

## ORIGINALES

### Modulación de la respuesta hiperplásica intimal en modelo experimental en base a la edad animal

### Modulation of the intimal hyperplasia response in experimental model according to the age of the animal

M. Rodríguez Piñero\* - J. P. Linares Palomino - V. García Róspide - C. Bohórquez Sierra\* - I. Martínez León\* - A. Sánchez Guzmán\* - J. C. Bohórquez Sierra\* - F. Arribas Aguilar\* - L. M. Salmerón Febres - J. Moreno Escobar - G. Urbano Valero\*\* - J. Martínez Gámez y E. Ros Die

Servicio de Angiología y Cirugía Vascular  
(Jefe de Servicio: Prof. E. Ros Die)  
Departamento de Cirugía de la  
Facultad de Medicina de la Universidad de  
Granada (España)

#### RESUMEN

**Objetivos:** En anteriores trabajos demostramos la validez del modelo experimental de producción de Hiperplasia intimal en ratas Wistar Albinas que propuso nuestro Grupo. La fiabilidad y constancia de los resultados con dicho modelo nos ha llevado a su utilización para posteriores experiencias. De esta forma nos propusimos, como punto inicial, estudiar si la edad del animal podría ser un factor modulador de la respuesta de la Aorta ante el estímulo inductor de la hiperplasia intimal, en nuestro modelo experimental.

**Material y métodos:** Utilizamos ratas Wistar Albinas machos, divididas en un grupo de 20 animales jóvenes, de 4 meses de edad, y otro de 20 animales envejecidos, de 24 meses. El grupo de ratas jóvenes se dividieron en 4 subgrupos, que se sacrificaron a las 1, 2, 3 y 4 semanas de la inducción de la lesión arterial, y el de las ratas envejecidas, también en 4 subgrupos, que se sacrificaron a las 2, 3, 4 y 5 semanas. A todos los animales se les practicó la misma técnica quirúrgica de lesión arterial, consistente en el arrastre de un catéter balón en la Aorta abdominal infrarrenal. Tras la recogida de las muestras, los cortes transversales se estudiaron al microscopio óptico y, con analizador de imagen, se han medido las

áreas de la luz del vaso (ALV) y de la membrana basal (AMB), cuantificándose el engrosamiento intimal mediante el cociente ALV/AMB, cuantificándose el engrosamiento intimal mediante el cociente ALV/AMB, realizándose posteriormente el tratamiento estadístico de los resultados.

**Resultados:** En ratas jóvenes encontramos cómo se produce engrosamiento intimal desde la 2.<sup>a</sup> semana, deteniéndose a la 4.<sup>a</sup> semana, mientras que en las viejas se inicia a las 3 semanas y continúa hasta las 5, encontrando diferencias claramente significativas ( $p < 0,0001$ ) a las 2, 3 y 4 semanas, siendo siempre mayor en las jóvenes.

#### Conclusiones:

- 1) El estímulo de nuestro modelo experimental induce Hiperplasia Intimal tanto en ratas jóvenes como en envejecidas (6 veces mayores).
- 2) El engrosamiento intimal se produce y estabiliza antes en ratas jóvenes.
- 3) La respuesta de las arterias de ratas ancianas es más tardía y mucho menor que en ratas jóvenes.
- 4) En definitiva, la edad influye de forma significativa en la producción de Hiperplasia Intimal en el presente modelo experimental.

**Palabras clave:** Hiperplasia intimal; modelos experimentales; rata Wistar Albina; influencia de la edad.

#### SUMMARY

**Objectives:** In previous works we show the validity of experimental model of intimal hyperplasia production in Wistar Albina rats, which was purposed by our group. The trustworthy and constancy of the results with this model permit us to use it in posterior experiences. Of this way we purpose,

\* Unidad de Angiología y Cirugía Vascular. Hospital Puerta del Mar, Cádiz.

\*\* Departamento de Fisiología Animal. Facultad de Farmacia. Universidad, Granada (España).

as first point, to study if the age of animal could be a modulator factor of the response of the aorta in the presence of the inductor stimulus of the intimal hyperplasia in our experimental model.

**Material and methods:** We use males Wistar Albina rats. Two groups: a group of 20 young animals, of 4 months of age, and another of 20 old animals, of 24 months. The young rats group was divided in 4 subgroups which were killed at 1, 2, 3 and 4 weeks after induction of the artery injury. The old rats one was divided in 4 subgroups that were killed at 2, 3, 4 and 5 weeks. The same surgical technic of artery injury was practiced to all the animals, a balloon catheter was dragged in the infrarenal abdominal aorta. After the samples are collected, the cross sections were studied to the optical microscope and with an image analyst were measured the light of the vessel area (ALV) and the basal line area (AMB), the proliferation neointimal has been expressed as the ratio ALV/AMB, we realize the stadistic treatment of the results.

**Results:** We have obtained in young rats how the intimal hyperplasia was produced from the second week, stopping to the fourth week, while in the old rats begin to the third week and continue until the fifth week, we have found statistical significant differences ( $p < 0,0001$ ) to the 2, 3 and 4 weeks, being ever major en the young ones.

#### **Conclusions:**

- 1) The stimulus of our experimental model induces intimal hyperplasia in young and old rats (six times major).
- 2) The intimal hyperplasia is produced and stabilized before in young rats than in old rats.
- 3) The response of the arteries of the old rats is later and more less than in the young rats.
- 4) After all, the age influences of significant way in the production of intimal hyperplasia in the present experimental model.

**Key words:** Intimal hyperplasia; experimentals models; Wistar Albina rats; age influence.

## **Introducción**

Conocemos que el engrosamiento intimal es un aspecto de la respuesta de cicatrización normal de las arterias a las agresiones del endotelio y que todas las formas de reconstrucción arterial causan daño y una respuesta de cicatrización consiguiente que, aunque necesaria para la función a largo plazo, también pue-

de ser la causa de engrosamiento luminal y fallo del procedimiento (1, 2). Además, estas técnicas, previamente limitadas a la Aorta y vasos grandes, se han extendido a los vasos pequeños, desarrollando frecuentemente estenosis y, en último término, trombosis espontánea, implicándose a la hiperplasia intimal como causa (3, 4).

Conocemos igualmente, a partir de estudios en animales y humanos, que el estrechamiento luminal, originado en los casos descritos, es debido principalmente a proliferación de las células musculares lisas y posterior depósito de tejido conectivo en la íntima (4). Sin embargo, en ningún estudio de los revisados en la literatura se habla de la posible influencia de la edad en el desarrollo de dicha respuesta celular a la lesión arterial. Así, una vez analizados los resultados obtenidos, desde el punto de vista anátomo-patológico, en ratas estándar (ratas machos jóvenes), y utilizando el modelo experimental de producción de Hiperplasia Intimal descrito en nuestro Grupo en anteriores trabajos (5), en el cual producimos una lesión endotelial en la Aorta abdominal infrarrenal de ratas Wistar Albinas que origina una respuesta hiperplásica fácil de objetivar, nos propusimos estudiar si existen diferencias al realizar dicha experiencia en animales de distinta edad, en concreto en ratas machos envejecidas (seis veces mayores), constituyendo este factor un elemento importante a tener en cuenta.

## **Material y métodos**

Utilizamos como animal de experimentación la *rata de raza Wistar Albina*, ampliamente utilizada en los estudios publicados consultados (6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12). En total se utilizaron unos 40 animales, siendo todos suministrados por el animalario de la Universidad de Granada, donde son criados y cuidados.

Estos animales quedaron distribuidos de la siguiente forma:

1. *Grupos de ratas machos jóvenes:* Decidimos que fueran de unos 4 meses de edad, con pesos entre 300 y 400 grs. (peso medio de 331,7 grs.), con un ritmo de crecimiento homogéneo. Utilizamos 20 animales que diferenciamos en 4 subgrupos de 5 cada uno. De forma arbitraria decidimos sacrificar el primer subgrupo a la semana de realizada la técnica quirúrgica de lesión ar-

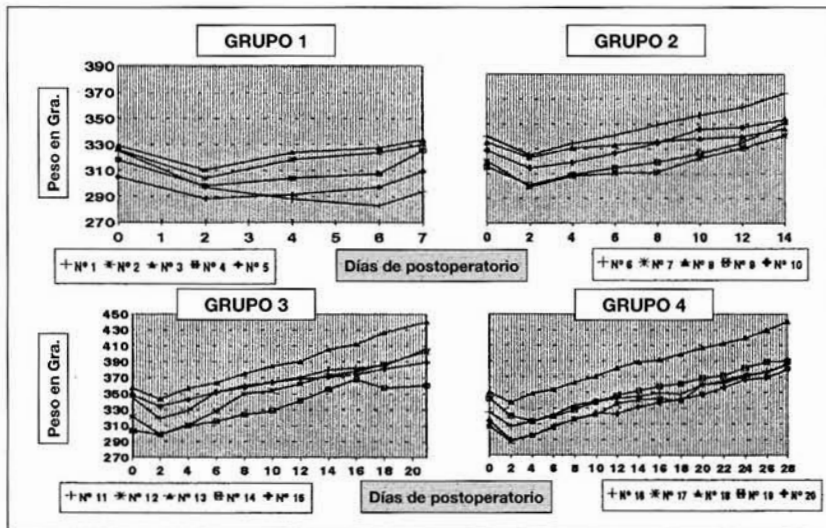


Fig. 1

terial (Grupo 1), el segundo a las 2 semanas (Grupo 2), el tercero a las 3 semanas (Grupo 3) y, por último, el cuarto a las 4 semanas (Grupo 4). Todos los animales fueron pesados previamente al procedimiento quirúrgico y, posteriormente, de forma periódica cada 2 días. Los mismos se pesaban y se intervenían conforme llegaban del animalario, de forma totalmente aleatoria (Fig. 1).

2. *Grupo de ratos machos envejecidos*: Una vez analizados los resultados obtenidos en las ratas machos jóvenes y para comprobar si la edad influía de forma determinante en los mismos, decidimos repetir aquellos grupos en los

que se obtienen resultados claramente significativos (grupos 1, 2, y 3) en ratas machos envejecidas de 24 meses de edad, es decir, seis veces mayores que las anteriores y con pesos entre 440 y 850 grs. (peso medio de 669,2 grs.). Utilizamos un total de 20 animales que se dividieron, como las ratas jóvenes, en 4 grupos de 5, sacrificados respectivamente a las 2, 3, 4 y 5 semanas de realizar la técnica quirúrgica de lesión arterial (Grupos 1V, 2V, 3V y 4V, respectivamente). El último grupo de 5 semanas decidimos realizarlo, debido a la respuesta obtenida en los otros grupos, más retardo en aparecer la hiperplasia, como se describirá al analizar los resultados (Fig. 2).

El desarrollo del modelo de lesión en sí fue practicado de manera idéntica en todos los animales. Recordando brevemente el procedimiento quirúrgico (5), se introduce un catéter-balón de Fogarty 2F (Baxter Healthcare Corporation) por la Arteria Carótida Común izquierda y se emplazaba el balón del catéter a nivel de Aorta infrarrenal, introduciéndolo todo lo que nos lo permite (unos 15-17 cms. en los animales jóvenes y unos 20-22 cms. en las viejas). Se infla a una presión de 1,6-2 atmósferas y se arrastra en dirección ascendente hasta que la marca de los 10 cms. del catéter aparece por la arteriotomía (posición suprarrenal del balón).

Este procedimiento se repite 3 veces (Fig. 3).

Una vez transcurridos los días previstos en cada animal, se procede a su sacrificio y recogida de las muestras. El segmento arterial donde hemos producido el daño intimal con el arrastre del balón (que oscila entre 3 y 5 cms, dependiendo del tamaño de la rata), se incluye en un recipiente con suero fisiológico donde, tras lavarlo cuidadosamente sin tracciones ni manipulaciones excesivas, se destina para la preparación histológica, fijándose en formaldehído tamponado al 10% y llevándose para su procesamiento por un técnico de laboratorio. Todas las extracciones fueron realizadas siguiendo

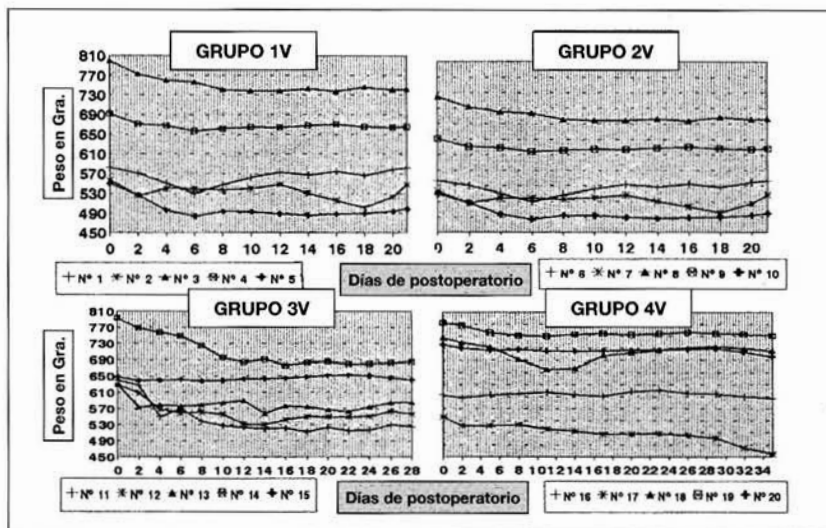


Fig. 2



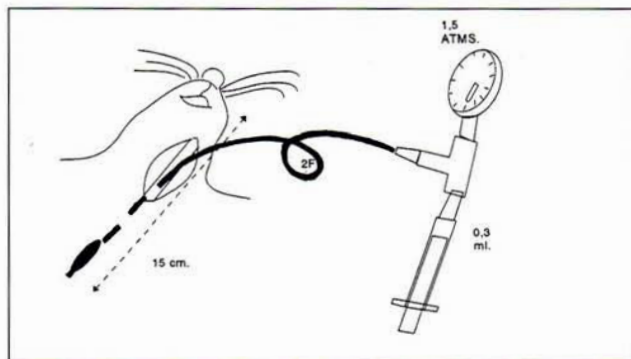


Fig. 3. Esquema general

do la misma técnica y por el mismo cirujano. Se procedió a realizar cortes transversales y a teñirlos con Hematoxilina-Eosina y con Orceína, tras el análisis de los mismos con microscopía óptica 4X, 10X, 16X y 40X, seleccionamos los mejores cortes de cada animal procediendo a la fotografía de los mismos.

Una vez fotografiados, se pasa a realizar un tratamiento digital de cada fotografía mediante un analizador de imágenes dentro de un programa informático en el Laboratorio de Análisis de Imágenes del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Realizamos la medición del área de la luz (ALV) de cada muestra y del área interna a la membrana basal

(AMB) (el área dentro de la membrana basal incluye el área de la luz), efectuando el cociente entre ambos valores (ALV / AMB) (Fig. 4). De tal forma que un cociente de 1 representará un vaso normal (13), es decir, el 100% de la luz del vaso está libre o permeable. Al efectuar el cociente y no una resta, estamos corrigiendo el posible error de que diferentes formas geométricas den medidas distintas, así como que fotos obtenidas a mayor aumento den un valor superior a otras de menor tamaño. Este cociente, por otra parte, nos está dando un valor equivalente al área de luz libre o permeable en proporción al total de la misma; es decir, si por ejemplo, el valor del cociente es 0,86, significa que el 86% del total de la luz está libre o, lo que es lo mismo, que el 14% ( $100\% - 86\% = 14\%$ ) de la misma está ocupada por la hiperplasia intimal, de tal forma que *a menor cociente, mayor crecimiento o hiperplasia intimal existe* (mayor porcentaje de luz ocupada).

El método estadístico empleado, realizado en la Cátedra de Bioestadística de la Facultad de Medicina de Granada, fue un análisis que puede dividirse en 2 grupos:

a) Análisis para las comparaciones entre las semanas dentro de cada uno de los grupos de animales, ratas machos jóvenes y ratas machos viejas.

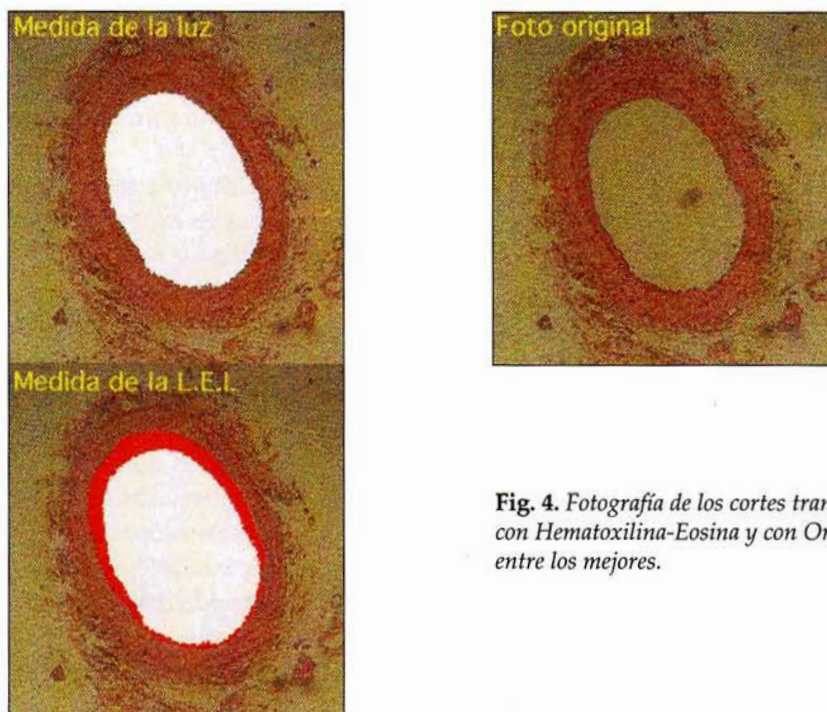


Fig. 4. Fotografía de los cortes transversales, teñidos con Hematoxilina-Eosina y con Orceína, elegidos entre los mejores.

b) Análisis para las diferencias entre grupos a las diferentes semanas; lo cual para comparar machos jóvenes contra machos viejos

El análisis a) se realizó usando el análisis de la varianza de una vía que, si dió significativo, nos llevó a realizar las comparaciones por parejas usando la metodología de Bonferroni (si todos los tamaños de muestras no eran iguales) o de Tukey (si todos los tamaños muestrales eran iguales).

El análisis b) se realizó usando el análisis de la varianza de dos vías, donde la semana era un factor y la edad el otro. En este análisis, nuestro interés se centró en el efecto del grupo y en la interacción semanas por grupo. Como la interacción dió significativa, se realizaron las comparaciones entre grupos semana a semana, usando también la penalización de Bonferroni o de Tukey en el mismo sentido que se indicó antes.

Como paso previo a todos los análisis, se hicieron contrastes de homogeneidad de varianzas que, si fueron significativos, nos llevaron a la transformación de los datos, con objeto de adecuar los mismos al modelo teórico sobre el que se basan los tests empleados.

## Resultados

Observamos en la Tabla I todos los valores del cociente ALV/AMB obtenidos en las ratas machos jóvenes. Podemos observar cómo en el grupo 1 (ratas sacrificadas a los 7 días de la lesión arterial), el valor de dicho cociente es 1, es decir, no hay crecimiento intimal medible. En el grupo 2 (2 semanas) este crecimiento sí es evidente, incrementándose claramente en el grupo 3 (3 semanas), donde es máximo, deteniéndose e incluso regresando levemente en el grupo 4 (4 semanas).

Realizando una comparación global de todos los grupos de ratas machos jóvenes (Tabla II), se pone de manifiesto unas diferencias significativas muy claras entre todos ellos ( $p < 0,0001$ ). Hechas las comparaciones por parejas, se encuentra que el grupo 1 difiere significativamente de los grupos 2, 3 y 4; el grupo 2 difiere también significativamente de los grupos 3 y 4; mientras que el grupo 3 no difiere del grupo 4.

En la Tabla III se exponen todos los valores del cociente ALV/AMB obtenidos en las ratas machos envejecidas. Se observa cómo en el grupo 1V (sacrificadas a las 2

RESULTADOS						VALORES COCIENTE ALV/AMB RATAS JOVENES
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Rata 5	Promedio
Ratas Normales	1	1	1	1	1	1
Grupo 1	1	1	1	1	1	1
Grupo 2	0,9001	0,8573	0,9077	0,8727	0,8475	0,8771
Grupo 3	0,7512	0,8261	0,7482	0,6931	0,6259	0,7289
Grupo 4	0,6820	0,7671	0,7486	0,7195	0,7634	0,7361

Tabla I

RESULTADOS						RATAS JOVENES
	VALORES PROMEDIOS COMPARATIVOS					
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	SIGNIFIC.	
Cociente L/MB	1	0,8771	0,7289	0,7361	$p < 0,0001$	
Diferencias Significativas:						
• Grupo 1 contra:						Grupo 2 Grupo 3 Grupo 4
• Grupo 2 contra:						Grupo 3 Grupo 4

Tabla II

RESULTADOS						VALORES COCIENTE ALV/AMB RATAS VIEJAS
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Rata 5	Promedio
Ratas Normales	1	1	1	1	1	1
Grupo 1V	1	1	0,9570	1	1	0,9914
Grupo 2V	0,9783	0,9886	1	0,9832	0,9429	0,9786
Grupo 3V	0,9416	0,8744	0,9686	0,9804	0,9073	0,9345
Grupo 4V	0,9264	0,8426	0,9782	0,7971	0,9163	0,8921

Tabla III

semanas tras el daño arterial) únicamente en 1 rata de las 5 se objetivó una pequeña zona de crecimiento, obteniéndose un promedio del grupo prácticamente despreciable. Este crecimiento es algo mayor en el grupo 2V (3

semanas), continuando lentamente a las 4 semanas, sin detenerse, por lo que realizamos el grupo 4V, de 5 semanas, donde fue mayor la zona de hiperplasia intimal observada. Un dato histológico que nos llamó la atención al examinar con microscopía óptica las muestras es la escasa celularidad de la pared arterial en estas ratas envejecidas, comparadas con la de las ratas jóvenes, hecho más llamativo aún en la zona de hiperplasia.

Al igual que en las ratas machos jóvenes, la comparación global de todos los grupos de animales viejos (Tabla IV), pone de manifiesto unas diferencias significativas entre todos ellos ( $p < 0,01$ ). Al hacer las comparaciones por parejas se encuentra que el grupo 4V difiere significativamente de los grupos 1V y del 2V; mientras que las restantes comparaciones no llegan a tener significación estadística.

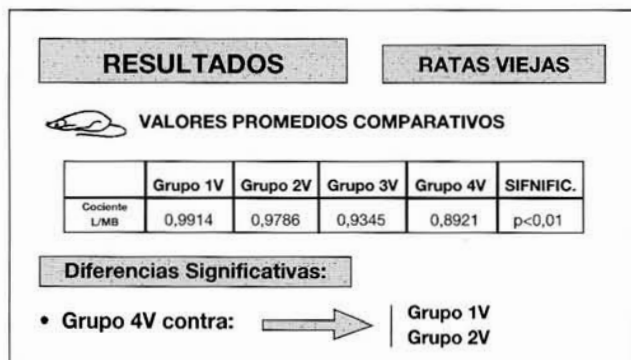


Tabla IV

Si realizamos la comparación por edad de los valores promedios entre los grupos equivalentes en tiempo, es decir, analizando las diferencias que se establecen entre las ratas jóvenes y viejas (6 veces de mayor edad) pertenecientes a grupos equivalentes, esto es, que tengan el mismo tiempo tras la lesión en la Aorta abdominal (Tabla V), encontramos diferencias significativas entre los grupos ( $F_{exp} = 154,16$ ;  $(1,24)$  g.l.;  $p < 0,0001$ ), diferencias que se concretaron en que, en todos los grupos, el cociente ALV/AMB fue mucho menor en las jóvenes que en las viejas, es decir, la hiperplasia encontrada en las jóvenes fue mucho mayor que en las viejas (Fig. 5). Además, observamos cómo la hiperplasia de las ratas viejas, prácticamente despreciable a las 2 semanas, no llega a un máximo en estos 3 grupos, continuando su crecimiento a las 4 semanas. Esto nos llevó, como indicamos en su momento, a realizar el grupo de ratas viejas a las 5 semanas del daño arterial.

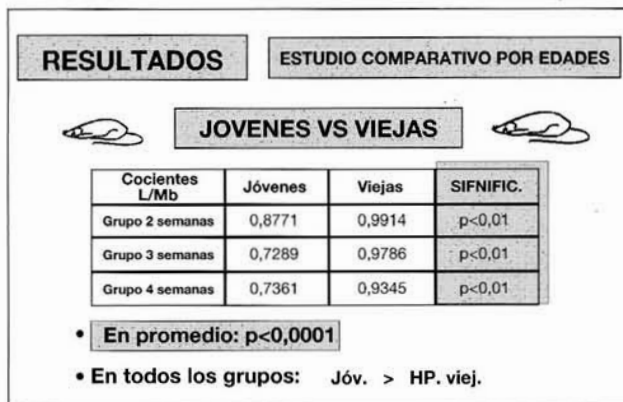


Tabla V

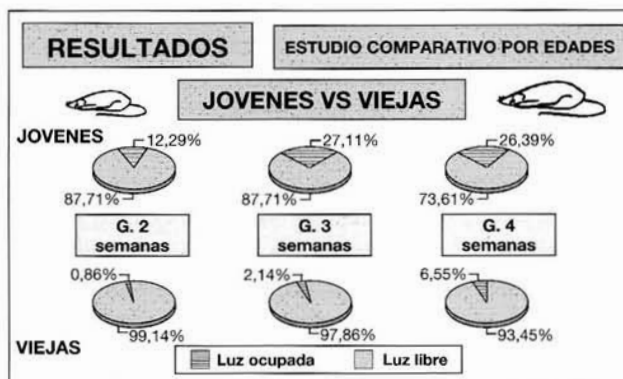


Fig. 5

## Discusión y comentarios

Desde que se iniciaron las primeras técnicas quirúrgicas de reparación y/o reconstrucción vascular, se empezaron a observar lesiones en los sitios sometidos a intervención que, aunque se consideraban normales en la cicatrización, se sospechaba que podían ser la causa del fracaso de esas técnicas. Así, dentro de la literatura, hemos encontrado casos de Hiperplasia Intimal en zonas de endarterectomías e injertos venosos y protésicos de la circulación periférica, en estenosis recurrentes de las arterias carótidas y en by-pass aortocoronarios.

A la vista de los estudios clínicos, se entiende el interés mostrado por el estudio exhaustivo de este proceso a nivel experimental, desarrollándose múltiples modelos animales.

Entre ellos, hemos de reseñar los desarrollados por Alexander W. Clowes y cols. (2-4, 6-8, 14-26), en los cuales se analizan en sucesivas publicaciones los aspectos más



relevantes sobre la hiperplasia intimal, desde la cinética de proliferación de las células endoteliales y CML de la pared arterial, tanto en basal como tras el daño causado por el arrastre de un catéter-balón, examinando el ritmo de crecimiento de la íntima a lo largo de los días tras la lesión, hasta los recientes estudios sobre el control farmacológico de dicha respuesta de cicatrización.

Otros muchos modelos experimentales se describen en la literatura, dedicados en especial, sobre todo en los últimos años, a la búsqueda de métodos de control de la respuesta proliferativa de las células de la pared arterial y de los posibles mediadores genéticos de la misma (27-29, 9, 30-42, 11, 13).

En el amplio análisis sobre la hiperplasia intimal que se realiza en los trabajos mencionados, destaca la ausencia total de datos en cuanto a posibles influencias de la edad en la producción de dicha respuesta arterial, de tal forma que en la mayoría de los trabajos experimentales sólo se menciona la edad de los animales escogidos como dato obligado conjuntamente con el peso, sin aludir al mismo como posible factor influyente en la producción de dicha lesión.

Con respecto a este factor, analizaremos a continuación nuestros resultados según lo observado en los distintos grupos del estudio.

En las ratas jóvenes, a las 2 semanas de producida la lesión de la Aorta abdominal, se aprecia un engrosamiento de la pared arterial a expensas de la capa íntima. La medición del cociente ALV/AMB ofrece unos resultados significativos en cuanto a crecimiento de la pared o, lo que es lo mismo, reducción de la luz del vaso. Por otra parte, a las 3 semanas de la lesión arterial es cuando hemos obtenido el mayor crecimiento de la íntima del vaso en estos animales jóvenes, de forma que el ritmo de crecimiento entre las 2 y 3 semanas tras la intervención ha continuado de forma significativa. Asimismo, a las 4 semanas de la lesión observamos unos valores muy similares a los obtenidos a las 3 semanas, por lo que podemos decir que el ritmo de crecimiento de la pared se ha frenado.

Por otra parte, en las ratas envejecidas, únicamente en 1 rata del grupo de 2 semanas se apreció crecimiento de la íntima arterial, a diferencia de los resultados en ratas jóvenes en donde, como se recordará todas las ratas presentaban dicha hiperplasia; pero además el crecimiento fue menor. La menor celularidad de la pared arterial en estas ratas envejecidas nos lleva a pensar que precisamente ese dato histológico puede ser la causa de la menor respuesta a la lesión arterial,

traducida en una menor hiperplasia intimal. A las 3 y 4 semanas del daño arterial en ratas viejas, sí apreciamos ya una hiperplasia intimal en todos los animales del grupo. El ritmo de crecimiento en este caso no se había detenido, por lo que, una vez analizados estos resultados, nos planteamos el realizar otro grupo de ratas viejas a las 5 semanas del daño arterial, de forma que nos permitiera averiguar si el ritmo de crecimiento de la pared arterial continuaba.

Los resultados comparativos obtenidos nos confirman que el crecimiento arterial en respuesta al daño de la pared en las ratas viejas se retrasa en su momento de aparición con respecto al de las jóvenes, siendo además mucho menor incluso con más tiempo desde la lesión arterial. En las ratas jóvenes obteníamos una hiperplasia intimal significativa a las 2 semanas de producido el daño en la pared arterial, con un cociente ALV/AMB promedio de 0,8771; mientras que para obtener un crecimiento significativo en las ratas viejas tenemos que esperar a las 3 semanas del daño, siendo además claramente inferior, cociente ALV/AMB promedio de 0,9786. Por otra parte, el máximo crecimiento de la pared en las ratas jóvenes lo tenemos a las 3 semanas (cociente promedio de 0,7289), deteniéndose ese ritmo de crecimiento, ya que la medición es muy similar en el grupo 4 (cociente promedio de 0,7361); en las ratas envejecidas el ritmo de crecimiento continua al menos hasta las 5 semanas, momento en que se obtiene un mayor crecimiento promedio de la pared (coeficiente de 0,8921), también claramente inferior al de las jóvenes (Fig. 6).

## Conclusiones

Consideramos que en ratas machos Wistar Albina la denudación endotelial y el estímulo de las células musculares lisas de la capa media arterial, producida por el arrastre de un catéter-balón en la Aorta abdominal, induce una hiperplasia intimal evidente y medible tanto en ratas jóvenes como en envejecidas (6 veces mayores). Sin embargo, este engrosamiento intimal se produce y se estabiliza antes en ratas jóvenes que en viejas y, además, la respuesta de las arterias de ratas ancianas es más tardía y mucho menor que en las de ratas jóvenes. Por otro lado, se evidencia una menor celularidad en estas ratas viejas, tanto en la pared arterial normal como, sobre todo, en las zonas con hiperplasia intimal. Creemos que esto es lo que hace a estas

zonas más frágiles a las manipulaciones, de tal forma que se desprenden fácilmente al interior de la luz del vaso.

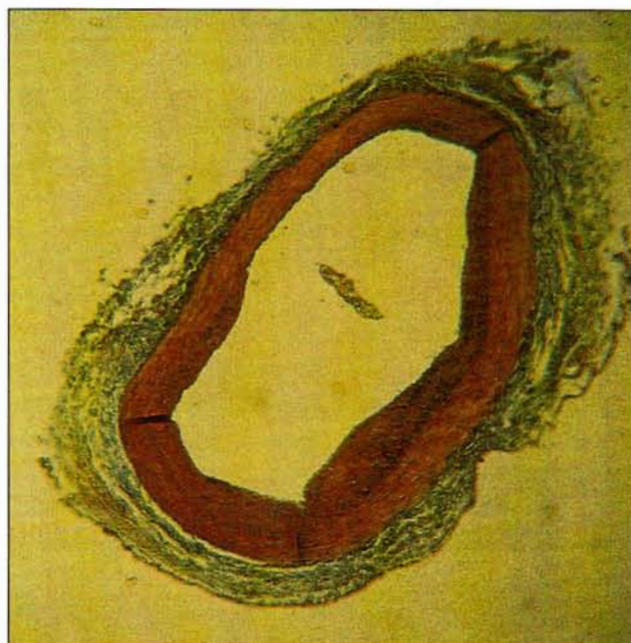


Fig. 6. Ver texto

Podemos concluir que, en definitiva, la edad influye de forma significativa en la producción de hiperplasia intimal en el presente modelo experimental en ratas, por lo cual se

trata de un factor que se debe tener presente a la hora de su utilización en posteriores experiencias.

## BIBLIOGRAFIA

1. CHERVU, A.; MOORE, W.S.: An overview of intimal hyperplasia. *Surg. Gyn. Obst.*, 1990; 171:433-7.
2. CLOWES, A. W.; REIDY, M. A.: Prevention of stenosis after vascular reconstruction. Pharmacologic control of intimal hyperplasia. A review. *J. Vasc. Surg.*, 1991; 13:885-91.
3. CLOWES, A. W.: Pathologic intimal hyperplasia as a response to vascular injury and reconstruction. En: Rutherford, R. B., ed. *Vascular Surgery*. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1989; 266-75.
4. CLOWES, A. W.: Pathologic intimal hyperplasia as a response to vascular injury and reconstruction. En: Rutherford, R. B., ed. *Vascular Surgery*. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1995; 285-95.
5. RODRÍGUEZ, M.; LINARES, J. P.; G.<sup>a</sup> ROSPIDÉ, V.; SALMERÓN, L. M.; MORENO, J.; URBANO, G., et al.: Nuevo modelo experimental de Hiperplasia Intimal en la rata. *Angiología*, 1996; 1:7-16.
6. CLOWES, A. W.; CLOWES, M. M.: Regulation of smooth muscle proliferation by heparin in vitro and in vivo: *Inter. Angiol.*, 1987; 6:45-51.
7. CLOWES, A. W.; REIDY, M. A.; CLOWES, M. M.: Mechanisms of stenosis after arterial injury. *Lab. Invest.*, 1983; 49:208-15.
8. CLOWES, A. W.; SCHWARTZ, S. M.: Significance of quiescent smooth muscle migration in the injured rat carotid artery. *Circ. Res.*, 1985; 56:139-45.
9. CRECEK, B.; FISHBEIN, M.; FORRESTER, J. et al.: Induction of insulin-like growth factor I messenger RNA in rat aorta after balloon denudation. *Cir. Res.*, 1990; 66:1753-60.
10. FISHMAN, J. A.; RYAN, G. B.; KARNOVSKY, M. J.: Endothelial regeneration in the rat carotid artery and designificance of endothelial denudation in the pathogenesis of myointimal thickening. *Lab. Invest.*, 1975; 32; 339-51.
11. ORTU, P.; LAMURAGLIA, G.; ROBERTS, G., et al.: Photodynamic therapy of arteries (A novel approach for treatment of experimental intimal hyperplasia). *Circulation*, 1992; 85:1189-96.



12. REIDY, M. A.: A reassessment of endothelial injury and arterial lesion formation. *Lab. Invest.*, 1985; 53: 513-20.
13. QUIÑONES-BALDRICH, W.; ZIOIMED, S.; HERDENSON, T., et al.: Permeabilidad e hiperplasia de la íntima: efectos de la aspirina en las anastomosis de arterias pequeñas. *Anales de Cirugía Vascular*, 1988; 1:50-56.
14. CLOWES, A. W.: The Role of aspirin in enhancing arterial graft patency. *J. Vasc. Surg.*, 1986; 3:381-5.
15. CLOWES, A. W.; CLOWES, M. M.: Heparin inhibits injury induced arterial smooth muscle migration and proliferation. *Fed. Proc.*, 1984; 43:1022-5.
16. CLOWES, A. W.; CLOWES, M. M.: Kinetics of celular proliferation after arterial injury. IV. Heparin inhibits rat smooth muscle mitogenesis and migration. *Cir. Res.*, 1986; 58:839-45.
17. CLOWES, A. W.; CLOWES, M. M.: Kinetics of celular proliferation after arterial injury. II. Inhibition of smooth muscle growth by heparin. *Lab. Invest.*, 1985; 52:611-6.
18. CLOWES, A. W.; CLOWES, M. M.; FINGERLE, J.; REIDY, M. A.: Regulation of smooth muscle cell growth in injured artery. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 1989; 14 (Suppl 6):812-5.
19. CLOWES, A. W.; CLOWES, M. M.; REIDY, M. A.: Kinetics of celular proliferation after arterial injury. III. Endothelial and smooth muscle growth in chronically denuded vessels. *Lab. Invest.*, 1986; 54:295-303.
20. CLOWES, A. W.; GOWN, A. M.; HANSON, S. R.: Mechanism of arterial graft failure. *Am. J. Pathol.*, 1985; 119:43-54.
21. CLOWES, A. W.; KARNOVSKY, M. J.: Failure of certain antiplatelet drugs to affect myointimal thickening following arterial injury. *Lab. Invest.*, 1977; 36:452-64.
22. CLOWES, A. W.; KARNOVSKY, M. J.: Supression by heparin of smooth muscle cells proliferation in injured arteries. *Natural (Lond)*, 1977; 265:625-6.
23. CLOWES, A. W.; KIRKMAN, T. R.; CLOWES, M. M.: Mechanisms of arterial graft failure. II. Chronic endothelial and smooth muscle cell proliferation in healing PTFE prostheses. *J. Vasc. Surg.*, 1986; 3: 877-84.
24. CLOWES, A. W.; KIRKMAN, T. R.; REIDY, M. A.: Mechanisms of arterial graft healing. Rapid transmural capillary ingrowth provides a source of intimal endothelium and smooth muscle in porous PTFE prostheses. *Am. J. Pathol.*, 1986; 123:220-30.
25. CLOWES, A. W.; KOHLER, T.: Graft endothelialization: The role of angiogenic mechanisms. *J. Vasc. Surg.*, 1991; 13:734-8.
26. CLOWES, A. W.; REIDY, M. A.; CLOWES, M. M.: Kinetics of celular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium. *Lab. Invest.*, 1983; 49:327-33.
27. BAUTERS, C.; VAN BELLE, E.; WERNER, N.; DELCAYRE, C.; THOMAS, F., et al.: Angiopeptin inhibits oncogene induction in rabbit aorta after balloon denudation. *Circulation*, 1984; 89(5):2327-31.
28. CALCAGNO, D.; CONTE, J.; HOWELL, M., et al.: Peptide inhibition of neointimal hyperplasia in vein grafts. *J. Vasc. Surg.*, 1991; 13:475-9.
29. COLBURN, M.; MOORE, W.; GELABERT, H., et al.: Dose responsive suppression of myointimal hyperplasia by dexamethasone. *J. Vasc. Surg.*, 1992; 15:510-8.
30. DOBRIN, P.: On the roles of deformation, tension, and wall stress as critical stimuli eliciting myointimal/medial Hyperplasia. *J. Vasc. Surg.*, 1991; 14:581-2.
31. GÖKÇE, Ö.; GÖKÇE, Ç.; GÜNEL, S., et al.: Preventive effect of nicardipine on hyperplastic changes in venous bypass grafts. *World J. Surg.*, 1993; 17:94-100.
32. HADEISHI, H.; MAYBERG, M.; SETO, M.: Local application of calcium antagonists inhibits intimal hyperplasia after arterial injury. *Neurosurgery*, 1994; 34(1): 114-21.
33. KOUCHI, Y.; ESATO, K.; O-HARA, M., et al.: Effect of prostaglandin I<sub>2</sub> analogue TRK-100 on the suppression of intimal fibrous proliferation. *J. Vasc. Surg.*, 1992; 16:232-8.
34. LAW, M.; COLBURN, M.; HAJJAR, G.; GELABERT, H.; QUIÑONES-BALDRICH, W.; MOORE, W.: Supression of intimal hyperplasia in a rabbit of arterial balloon injury by enalaprilat but not dimethyl sulfoxide. *Ann. Vasc. Surg.*, 1994; 8(2):158-65.
35. O'DONOHUE, M.; DAVIES, M.; RADIC, Z.; MIKAT, E.; HAGEN, P.: Increased concentrations of angiotensin-converting enzyme in the intimal hyperplasia of experimental vein grafts. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 1994; 23(4):594-601.
36. O-HARA, M.; ESATO, K.; HARADA, M., et al.: Eicosapentanoic acid suppresses intimal hyperplasia after expanded polytetrafluoroethylene grafting in rabbits fed a high cholesterol. *J. Vasc. Surg.*, 1991; 13:480-6.
37. RAKUGI, H.; WANG, D. S.; DZAU, V. J.; PRATT, R. E.: Potential importance of tissue angiotensin-converting enzyme inhibition in preventing neointima formation. *Circulation*, 1994; 90(1):449-55.

38. REMES, V.; VON SMITTEN, K.; WARIS, T.; RAEKALLIO, J.: Assessment of microvascular clamping injury of rat aorta by histochemical examination of oxidoreductases. *Microsurgery*, 1990; 11(2):95-101.
39. SCHWARTZ, L.; O'DONOHUE, M.; PURUT, C., et al.: Myointimal thickening in experimental vein grafts is dependent on wall tension. *J. Vasc. Surg.*, 1992; 15: 176-86.
40. WALKER, L. N.; BOWEN-POPE, D. F.; ROSS, R.: Production of platelet-derived growth factor-like molecules by cultured arterial smooth muscle cells accompanies proliferation after arterial injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986; 83:7311-5.
41. WILSON, N.; SALISBURY, J. R.; KAKKAR, W.: Efecto de la heparina de bajo peso molecular en la hiperplasia de la íntima. *Br. J. Surg.*, 1991; 78:1381-3.
42. ZEMPO, N.; KENAGY, R.; TINA AU, Y.; BENDECK, M.; CLOWES, M. M.; REIDY, M. A.; CLOWES, A. W.: Matrix metalloproteinases of vascular wall cells are increased in balloon-injured rat carotid artery. *J. Vasc. Surg.*, 1994; 20(2):209-17.