtención de los datos para el estudio.

M.T. Balastegui ha realizado su aportación en el análisis de los datos y ha contribuido en la redacción.

O. Cosín ha realizado una revisión crítica del artículo haciendo aportaciones intelectuales relevantes que han servido para su redacción.

Bibliografía

1. Ross R. Atherosclerosis. An Inflammatory Disease. *New Engl J Med.* 1999;340:115-26.
2. Kato K, Elsayed YA, Namoto M, Nakagawa K, Sueishi K. Enhanced expression of tissue factor activity in the atherosclerotic aortas of cholesterol-fed rabbits. *Thromb Res.* 1996;82:335-47.
3. Camera M, Toschi V, Comparato C, Baetta R, Rossi F, Fuortes M, et al. Cholesterol-induced thrombogenicity of the vessel wall: inhibitory effect of fluvastatin. *Thromb Haemost.* 2002;87:748-55.
4. Aikawa M, Rabkin E, Okada Y, Voglic SJ, Clinton SK, Brinckerhoff CE, et al. Lipid lowering by diet reduces matrix metalloproteinase activity and increases collagen content of rabbit atheroma: a potential mechanism of lesion stabilization. *Circulation.* 1998;7:2433-44.
5. Narayanaswamy M, Wright KC, Kandarpa K. Animal models for atherosclerosis, restenosis and endovascular graft research. *J Vasc Intervent Radiol.* 2000;11:5-17.
6. Cheema AN, Nili N, Li CW, Whittingham HA, Linde J, Van Suylen RJ, et al. Effects of intravascular cryotherapy on vessel repair in a balloon-injured rabbit iliac artery model. *Cardiovasc Res.* 2003;59:222-33.
7. Wilensky RL, March KL, Gradus-Pizlo I, Sandusky G, Fineberg N, Hathaway DR. Vascular injury, repair and restenosis after percutaneous transluminal angioplasty in the atherosclerotic rabbit. *Circulation.* 1995;92:2995-3005.
8. Dillavou E, Cupp P, Consigny PM. Delivery of endothelial cells to balloon-dilated rabbit arteries with use of a local delivery catheter. *J Vasc Intervent.* 2001;12:601-5.
9. Wetterholm R, Caidahl K, Volkmann R, Brandt-Eliasson U, Fritzsche-Danielson R, Gan LM. Imaging of atherosclerosis in WHHL rabbits using high-resolution ultrasound. *Ultrasound Med Biol.* 2007;33:720-6.
10. Hillyer EV, Quesenberry KE. Ferrets, rabbits and rodents. *Clinical Medicine and Surgery*, 1st ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1997 (p. 382-5).
11. Strauss BH, Chisholm RJ, Keeley FW, Gottlieb AI, Logan RA, Armstrong PW. Extracellular injury in a rabbit model of restenosis. *Circ Res.* 1994;75:650-8.