

José Knopholz

**EFEITO DA L-ARGININA NA NEOPROLIFERAÇÃO INTIMAL E NO
REMODELAMENTO ARTERIAL APÓS LESÃO POR BALÃO EM
ILÍACAS DE COELHOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS**

Mestrado em Ciências da Saúde
PUC-PR

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, sob orientação do Prof. Dr. Paulo R. S. Brofman e co-orientação do Prof. Dr. Dalton B. Précoma

Curitiba
2005

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos Drs. Dalton B. Précoma, Paulo Roberto Slud Brofman, João Carlos Repka, Gabriela Elisete Bier, Lúcia de Noronha e Márcia Olandoski pela atenção e pelo necessário auxílio, sem os quais este trabalho não teria sido possível. Ressalto, também, a gratidão ao Hospital Angelina Caron, ao Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR, à Equipe do Biotério da PUCPR, ao Dr. José Rocha Faria Neto e aos acadêmicos Ruy Fernando Kuenzer C. da Silva, Anna Paula Kuchnir Silva, Ana Carolina Lemos, Priscila de Oliveira Silva e Jacqueline Domsin de Moraes pela fundamental contribuição.

Knopfholz, José

Efeito da L-arginina na Neoproliferação intimal e no remodelamento arterial após lesão por balão em ilíacas de coelhos hipercolesterolêmicos

José Knopfholz – Curitiba, 2005

xi,73f.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Programa de Pós Graduação em Ciências de Saúde

1. Reestenose. 2. Neoproliferação intimal 3. Remodelamento 4. Óxido nítrico

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| LISTA DE FIGURAS..... | vii |
| LISTA DE TABELAS..... | viii |
| LISTA DE GRÁFICOS..... | ix |
| RESUMO..... | x |
| ABSTRACT..... | xi |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA..... | 4 |
| 2.1 Efeitos fisiopatogênicos da lesão da parede arterial..... | 4 |
| 2.1.1 Neoproliferação intimal (NPI) | 4 |
| 2.1.2 Remodelamento..... | 7 |
| 2.2 Óxido Nítrico e L-arginina..... | 10 |

| | |
|--|----|
| 3 OBJETIVOS..... | 15 |
| 4 MÉTODOS..... | 16 |
| 4.1 Preparo e administração da ração..... | 19 |
| 4.2 Anestesia e indução da lesão vascular..... | 19 |
| 4.3 Administração da L-arginina e retirada das artérias..... | 21 |
| 4.4 Confeção e leitura das lâminas..... | 23 |
| 4.5 Remodelamento vascular..... | 27 |
| 4.6 Análise estatística..... | 28 |
| 5 RESULTADOS..... | 29 |
| 5.1 Peso dos animais..... | 29 |
| 5.2 Níveis de colesterol..... | 30 |
| 5.3 Neoproliferação intimal..... | 30 |
| 5.4 Área de vaso e remodelamento..... | 31 |
| 5.5 Luz..... | 32 |

| | | |
|-----|---|----|
| 5.6 | Coeficientes de correlação..... | 33 |
| 5.7 | Tipos de remodelamento..... | 36 |
| 6 | DISCUSSÃO..... | 37 |
| 6.1 | Modelo experimental..... | 37 |
| 6.2 | Neoproliferação intimal..... | 38 |
| 6.3 | Remodelamento..... | 42 |
| 6.4 | Reestenose..... | 45 |
| 7 | CONCLUSÃO..... | 49 |
| 8 | REFERÊNCIAS..... | 50 |
| | ANEXOS..... | 65 |
| | Anexo I (Relatório do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais)..... | 66 |
| | Anexo II (Avaliação Morfométrica)..... | 71 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Fluxograma de execução do trabalho..... | 18 |
| Figura 2: Aspecto demonstrativo da incisão para acesso a artéria ilíaca de coelhos..... | 20 |
| Figura 3: Caixa utilizada para anestesia e administração da L-arginina..... | 22 |
| Figura 4: Espécime retirado e fixado com formaldeído 10%..... | 23 |
| Figura 5: Cortes transversais na lâmina e identificação..... | 25 |
| Figura 6: Secção transversal com as medidas morfométricas, delineando o lúmen, a neo-íntima e a camada média | 26 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Peso dos animais em g..... | 29 |
| Tabela 2: Índice de colesterol dos animais no momento da lesão..... | 30 |
| Tabela 3: Neoproliferação intimal comparativa dos grupos controle e arginina..... | 31 |
| Tabela 4: Áreas dos vasos e média do remodelamento comparativa entre os grupos controle e arginina..... | 32 |
| Tabela 5: Áreas da luz arterial (Luz) e relação da área luminal pela área do vaso (Luz/AV) comparativa nos grupos controle e arginina..... | 33 |
| Tabela 6: Tipos de remodelamento nos grupos controle e arginina..... | 36 |

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Coeficiente de correlação da área luminal com a relação NI/M nas artérias estudadas do grupo arginina..... 34

Gráfico 2: Coeficiente de correlação da área luminal com a relação NI/M nas artérias estudadas do grupo controle..... 34

Gráfico 3: Coeficiente de correlação da razão área luminal/área do vaso com a relação NI/M nas artérias estudadas do grupo arginina 35

Gráfico 4: Coeficiente de correlação da razão área luminal/área do vaso com a relação NI/M nas artérias estudadas do grupo controle 35

RESUMO

Objetivo: A neoproliferação intimal e o remodelamento têm sido implicados como os maiores fatores causadores da reestenose. O objetivo deste trabalho é estudar a ação da L-arginina por via oral nestes dois fatores após lesão por balão em artérias ilíacas de coelhos hipercolesterolêmicos. **Métodos:** Foram utilizados 19 coelhos, que foram divididos em dois grupos, controle (GC) e arginina (GA), respectivamente com 19 e 17 artérias estudadas. Os animais foram submetidos a lesão por balão de angioplastia em suas artérias ilíacas 15 dias após início de dieta hipercolesterolêmica a 2%. A seguir, os animais do GA passaram a receber uma solução de L-arginina por via oral na dose de 1 g/kg/dia. Após o sacrifício, no 15º dia após a lesão por balão, procedeu-se a cortes histológicos das artérias, as quais foram coradas e fixadas. Utilizou-se como representativo do desenvolvimento da lesão, a razão das áreas da neo-íntima (em mm²) pela camada média (em mm²). De outro lado, a razão da área total do vaso em sua porção medial (de maior contato com o balão) pela área total do vaso no segmento referencial (de menor contato com o balão) foi a definidora do remodelamento. **Resultados:** A média da neoproliferação intimal (NI/M) foi de $0,8151 \pm 0,2201$ no GC e de $0,3296 \pm 0,1133$ no GA. Não houve diferença entre os tipos de remodelamento entre os dois grupos estudados. **Conclusão:** No modelo experimental utilizado, a L-arginina foi capaz de reduzir a neoproliferação intimal em coelhos hipercolesterolêmicos e não teve ação sobre o remodelamento arterial.

Palavras-chave: reestenose; neoproliferação intimal; remodelamento; óxido nítrico

ABSTRACT

Purpose: Neointimal proliferation and arterial remodeling are two of the most important factors responsible for restenosis. The purpose of this paper is to evaluate the influence of oral given L-arginine in neointimal proliferation and arterial remodeling after balloon injury in iliac arteries of hypercholesterolemic rabbits. **Methods:** 19 rabbits were divided in two groups: control group (GC) and arginine group (GA). In the first one, 19 arteries were studied and in the second 17 arteries were analyzed. Rabbit iliac arteries were submitted to a balloon angioplasty 15 days after the beginning of a 2% hypercholesterolemic feeding. Then, GA animals started to receive L-arginine orally in a 1 g/kg/day dose. Rabbits were sacrificed 15 days after the balloon lesion and their arteries were prepared for being microscopically analysed. To define the degree of neointimal proliferation we utilized the relation between the neointimal layer and the media layer of the artery. By other side, remodeling was defined as the relation between the medial portion of the artery (which had a greater degree of balloon lesion) and the lateral portions (which had a lower degree of balloon lesion). **Results:** Neointimal proliferation were $0,8151 \pm 0,2201$ in the CG and $0,3296 \pm 0,1133$ in AG. There were no statistic differences between arterial remodeling in both studied groups. **Conclusion:** In this experimental model, L-arginine reduced neointimal proliferation and did not change arterial remodeling in hypercholesterolemic rabbits.

Keywords: restenosis; neointimal proliferation; remodeling; nitric oxid

1 INTRODUÇÃO

A angioplastia transluminal coronariana (ATC) é uma modalidade terapêutica amplamente aceita para o tratamento de pacientes com doença arterial coronariana obstrutiva¹. Segundo o registro CENIC, da Sociedade Brasileira de Hemodinâmica e Cardiologia Invasiva, realizaram-se, em 2003, 25.609 destes procedimentos no Brasil². Destes casos, 23.422 pacientes foram submetidos a implante de próteses endovasculares (PEV), denominados *stents*.

O custo da utilização da ATC para tratamento da doença aterosclerótica coronariana, mesmo com *stents*, foi descrito como semelhante ao da revascularização cirúrgica, pela necessidade de grande número de procedimentos adicionais no grupo submetido a terapêutica percutânea³. Apesar de bastante funcional e relativamente pouco invasiva, quando comparada a cirurgia, a ATC com balão apresenta significativa incidência de reestenose, a qual pode ser definida angiograficamente como sendo o retorno da estenose, no local previamente dilatado, a um grau relativo igual ou superior a 50% da luz do vaso⁴.

Sem a utilização de PEV, a incidência de reestenose pode atingir 50% dos pacientes tratados, em seis meses^{1,5}. A ampla utilização da ATC, como ocorre nos dias de hoje, tornou-se possível pelo advento do *stent*. Acredita-se que a principal

ação desta tecnologia ocorra sobre o remodelamento arterial e recolhimento elástico⁶. Entretanto, a incidência de retorno da estenose a um grau igual ou superior a 50% no local dilatado ainda persiste entre 20 e 30%, em alguns casos^{6,8}.

Evidências experimentais e clínicas sugerem que a reestenose deve-se primariamente aos seguintes elementos^{5,7,8}: proliferação das células musculares lisas (neoproliferação intimal) provenientes da camada média, em resposta ao estiramento mecânico; remodelamento negativo (diminuindo a luz do vaso) e retração elástica aguda. Estes elementos são desencadeados por uma variedade de fatores de crescimento e vasoconstritores⁹, parecendo ser o primeiro o de maior importância dentre os três⁴. Este fenômeno ocorre, principalmente, às custas de ativação, proliferação e migração das células musculares lisas e pela produção de matriz extracelular após o dano ocasionado pelo balão¹⁰.

Na tentativa de solucionar o problema da reestenose, vários métodos mecânicos e químicos foram desenvolvidos, sem, no entanto, afastar em definitivo a questão. Como já citado, o uso de PEV destacou-se por reduzir significativamente a reestenose⁷ e o uso de antioxidantes^{11,12}, notadamente o probucol, apresentou alguns resultados favoráveis, tanto em animais de experimentação como em trabalhos clínicos¹³. Paralelamente, a utilização de irradiação intracoronária após a angioplastia, com o objetivo de reduzir a neoproliferação intimal, tem alcançado parcial sucesso em experimentos e em séries clínicas^{14,15}. Os imunossupressores¹⁶, como a rapamicina são definitivamente um marco modificador da história da

cardiologia intervencionista. Todos estes métodos, porém, têm o inconveniente do custo e da não resolução completa do problema, até o momento. O uso de *stent* revestido ainda é bastante restrito no Brasil devido ao seu alto custo.

Considerando a fisiopatologia da reestenose, alguns trabalhos têm investigado a ação de vasodilatadores e precursores do óxido nítrico na resolução da questão⁹. São alguns os estudos com a L-arginina, precursora do óxido nítrico, que, além de um custo acessível, é bem tolerada e disponível comercialmente. Existe, entretanto, alguma divergência nos estudos publicados, havendo benefício bem estabelecido quando se utiliza a droga com forma de aplicação local (intravascular)^{17,18}. É válido ressaltar que trabalhos experimentais concluíram haver maior expressão vascular no óxido nítrico com alguns tipos de exercícios físicos, ocorrendo, inclusive, benefício na hiperplasia neointimal e na adesão plaquetária em angioplastia com *stent* em ratos¹⁹.

Existem, portanto, múltiplos questionamentos pendentes quanto à aplicação da L-arginina e um grande espaço para sua utilização no cotidiano, tendo em vista o fato de que, apesar de disponível comercialmente, esta droga não vem sendo aplicada. Cite-se ainda que, uma vez estabelecido o real benefício deste precursor, abre-se espaço para a obtenção de drogas semelhantes mais potentes ou para a busca de meios de formação de óxido nítrico no endotélio vascular.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Efeitos fisiopatogênicos da lesão da parede arterial

2.1.1 Neoproliferação intimal (NPI)

A resposta vascular ao dano arterial é encontrada em humanos e animais após a angioplastia por balão. Quase todos os pacientes submetidos à angioplastia possuem algum grau de hiperplasia neointimal. Já se sabe de longa data que, histologicamente, este fenômeno difere da placa aterosclerótica, pois a neo-íntima é formada fundamentalmente por células musculares lisas (CML) e matriz extracelular²⁰. O papel fundamental das CML na reestenose fez com que elas fossem bastante estudadas, após o que se verificou que, no fenômeno da reestenose, as mesmas sofrem modificações importantes de fenótipo: passam de contráteis e quiescentes para um estado ativado e proliferativo sintético²¹. A primeira forma é o modo no qual as CML se encontram na camada média arterial e se caracteriza pela presença de filamentos contráteis bem desenvolvidos, grande capacidade de contração e baixa capacidade proliferativa. Em obstruções reestenóticas, as células apresentam aspecto poliédrico, com grandes núcleos e capacidade migratória e proliferativa, porém baixa contratilidade.

Segundo revisão de literatura²², pelo menos cinco mecanismos são responsáveis por esta modificação citopatológica e ativação das CML: 1) a perda da camada endotelial; 2) o estiramento mecânico; 3) agregação plaquetária à superfície lesada, associada à liberação de grande quantidade de fatores de crescimento; 4) formação de trombo local e atividade mitogênica da trombina; e 5) reação inflamatória local.

As várias etapas fisiopatogênicas do fenômeno de reestenose foram descritas por Schwartz et al.¹⁰ (1995) e serão especificadas neste parágrafo. Segundo os mesmos, a primeira etapa ou "primeira onda" consiste na proliferação das células musculares lisas (CML) na camada média, as quais se replicam desde 24 horas até duas semanas após a lesão. A participação do fator do crescimento derivado das plaquetas (PDGF) parece exercer ação mitôgenica, acompanhado de antagonistas adrenérgicos e angiotensina II. A inibição destes estímulos iniciais parece exercer resultado tardio favorável na neoproliferação intimal. A "segunda onda" é caracterizada pela migração das células musculares lisas através da lâmina elástica interna. Estas já podem ser visibilizadas em contato com o lúmen arterial no quarto dia após a lesão. Nesta fase, é decisiva a participação do PDGF, já que o mesmo age mais em migração do que em proliferação celular. A angiotensina II, o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e o fator básico do crescimento do fibroblasto (bFGF) podem participar desta etapa. A replicação das células, agora localizadas próximas a luz do vaso, constitui a "terceira onda", a qual pode durar de

semanas a meses. Novamente, há provável participação marcante de moléculas estimuladoras, como o PDGF, porém mesmo com a administração de anticorpos contra este fator não houve inibição da reprodução celular. A "quarta onda" é marcada por uma exacerbação da resposta aos mitógenos, que têm papel fundamental na continuidade da replicação e migração das células musculares lisas. Este processo tem duração de meses e pode corresponder à incidência clínica da reestenose. Além das já citadas angiotensina II, TGF- β e bFGF, o fator de crescimento similar à insulina-1 (IGF-1) parece ter papel nesta fase.

A ativação plaquetária ocasionada pela lesão endotelial, causa trombose mural e persiste por um período de três semanas²³. O óxido nítrico (NO) mantém a integridade celular, pois possui propriedades antitrombóticas e antiplaquetárias. Quando ocorre uma lesão vascular, a produção de NO é interrompida e a sua ausência contribui na formação de trombo e desencadeamento do processo inicial da estenose pós-lesão. Perde-se, também uma conhecida interação sinérgica²⁴ com a prostaciclina, ocorrendo grande dano à superfície antitrombótica endotelial pela mudança dos fatores de equilíbrio trombogênicos e anticoagulantes. Além disto, a ausência de NO é um dos fatores causadores da aderência monocitária²⁵ e da agregação plaquetária²⁶, fatos também demonstrados em modelo experimental²⁷, no qual a inibição desta substância causou aumento na extensão da lesão. Ainda levando em conta a seqüência fisiopatológica da reestenose, o óxido nítrico também

exerce ação anti-proliferativa nas células musculares lisas²⁸, podendo, portanto, ter efeito nas fases mais tardias deste processo.

2.1.2 Remodelamento

O remodelamento geométrico pode ser conceitualmente definido como a resposta da parede arterial à agressão, que modifica a luz arterial através do aumento ou da diminuição da circunferência total do vaso²⁹. Na aterosclerose, o remodelamento vascular é fato bem estabelecido, ficando claro que a perda luminal ocasionada pelo processo obstrutivo tende a ser compensada pela dilatação do segmento afetado²⁹. Aparentemente, existe um limite após o qual se perde esta capacidade adaptativa e se inicia uma estenose coronariana estabelecida³⁰.

A artéria após a lesão pelo balão pode estreitar-se ou alargar-se em resposta à NPI, resultando em algumas anormalidades específicas³¹: o remodelamento perfeito, o positivo, o negativo e o indiferente (ausência do remodelamento). No remodelamento perfeito, a artéria, diante da neoproliferação intimal, se expande adequadamente para acomodar a neo-íntima e diminui significativamente o grau de oclusão luminal. No positivo ou favorável, a artéria se expande parcialmente, de modo a reduzir a estenose, porém a mesma ocorre de maneira moderada. No negativo ou desfavorável, a artéria se contrai, não acomoda a neo-íntima e a mesma

se projeta para o lúmen, o que leva a piora da estenose . O remodelamento indiferente é aquele que não possui papel no diâmetro luminal final, que acontece somente às custas da neo-íntima.

Na reestenose, a perda do remodelamento favorável pode levar à redução do lúmen arterial e à conseqüente constrição coronariana. Este fenômeno foi chamado de remodelamento geométrico negativo³² e foi descrito há cerca de dez anos.

O remodelamento proporciona uma mudança persistente no tamanho e na composição do vaso, permitindo, assim, a adaptação e a reparação diante de agressões. Sugere-se que os fatores responsáveis pelo fenômeno são estresse hemodinâmico e oxidativo, inflamação e expressão das metaloproteinases³³.

Embora questionado por alguns³⁴, o remodelamento como mecanismo de reestenose tem se estabelecido de tal forma que para outros autores é considerado mais importante do que a própria neoproliferação intima³⁵. O uso do ultra-som intracoronário tem consagrado mais ainda o remodelamento como fator de reestenose, evidenciando a correlação do grau de estreitamento luminal com a redução no diâmetro da lâmina elástica externa (LEE) e não com o tamanho da massa intimal. Opondo-se a estes resultados, um estudo experimental em coelhos³⁶ demonstrou que a reestenose era devida, principalmente, à hiperplasia da íntima. O remodelamento negativo foi demonstrado em 10 a 16% dos vasos com retorno angiográfico da estenose.

O mecanismo do remodelamento é explicado por algumas maneiras. O dano provocado pelo balão ocasiona um estiramento da parede arterial, podendo levar à compressão da camada média, dissecação dentro da íntima e camada média, hemorragia intramural, além de afetar segmentos normais do vaso. Na tentativa de reparar esses danos, nessas dissecações ocorrem reações trombogênicas e inflamatórias³⁷. As modificações da parede vascular no processo de cicatrização da lesão são, portanto, responsáveis pelo remodelamento. Além disto, o chamado *shear stress* ou força de cisalhamento regula o fluxo sanguíneo vascular. Este pode ser definido como o aumento da força que o sangue exerce sobre a parede vascular em situações de aumento da pressão de perfusão. Em situações fisiológicas, o fluxo é laminar e, portanto, o *shear stress* é diretamente proporcional à velocidade do fluxo e à velocidade sanguínea e inversamente proporcional ao cubo do raio do vaso. No remodelamento, a alteração do raio pode aumentar a força de cisalhamento, o que estimula a liberação de óxido nítrico e prostaciclina³⁸. Este fato pode reforçar a hipótese de que o suprimento adequado de NO para vaso lesado pode minimizar os efeitos negativos do ajuste geométrico do vaso.

Foram, também, utilizados agentes antioxidantes com o objetivo de modular o remodelamento geométrico vascular. Em coronárias de suínos, as vitaminas C e E reduziram o remodelamento negativo após a angioplastia por balão. Neste trabalho, entretanto, a área neointimal foi maior no grupo tratado do que no grupo controle³⁹.

Poucos trabalhos correlacionaram a administração de L-arginina e o remodelamento vascular. Le Tourneau et al.⁴⁰ (1999) estudaram remodelamento vascular e neoproliferação intimal em estudo experimental com coelhos submetidos à ingesta de L-arginina. Apesar da inibição na neoproliferação intimal, não houve redução luminal graças à ausência de remodelamento favorável no grupo tratado com L-arginina.

2.2 Óxido Nítrico e L-arginina

Já se sabe há alguns anos que endotélio é órgão secretor e pode ser considerado liberador de várias substâncias, pró e antiagregantes plaquetárias, estimulantes e inibidoras de crescimento do músculo liso vascular, pró e antifibrinolíticas. A homeostase da parede vascular resulta do equilíbrio destas atividades⁴¹.

Dentre as substâncias derivadas do endotélio caracterizou-se recentemente o fator relaxante derivado do endotélio, cujas evidências vêm evidenciando similitude com o NO, fazendo com que muitos estudos o identificassem como o mesmo⁴². Muitos tecidos são capazes de formar o NO a partir da L-arginina, porém o endotélio é, sem dúvida, o sítio no qual sua ação se reveste de maior importância⁴³.

A L-arginina (ácido 2-amino-5-guanidinovalérico) é o precursor bioquímico do óxido nítrico, o qual é o mensageiro endógeno mais atuante conhecido no endotélio⁴³.

A via L-arginina-óxido nítrico foi descrita há cerca de quinze anos⁴³ e será discutida neste capítulo. A conversão bioquímica de L-arginina a óxido nítrico depende substancialmente de enzima NO sintase endotelial (NOSe), a qual é estimulada por vários agentes, entre eles a força de cisalhamento do fluxo sanguíneo, as plaquetas agregadas, a acetilcolina, a bradicinina, a trombina e a endotelina. Explica-se, a partir daí, a liberação de NO sintase (NOs) decorrente da lesão endotelial por balão. Existem também descrições de NO sintase de células do sistema nervoso (NOSn) e uma outra, chamada de induzível (NOSi) que, quando exposta a citocinas ou toxinas bacterianas, causa grande liberação de NO.

O NO tem sido descrito como um potente vasodilatador, atuando através da ativação da guanilato ciclase do músculo liso vascular, fato que aumenta os níveis de 3,5 monofosfato de guanosina (GMPC), o que causa relaxamento das células musculares lisas⁴⁴. Muitas outras ações têm sido atribuídas ao óxido nítrico, como antiagregação plaquetária, efeito antioxidante, inibição do efeito quimiotático leucocitário, inibição da proliferação de células musculares lisas, inibição de proliferação intimal, inibição de proliferação de moléculas de adesão e efeito negativo sobre a diferenciação de macrófagos⁴⁴.

Um dos possíveis efeitos mais importantes do NO sobre a reestenose, a inibição da proliferação das células musculares lisas, foi descrito inicialmente em modelos experimentais. Em porcos ateroscleróticos, a administração de dinitrato de isossorbida restabeleceu a liberação normal de NO e inibiu a proliferação de células musculares lisas⁴⁵. Um novo doador de NO, o FK 409, teve um efeito significativo, mesmo quando administrado a partir do dia da indução da lesão, provavelmente devido à inibição da proliferação de células musculares lisas⁴⁶. De outro lado, a administração crônica de inibidores de NOs em coelhos hipercolesterolêmicos resultou em aumento de neoproliferação intimal, inferindo ser este capaz de inibir a mitogênese, a proliferação celular e, provavelmente, a síntese de colágeno pelas células musculares lisas⁴⁷.

Outra ação fundamental capaz de explicar parcialmente a possível ação do NO na lesão endotelial é a inibição da agregação plaquetária. O efeito antiagregante plaquetário do NO está relacionado à ativação da guanilato ciclase intraplaquetária, o que leva a um incremento de GMPc intraplaquetário, o que, por sua vez, causa a redução do cálcio intracelular e, subseqüentemente menor ligação de fibrinogênio ao receptor formado pelo complexo glicoproteína IIb/IIIa. Azuma, Ishikawa e Sekizaki⁴⁸ (1986) foram os primeiros a demonstrar esta ação. Estudo em seres humanos demonstrou que a L-arginina em altas doses foi capaz de inibir a agregação plaquetária induzida por ADP⁴⁹. A administração desta mesma substância em cães retardou a formação de trombo⁵⁰.

É também conhecida a inibição ocasionada por vários doadores de NO sobre as funções das células polimorfonucleares. Uma destas ações reside na capacidade do NO de inativar o ânion superóxido, o que minimiza a adesão leucocitária⁵¹. Em estudo com coelhos hipercolesterolêmicos, a suplementação com L-arginina atenuou a adesão monocitária, fato que é revertido com a administração de inibidores de NOs²⁷. Tem sido cada vez mais valorizada a ação da L-arginina em pacientes ateroscleróticos com disfunção endotelial que possuem elevados níveis de dimetil-arginina assimétrica, um inibidor endógeno de NOSe⁵². Além disto, o NO modula também a expressão gênica do fator quimiotático para monócitos (MCP-1)⁵³. Quando se reduz a produção de NO, verifica-se aumento da expressão do RNA mensageiro (RNAm) deste fator, enquanto a adição de NO exógeno a diminui. Muitos doadores de NO foram capazes de reduzir a expressão do fator M-CSF (fator estimulador de colônias de macrófagos), envolvido na proliferação de células espumosas⁵⁴.

Na lesão vascular existe uma redução aguda e possivelmente crônica na expressão da NOSe vascular. Em trabalho clássico⁵⁵, verificou-se ação do NOs tipo III a partir do sexto dia após desendotelização, com ação máxima no 14º dia após a agressão. Além disso, com a lesão do vaso, ocorre possível aumento da formação de NO por fonte não endotelial (aumento da expressão de NOSi), como por células do músculo liso vascular. McNamara et al.⁵⁶ (1993) afirmam que o NO sintetizado pela formação de NOSi poderia controlar a progressão da lesão após dano vascular,

pois a administração de L-arginina por dez semanas em animais alimentados com dieta rica em colesterol foi capaz de causar regressão da lesão aterosclerótica. Além disto, o trabalho de Preik-Steinhoff et al.⁵⁷ (1994) demonstrou que as células endoteliais recuperam com grande rapidez o seu estoque de arginina, o que sugere que a administração da mesma pode ser feita por tempo limitado.

Outra ação estudada do NO na lesão vascular se dá por sua possível capacidade de modulação das células endoteliais na parede vascular lesada. Verificou-se que o nitroprussiato de sódio e a nitroglicerina induziram a síntese de DNA em culturas de células endoteliais isoladas, com efeito sobre a angiogênese e crescimento endotelial⁵⁸.

Pelas razões acima expostas, torna-se possível a hipótese de que a administração de L-arginina nos primeiros dias após a lesão por balão pode promover redução na proliferação intimal e aumentar a proliferação de células endoteliais, levando a melhor adaptação do vaso à lesão.

3 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são:

- 1) analisar a ação da L-arginina por via oral na neoproliferação intimal após lesão por balão em artérias ilíacas de coelhos hipercolesterolêmicos;
- 2) analisar a ação da L-arginina por via oral no remodelamento arterial após lesão por balão em artérias ilíacas de coelhos hipercolesterolêmicos.

4 MÉTODOS

Antes da realização do experimento, o mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais, conforme o Anexo I.

Este trabalho foi escrito conforme normas da ABNT, segundo orientação do Mestrado em Ciências da Saúde – PUC-PR.

Foram utilizados 19 coelhos machos albinos (*Oryctolagus cunicullus*) da linhagem New Zealand, provenientes do biotério da PUCPR, com a média de seis meses de idade, os quais foram divididos em dois grupos: grupo controle (GC) (n = 10) e grupo L-arginina (GA) (n = 9). Todos os animais foram submetidos a lesão por balão de angioplastia em suas artérias ilíacas, no 15.º dia após o início de uma dieta hipercolesterolêmica. Vinte e quatro horas depois da indução do dano arterial, o GC passou a receber solução de água destilada na dose de 1 g/kg/dia e o GA iniciou a ingestão de L-arginina na dose de 1 g/kg/dia por 14 dias.

De cada coelho, foram consideradas duas artérias que, para efeito das variáveis deste estudo, foram consideradas como observações independentes. Desta forma, esta análise foi feita com base nos resultados obtidos em 19 artérias do grupo controle (uma artéria foi perdida por problemas técnicos) e 17 artérias do grupo arginina (uma artéria foi perdida por problemas técnicos). O fluxograma de

execução do trabalho está sendo demonstrado na Figura 1 e será descrito na continuidade deste capítulo.

Os procedimentos deste estudo foram realizados no Laboratório de Técnica Operatória da PUCPR e no Laboratório Experimental do Centro de Estudos do Hospital Angelina Caron. Os animais foram mantidos em gaiolas de metal, as quais comportavam dois animais, que eram devidamente identificados com numeração em orelha direita. O microambiente era higienizado diariamente e recebia água e ração específica para coelhos (Nuvital®) de forma *ad libitum*. Durante todo o período, foram respeitados os ciclos de iluminação de 12/12 horas, as trocas de ar foram realizadas e a temperatura foi controlada entre 19 e 23°C.

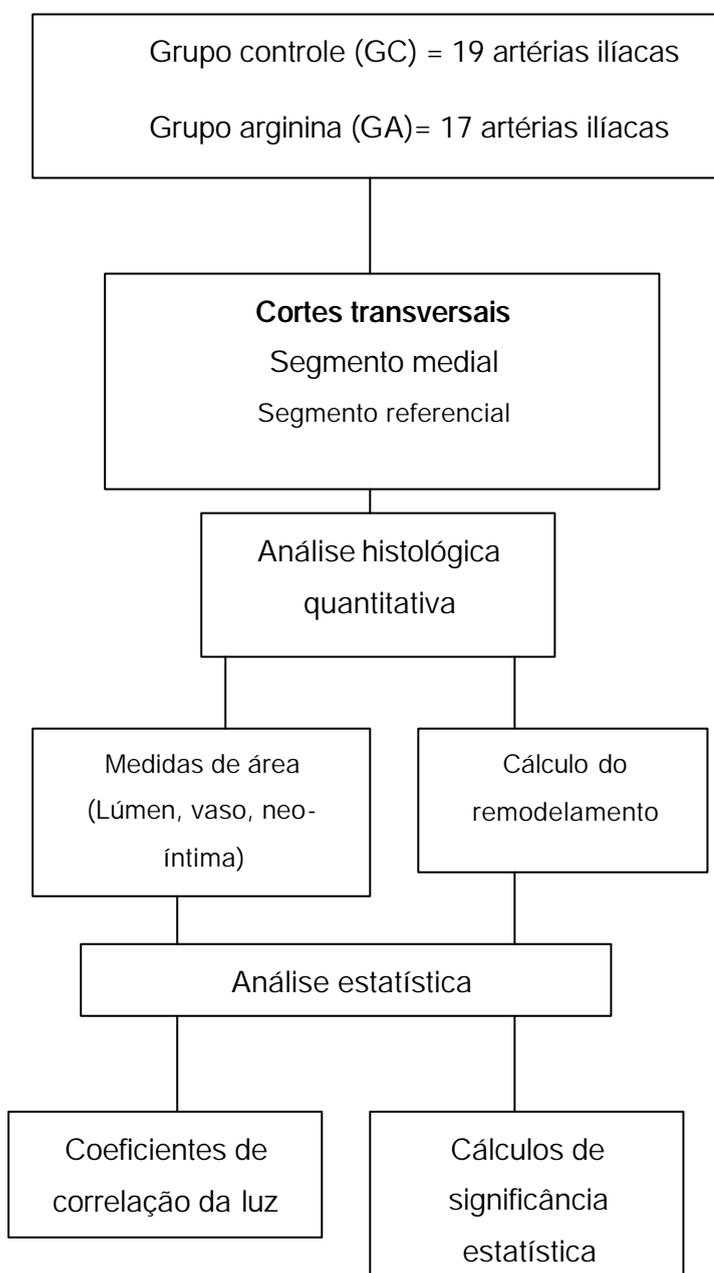


Figura 1: Fluxograma de execução do trabalho

4.1 Preparo e administração da ração

Para a alimentação dos coelhos, foi preparada uma dieta hipercolesterolêmica. Para tal, foram utilizados 200g de colesterol (Sigma-Aldrich®), dissolvidos em 800 mililitros (ml) de clorofórmio (Biotec®), distribuídos em 10 quilogramas (kg) de ração Nuvital®. O colesterol dissolvido foi distribuído com auxílio de pulverizador sobre a ração, a qual era colocada num recipiente plano e raso. Após 24 horas, para adequada evaporação do clorofórmio, a ração foi distribuída para os animais. A lesão arterial foi induzida no 15º dia após o início da dieta hipercolesterolêmica e a manutenção desta dieta ocorreu até o sacrifício dos animais.

4.2 Anestesia e indução da lesão vascular

Os coelhos foram anestesiados com Xilazina (Coopazine®-Coopers) na dose de 5 mg/kg e Ketamina (Vetanarcol® König) na dose de 3,5 mg/kg, por via intramuscular na coxa. Era, então, colhida amostra de sangue para dosagem de colesterol total.

Após indução anestésica, foram realizadas tricotomia nas regiões inferior do abdome e inguinal através de lâminas apropriadas, seguida de limpeza adequada da topografia cirúrgica e alocação adequada na canaleta. Realizou-se anti-sepsia com PVPI e utilização de campos estéreis. Procedeu-se, então, a incisão na pele de 2 a 3 cm de extensão (Figura 2) no sentido longitudinal na prega inguinal, para exposição das artérias femoral direita e esquerda, as quais foram reparadas com fio de algodão 3-0. Em seguida, realizou-se pequena incisão na parede arterial (arteriotomia transversal), através da qual foi introduzida uma guia metálica número 0,014. Esta, por sua vez, permitia a inserção de cateter-balão de 3,0 mm de diâmetro por 20 mm de comprimento (raio balão/artéria de 2,5:1), o qual adentrava no lúmen das artéria ilíaca direitas e esquerdas.



Figura 2: Aspecto demonstrativo da incisão para acesso a artéria ilíaca de coelhos

Em cada artéria, o cateter-balão foi insuflado pelo tempo de cinco minutos, na pressão de 5 atm, levando a distensão da parede arterial. Após desinsuflação do balão, procedia-se ligadura das artérias para contenção do fluxo, em ponto proximal ao orifício de entrada do sistema cateter-balão, com fio de algodão 3-0. Por fim, era revisada a hemostasia e a pele suturada com fio de Vicryl® 3-0.

Para efeito de analgesia, administrou-se o medicamento Flunixin® (Banamine-Schering-Plough) 25 mg por três dias. Foram utilizados, também, 100 mg/dia do antibiótico Oxitetraciclina Tormicina (Toruga®), o qual foi mantido por quatro dias após a operação.

4.3 Administração da L-arginina e retirada das artérias

Vinte e quatro horas após a realização da lesão arterial, iniciou-se a administração de L-arginina para o grupo arginina na dose de 1 g/kg/dia. Esta substância foi administrada na forma de solução, previamente homogeneizada, preparada na concentração de 3 g /10 mL de solução. A mesma era retirada através de seringa graduada, a qual foi inserida na cavidade oral do animal e tinha o êmbolo pressionado lentamente para não haver perda da solução. Enquanto este procedimento era realizado, o coelho se encontrava em uma caixa com orifício para

sua cabeça que limitava seus movimentos e facilitava a aceitação da droga (Figura 3).



Figura 3: Caixa utilizada para anestesia e administração da L-arginina

No 15º dia após a lesão arterial, cada animal foi novamente pesado e anestesiado e, após procedimentos de anti-sepsia e colocação de campos estéreis era realizada uma incisão longitudinal, que se estendia desde a transição tóraco-abdominal até a região pélvica, a partir de onde era prolongada até as regiões inguinais direita e esquerda. Eram visualizadas e reparadas as artérias femorais, ilíacas e aorta. Após sacrifício com dose letal de barbitúrico, as artérias foram lavadas e fixadas com formaldeído a 10% tamponado com fosfato (pH=7,6), pelo período de 10 minutos. Realizou-se, a seguir, a remoção do bloco envolvendo

parte da aorta e ilíacas. Para identificação, a artéria ilíaca direita foi armazenada com um ponto na porção distal (Figura 4).



Figura 4: Espécime retirado e fixado com formaldeído 10%

4.4 Confeção e leitura das lâminas

Para análise histológica e morfométrica, os espécimes arteriais constituídos pelo segmento distal da aorta até as artérias ilíacas foram fixados em formalina por 24 horas e processados para a confecção dos cortes histológicos.

As artérias foram submetidas a cortes transversais, com 2 a 3 mm de espessura cada. As amostras foram colocadas em cápsulas histológicas identificadas, separando o segmento medial, de maior contato com o balão, do referencial (distal e

proximal). As amostras foram identificadas com anotação do número do coelho, do lado da artéria ilíaca, seguida pelo registro do local dos cortes.

As amostras previamente identificadas foram colocadas no autotécnico (Leica® modelo RM2145), para processamento durante uma noite, sendo então desidratadas em concentrações diferentes e crescentes de álcool etílico a 70%, 80% e 90%. A seguir, as mesmas foram diafanizadas em xilol, contendo misturas seqüencialmente concentradas de parafina durante o período de 12 horas.

A seguir, a amostra sofria inclusão em parafina quente (Leica® modelo EG1160), sendo obtidos os blocos, os quais eram cortados em micrótomo (Leica® modelo RM 2145), em cortes de 5 μ m (micrômetros) cada um. Duas formas de coloração foram utilizadas para confecção das lâminas: hematoxilina-eosina e elástica. As mesmas foram identificadas com o número do animal e o lado (direito ou esquerdo) da artéria utilizada (Figura 5). Dos seis cortes contidos na lâmina, os dois centrais correspondiam a região medial (considerada de maior contato com o balão) e os quatro periféricos eram os correspondentes aos segmentos referenciais.

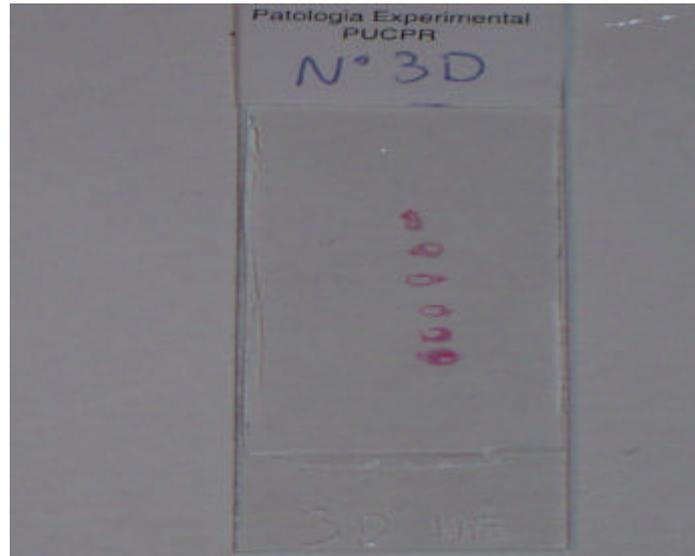


Figura 5: Cortes transversais na lâmina e identificação

A leitura das lâminas foi realizada através do programa Pro Image-plus® v.4,5 para Windows®, acoplados a microscópio Olympus® BX50 calibrado previamente com a objetiva de 4 vezes, utilizando-se o recurso de morfometria de "área". As medidas foram transferidas para o programa Excel for Windows®. Todas as secções transversais foram submetidas à análise, exceto aquelas cujos artefatos impediam as medidas.

Com o objetivo de se quantificar a área luminal (AL), a área neo-intimal (ANI), a área da camada média (ACM) e a área do vaso (AV), eram utilizados os seguintes critérios (Figura 6):

- a) AL: área compreendida pela região interna do vaso, contida em uma linha traçada junto ao perímetro da borda luminal;

b) ANI: área compreendida pela região do vaso, contida entre as linhas traçadas sobre a borda luminal e sobre a lâmina elástica interna (LEI), isto é, AL- LEI;

c) ACM: área compreendida pela região do vaso contida entre as linhas traçadas sobre a LEI e a LEE, isto é, LEE-LEI;

d) Área do vaso: área total do vaso.

Foi avaliada, também, a área luminal dos cortes histológicos e esta variável foi correlacionada com o grau de neoproliferação intimal.

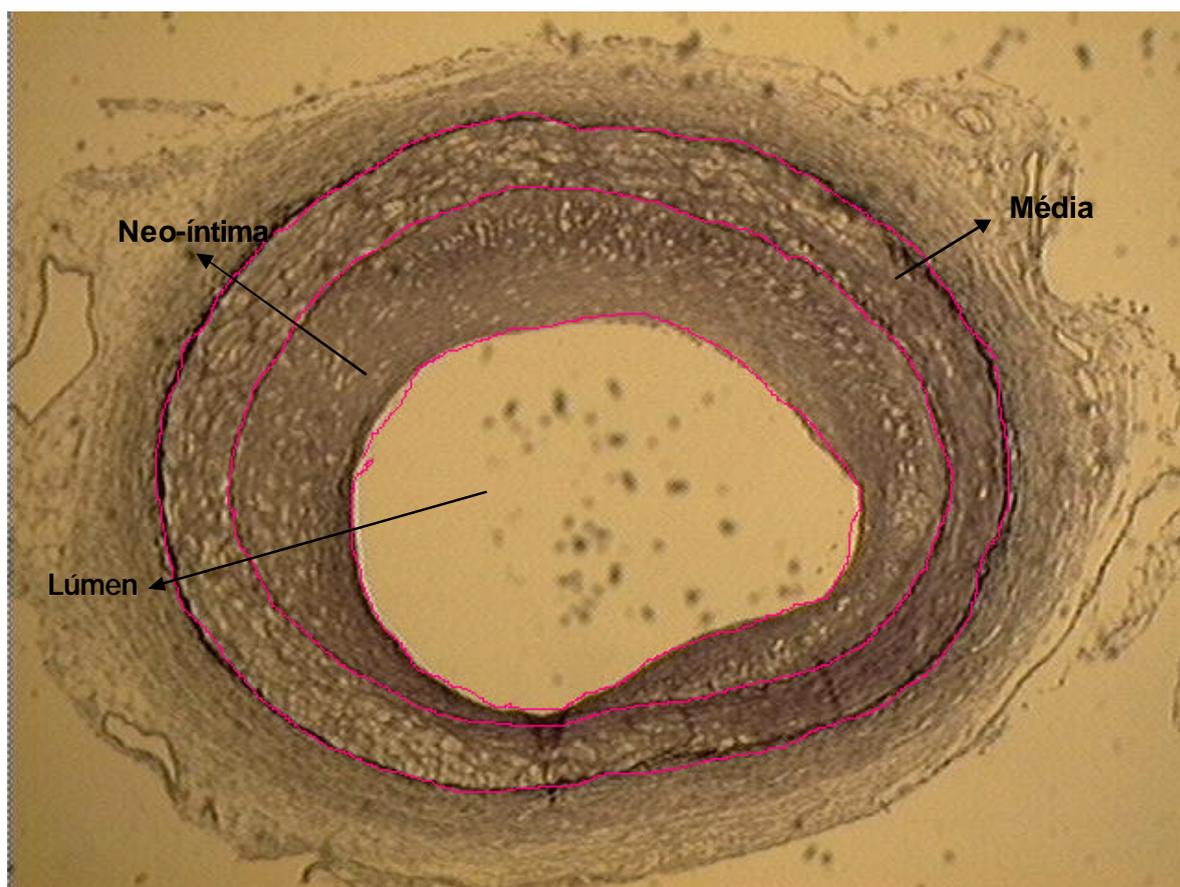


Figura 6: Secção transversal com as medidas morfométricas, delineando o lúmen, a neo-íntima e a camada média

A neoproliferação intimal foi avaliada através da relação da área da neo-íntima pela área da camada média para que fosse levada em conta o tamanho da artéria a ser analisada. Utilizou-se, portanto, como representativo do desenvolvimento da lesão, a área neo-intimal que foi relativizada de acordo com a dimensão de cada vaso, ou seja, mediu-se o valor percentual da neo-íntima em relação à área da camada média (NI/M).

4.5 Remodelamento vascular

A quantificação de remodelamento vascular foi baseada no trabalho de Bezerra et al.⁵⁹ (2001). Para tanto, calculou-se a média das áreas dos vasos nos cortes transversais dos segmentos mediais (de maior contato do balão) e referenciais (de menor contato com o balão).

A razão da área total do vaso em sua porção medial pela área total do vaso no segmento referencial, expressa em porcentagem, foi a definidora do remodelamento.

$$\text{Remodelamento} = \frac{\text{Área medial do vaso}}{\text{Área referencial do vaso}} \times 100\%$$

Este era considerado positivo (favorável) quando a área relativa do segmento medial (de interesse) fosse ao menos 10% maior do que a área referencial e era dito

negativo (desfavorável), quando a área do segmento medial fosse pelo menos 10% menor do que a área referencial. Caso o cálculo exposto resultasse em valor menor que 10%, o remodelamento era dito indiferente.

4.6 Análise estatística

Os resultados das variáveis NI/M, área do vaso e remodelamento foram expressas por médias e desvios padrões, enquanto que os resultados da variável tipo de remodelamento foi expressa por freqüências e percentuais. Para comparar os grupos controle e arginina em relação às médias das variáveis NI/M, área do vaso e remodelamento, foi usado o teste t de Student para amostras independentes, levando-se em consideração a homogeneidade das variâncias. Para a comparação dos locais medial e referencial, dentro de cada grupo, foi usado o teste t de Student para amostras pareadas. A condição de normalidade foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilks. Nos casos de não normalidade, foi aplicada uma transformação logarítmica aos dados. A associação entre variáveis foi estimada através do coeficiente de correlação de Pearson. Para a comparação dos grupos em relação à distribuição do tipo de remodelamento, foi usado o teste de Qui-quadrado. Em todos os testes, valores de $p=0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5 RESULTADOS

5.1 Peso dos animais

O peso dos animais aferido no início do fornecimento da dieta e no dia do sacrifício está demonstrado na Tabela 1. Não houve diferença estatística entre os grupos controle e arginina, demonstrando pesos semelhantes entre os grupos comparados.

Tabela 1: Peso dos animais em g

| Variável | Grupo Controle (n = 10) | Grupo Arginina (n = 9) | Valor de p |
|----------|-------------------------|------------------------|------------|
| | Média ± dp | Média ± dp | |
| PESO 1 | 2480,00 ± 477,96 | 2466,67 ± 526,78 | 0,9545 |
| PESO 2 | 2750,00 ± 344,00 | 2644,44 ± 415,67 | 0,5528 |

PESO 1 = Peso dos animais no início do fornecimento da dieta

PESO 2 = Peso dos animais no dia do sacrifício

5.2 Níveis de colesterol

A dosagem de colesterol colhido no momento da lesão por balão evidenciou ambos os grupos (controle e arginina) com dosagens bastante elevadas e sem diferença estatística entre eles (Tabela 2). A dosagem normal de colesterol nestes animais é de cerca de 70 mg/dl⁶⁰.

Tabela 2: Índice de colesterol dos animais no momento da lesão

| Variável | Grupo Controle (n = 10) | Grupo Arginina (n = 9) | Valor de p |
|-----------------------|----------------------------|---------------------------|---------------|
| COLESTEROL (mg/dL) | 1255,50 ± 207,59 | 1242,89 ± 234,58 | 0,9025 |

5.3 Neoproliferação intimal

A comparação do grau de espessamento intimal comparando-se os grupos controle e arginina estão representados na Tabela 3. Houve diferença significativa entre o grupo tratado e o grupo não tratado com a droga do estudo, evidenciada por $p=0,0000$. A significância estatística se repetiu quando comparados os dois grupos nos segmentos arteriais mediais e referenciais.

Tabela 3: Neoproliferação intimal comparativa dos grupos controle e arginina

| Variável | Artérias controle (n = 19) | Artérias arginina (n = 17) | Valor de p |
|------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------|
| | Média ± dp | Média ± dp | |
| NI/M | 0,8151 ± 0,2201 | 0,3296 ± 0,1133 | 0,0000 |
| NI/M medial | 0,6969 ± 0,4107 | 0,2764 ± 0,1392 | 0,0004 |
| NI/M referencial | 0,8655 ± 0,2189 | 0,3556 ± 0,1357 | 0,0000 |

NI/M medial = relação da area neointimal pela área da camada média no segmento medial da artéria

NI/M referencial = relação da área neointimal pela área da camada média no segmento referencial da artéria

5.4 Área do vaso e remodelamento

As áreas dos vasos estudados foram semelhantes nas artérias dos grupos estudados. Não se encontrou diferença estatística no grau de remodelamento (obtido através de cálculo já demonstrado) arterial após a lesão por balão. Os resultados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Áreas dos vasos (em μm) e média do remodelamento comparativa entre os grupos controle e arginina

| Variável | Artérias controle (n = 19) | Artérias arginina (n = 17) | Valor de p |
|-----------------------------|-------------------------------|--------------------------------|------------|
| | Média \pm dp | Média \pm dp | |
| Área do vaso | 3816949,44 \pm 799274,86 | 3697901,37 \pm 1203826,58 | 0,7262 |
| Área do vaso medial | 4105157,21 \pm 939075,71 | 3569864,55 \pm 1158414,10 | 0,1353 |
| Área do vaso referencial | 3711643,81 \pm 909300,83 | 3747981,51 \pm 1468871,72 | 0,8464 |
| Remodelamento | 1,1415 \pm 0,3025 | 0,9927 \pm 0,2781 | 0,1353 |

5.5 Luz

As áreas luminiais nos grupos controle e L-arginina foram estatisticamente diferentes, conforme demonstra a Tabela 5. A comparação das áreas luminiais relativizadas pela área do vaso (luz/AV) também demonstrou diferença após estudo analítico.

Tabela 5: Áreas da luz arterial em μm (Luz) e relação da área luminal pela área do vaso (Luz/AV) comparativa nos grupos controle e arginina

| Variável | Artérias controle (n = 19) | Artérias arginina (n = 17) | Valor de p |
|----------|-------------------------------|-------------------------------|---------------|
| | Média \pm dp | Média \pm dp | |
| Luz | 432757,53 \pm 108578,89 | 834759,88 \pm 332284,62 | <0,0001 |
| Luz/AV | 0,1190 \pm 0,0447 | 0,2346 \pm 0,0726 | <0,0001 |

5.6 Coeficientes de correlação

Os coeficientes de correlação entre a área luminal e o espessamento neo-intimal são expostos nos Gráficos 1 e 2, evidenciando extensa associação entre a luz e a relação NI/M. Nos Gráficos 3 e 4, demonstra-se extensa correlação entre a relação da área luminal pela área do vaso e o espessamento neo-intimal nas artérias dos grupos controle e arginina.

Gráfico 3: Coeficiente de correlação da razão área luminal/área do vaso com a relação NI/M nas artérias estudadas do grupo arginina

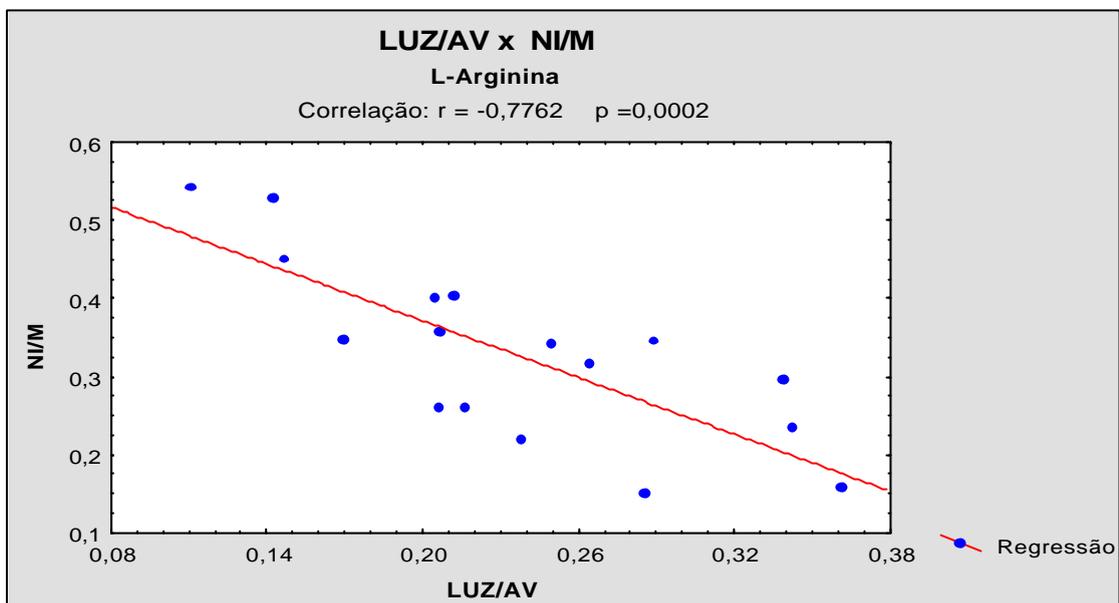
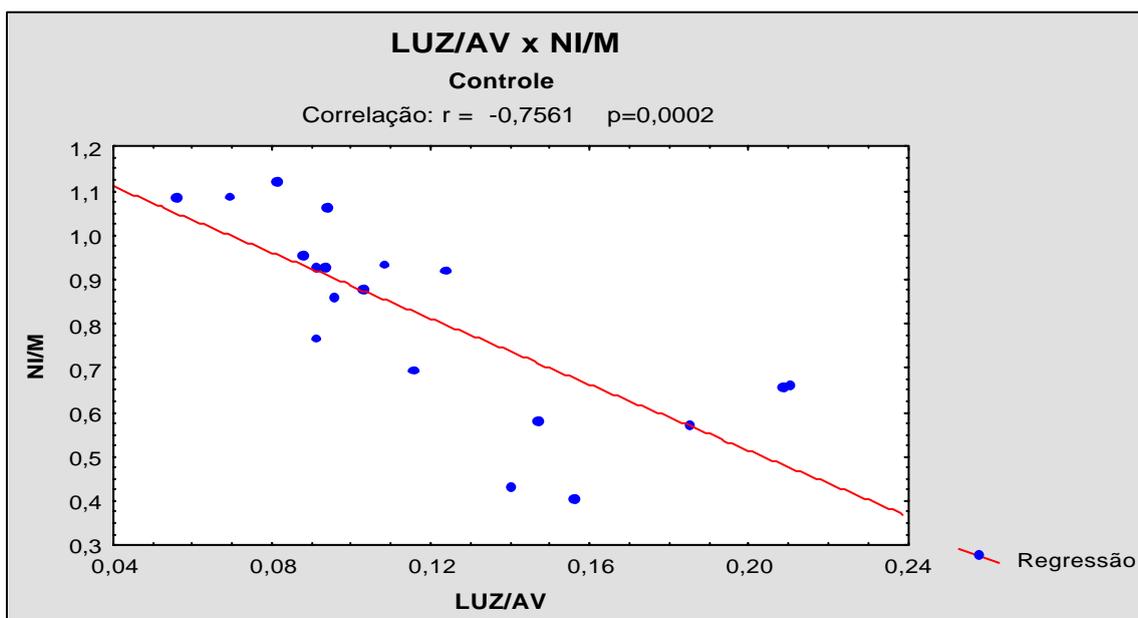


Gráfico 4: Coeficiente de correlação da razão área luminal/área do vaso com a relação NI/M nas artérias estudadas do grupo controle



5.7 Tipos de remodelamento

O cálculo individual do remodelamento em cada artéria estudada evidenciou os resultados apresentados na Tabela 6. Após tratamento estatístico, os tipos de remodelamento encontrados foram semelhantes nos grupos controle e arginina ($p=0,6118$).

Tabela 6: Tipos de remodelamento nos grupos controle e arginina

| Tipo de remodelamento | Artérias controle | Artérias arginina |
|------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Positivo | 9 (47,37%) | 6 (35,29%) |
| Indiferente | 6 (31,58%) | 5 (29,41%) |
| Negativo | 4 (21,05%) | 6 (35,29%) |
| Total | 19 | 17 |

No Anexo II, descrevem-se os graus de remodelamento encontrados em cada artéria, bem como os valores morfométricos encontrados nas mesmas.

6 DISCUSSÃO

6.1 Modelo experimental

Os aspectos fisiopatogênicos e a resposta terapêutica observada em um experimento animal podem não ser perfeitas na sua validade externa, pois as características genéticas e fenotípicas determinam respostas diferentes em humanos e animais. Os fenômenos trombogênicos, as atividades inflamatórias e proliferativas do vaso diferem em alguns pontos entre as espécies⁶¹. Os coelhos hipercolesterolêmicos desenvolvem lesões ateromatosas, predominantemente formadas por macrófagos ricos em lipídios e não apresentam o aspecto de lesão fibromuscular, o que usualmente é encontrado nas lesões ateroscleróticas de humanos. Além disto, as atividades inflamatória e proliferativa do vaso não ocorrem da mesma maneira. A aterosclerose em humanos progride de maneira lenta e gradual, o que faz com que a lesão aterosclerótica tenha características normalmente excêntricas e com calcificações⁶². No modelo deste trabalho, a lesão neointimal que se desenvolve a partir da insuflação do balão, ocorre de forma semelhante no diâmetro vascular, já que os fatores indutores tendem a ser os mesmos nas diferentes porções. Apesar disso, Post et al.³⁵ (1994) relataram a vantagem do uso do animal hipercolesterolêmico, levando em conta o custo-

benefício e a fácil disponibilidade. Em recente revisão, ressaltou-se a praticidade de manipulação dos modelos experimentais em coelhos⁶³. Além disso, a característica da hiperplasia neointimal e proliferativa foi vista como vantajosa para estudo, quando se comparam coelhos normais e hipercolesterolêmicos³⁵.

Como já foi estabelecido e previamente estudado em muitos artigos já citados, o modelo experimental utilizado neste trabalho pode ser considerado uma das maneiras fundamentadas para estudo de neoproliferação intimal após angioplastia.

6.2 Neoproliferação intimal

Quase trinta anos após a realização da primeira angioplastia coronariana (ATC), este procedimento se tornou uma intervenção rotineira. Segundo recente revisão, a ATC constitui o procedimento cardiológico invasivo mais comum realizado na sociedade ocidental⁶⁸. Tal fato tornou a reestenose uma verdadeira epidemia dentro da cardiologia mundial. Segundo estatísticas e projeções, o custo deste fenômeno nos EUA em 2001 esteve por volta de 900 milhões de dólares, contando com cerca de 45.000 casos⁶⁸.

Sem dúvida, o advento do *stent* modificou o foco de estudo da reestenose. Conforme já descrito, a reestenose é considerada multifatorial; porém, estudos com

ultra-som vêm demonstrando um papel significativo do remodelamento arterial nas ATCs feitas apenas com balão. Mintz et al.⁶⁹ (1996) analisaram resultados com este método em 212 pacientes e observaram que 73% da redução luminal foi devida ao fenômeno do remodelamento. Entretanto, a ocorrência de reestenose depois do implante de *stent* é quase exclusivamente explicada pela hiperplasia neo-intimal^{69,70}.

A diferença estatística significativa detectada neste estudo sugere ser a L-arginina capaz de inibir a neoproliferação intimal no modelo experimental em questão. Tais resultados foram semelhantes aos encontrados por Le Tourneau et al.⁴⁰ (1999) em experimento com coelhos hipercolesterolêmicos. No trabalho deles, entretanto, apesar de efetiva inibição no espessamento da neo-íntima não se identificou real benefício na dimensão luminal. No presente estudo, os coeficientes de correlação com a luz arterial demonstraram que a área neo-intimal foi o fator de maior importância na determinação da luz arterial. Além disso, houve comprovado aumento da área do orifício luminal no grupo tratado com a droga.

Heller et al.⁷¹ (1999) investigaram a ação do óxido nítrico, através de seus doadores, sobre a proliferação de células endoteliais humanas. Além de detectarem efetiva inibição da mesma, estes autores sugeriram que os efeitos inibidores do NO ocorrem quando há presença de NOs em grande quantidade associada a uma produção persistente e contínua de óxido nítrico. Essa manutenção de níveis altos do vasodilatador no endotélio pode explicar o benefício encontrado com o uso da L-arginina no presente trabalho.

Em modelo experimental com coelhos hipercolesterolêmicos, Greenlees et al.⁷² (1997) notaram benefício efetivo da L-arginina na neoproliferação intimal. Para tanto, o aminoácido foi administrado dois dias antes da lesão por balão e seu uso foi mantido por duas a quatro semanas após a mesma. Os autores ressaltam, entretanto, que, a droga reduziu a função endotelial, prejudicando a capacidade do mesmo de inibir agregação plaquetária. Este fator não foi estudado no presente trabalho, mas deve ser levado em conta em estudos futuros.

O significativo efeito encontrado no espessamento neo-intimal após administração de precursores de NO vem sendo estudado desde a década de 1990. McNamara et al.⁵⁶ (1993) iniciaram a administração de L-arginina (0,5 g/kg) para coelhos hipercolesterolêmicos dois dias antes da lesão por cateter e encontraram redução da hiperplasia intimal em 39%. Este efeito foi revertido por um inibidor da NOs, fato que sugere que a referida situação ocorra pelo suposto mecanismo de conversão para óxido nítrico. No presente trabalho, entretanto, utilizou-se dose maior de L-arginina e não se administrou a medicação previamente à indução da lesão, tendo sido o grau de inibição ainda maior do que o encontrado por estes autores.

Alguns estudos com L-arginina em seres humanos não demonstraram efeitos favoráveis na taxa de reestenose. Dudek et al.^{64,65} (2002, 2004) aplicaram a droga em humanos de maneira intravascular, seguida de administração oral de 6 g/dia por 14 dias após a angioplastia. Apesar de não ter havido diferença na taxa de reoclusão e na neoproliferação intimal, esta dose é bem mais baixa do que a

utilizada no presente trabalho. Entretanto, Suzuki et al.⁷³ (2002) aplicaram topicamente L-arginina através do cateter de angioplastia e encontraram resultados favoráveis após seis meses do procedimento. Estes autores utilizaram 600 mg da droga e obtiveram significativa redução da hiperplasia neo-intimal no grupo tratado, detectada por avaliação com ultra-som endovascular.

Apesar de estabelecida a ação, o mecanismo através do qual o óxido nítrico age na inibição da proliferação de células endoteliais e neo-intimais ainda persiste obscuro. Heller et al.⁷¹ (1999) descreveram, em estudo experimental, que a ação de doadores de óxido nítrico está ligada à formação do mesmo. Entretanto, segundo estes autores, inibidores do GMPc não alteraram a ação destas substâncias e é possível que a NOs induzida produzida pelo endotélio lesado seja responsável por este benefício.

A aplicabilidade da inibição do espessamento neo-intimal pelo óxido nítrico está longe de se limitar apenas à reestenose. Em enxertos venosos implantados na circulação arterial, a L-arginina reduziu o espessamento intimal em 36%, com a utilização de gel doador de óxido nítrico na superfície do vaso⁷⁴. Além disto, um polímero da L-arginina demonstrou benefício dose-dependente em reduzir a hiperplasia da íntima em modelo venoso⁷⁵. Em estudo recente, verificou-se, que a inibição da via natural do óxido piora a disfunção endotelial causada por rejeição após transplante cardíaco e acelera a vasculopatia relacionada ao coração

transplantado. Sugere-se que a preservação da integridade desta via deve ser usada para prevenir esta afecção clínica⁷⁶.

Há poucos estudos na literatura, entretanto, sobre o uso da L-arginina em via oral na espécie humana. Mediante o presente trabalho, acredita-se haver possibilidade de reconsiderar a questão.

6.3 Remodelamento

A relação do NO com o remodelamento tem seu substrato baseado na inibição da neoproliferação intimal, na produção de metaloproteinases e na apoptose das células musculares lisas. A ativação da matriz de metaloproteinases é necessária para que o remodelamento adaptativo arterial ocorra. O NO é capaz de regular a expressão das metaloproteinases, podendo também mediar seus fatores inibitórios. Em estudo experimental, sugeriu-se que as deficiências de NO alteram a homeostase entre os fatores formadores e inibidores, favorecendo a degradação da matriz extracelular⁶⁶.

Segundo Wilenski et al.³⁷ (1995), no período de 28 dias após a lesão arterial, ocorre a maior produção de matriz extracelular pelos miofibroblastos da adventícia e das CML da camada média, que influenciam no remodelamento. Outros autores, entretanto, sugerem que o aparecimento de remodelamento é mais tardio, ocorrendo

somente 6 a 12 semanas após a indução da lesão vascular, dependendo ainda dos níveis de colesterol e do grau de lesão do vaso⁶⁷. Portanto, o fato de não ter havido diferença entre os tipos de remodelamento em ambos os grupos (controle e arginina) pode não significar obrigatoriamente que a droga é inerte com relação a este fator, tendo em vista que o tempo de observação dos animais foi inferior ao descrito em alguns trabalhos.

De acordo com Azuma⁷⁷ (1999), as ações de vasodilatação, anti-agregação plaquetária e inibição das células musculares lisas são inibidas no vaso lesado por redução do NO vascular. Este fato ocasiona ação exacerbada da endotelina-1 (E-1), o que causa vasoconstrição e estímulo mitogênico, tendo possivelmente ação no remodelamento. A administração de inibidores exógenos de NO por duas semanas em coelhos resultou em aumento do estoque de E-1, o que aumentou a vasoconstrição e, possivelmente alterou remodelamento.

Em um dos poucos estudos sobre o tema, notou-se ausência de remodelamento favorável ou positivo (alargamento do vaso) no grupo de animais tratados com L-arginina, fato que não ocorreu nos outros grupos. Estes autores sugerem, portanto, que esta droga teria efeito inibitório no remodelamento favorável, o que compensaria negativamente seu benefício na neoproliferação⁴⁰. O sacrifício dos animais foi em 28 dias. Isto pode significar que a ação do NO no remodelamento ocorre entre duas e quatro semanas após a angioplastia. É importante ressaltar algumas diferenças, entretanto, entre o trabalho de Le Tourneau et al.⁴⁰ (1999) e o

presente estudo. Naquele, a L-arginina foi acrescentada à água dos animais, fato considerado pouco eficiente, pois não há controle sobre a adequada ingestão do aminoácido e a dose real do mesmo. Além disto, a lesão foi desenvolvida numa fase inicial, através de um cateter de Fogarty® e a angioplastia foi realizada seis semanas após este procedimento. Portanto, o modelo experimental foi diferente. Finalmente, no presente trabalho, foi considerada para análise histológica a média dos cortes arteriais que tiveram contato com o balão. No estudo de Le Tourneau et al.⁴⁰ (1999), considerou-se apenas o corte de menor diâmetro luminal, o que também pode ser considerado um fator de confusão, pois a amostra se concentra em uma leitura, aumentando a margem de erro.

Neste trabalho, demonstrou-se a presença de grande benefício luminal e ausência de remodelamento positivo no grupo tratado com L-arginina. O modelo experimental em questão tem sido amplamente utilizado para avaliação de neoproliferação intimal. Os coeficientes de correlação demonstram claramente que grande parte do resultado luminal final é ocasionado pelo espessamento da íntima. Portanto, o papel do remodelamento neste trabalho foi pequeno. A utilização de artérias sem fixação com pressão sistêmica tem sido apontado como um fator que superestima os valores reais do remodelamento⁷⁸. Além disto, a retração do tecido após o sacrifício pode levar a falhas no dimensionamento real deste fator. O uso do ultra-som intravascular tem sido citado como bastante adequado para esta avaliação⁷⁹.

6.4 Reestenose

Conforme já demonstrado, a ruptura da placa, associada ao dano mecânico do endotélio, parece ser capaz de desencadear uma reação inflamatória exagerada, incluindo infiltração linfo-monocitária, migração e proliferação de células musculares lisas, quimiotaxia e agregação plaquetária. A fisiopatologia desta reação exacerbada é imunomediada e dependente de TNF-alfa, interleucina-1 e 6, PGDF, fatores de crescimento derivados de insulina e muitos outros. Por isso, é possível que a solução para o problema venha com uma associação de drogas, orais e tópicas, capazes de levar a inibição proliferativa, sem causar danos ao organismo como um todo.

Houve entusiasmo inicial com o uso de inibidores de glicoproteínas IIB/IIIA na contenção da reestenose. O abciximab, além de fazer a ligação na própria proteína, liga-se também a receptores localizados nas células musculares lisas e tem afinidade por sítios em granulócitos e monócitos. De acordo com o grande estudo EPIC, houve redução de 24% de reestenose em seis meses com a utilização do abciximab⁸⁰. Entretanto, estudos posteriores não foram capazes de demonstrar este resultado⁸¹. Ainda na linha antiplaquetária, procurou-se evidenciar benefício do uso do cilostazol na neoproliferação intimal. Tsuchikane et al.⁸² (1982) demonstraram que esta substância atenuou a neoproliferação intimal após ATC com balão. Resultado semelhante não foi encontrado em estudo com número maior de

pacientes⁸³. Houve, entretanto, benefício especial para pacientes diabéticos. Uma das ações do óxido nítrico reside na sua capacidade anti-agregante, fazendo com que a L-arginina possa oferecer benefício neste mecanismo.

A utilização de inibidores de metaloproteinases (IM) se baseia no fato de que, para ocorrência de migração de células musculares lisas, não bastam habilidades migratórias. A célula deve, também, ter capacidade degradativa para o colágeno e matrizes protéicas. As metaloproteinases também têm sido associadas ao remodelamento arterial, já que o esqueleto extracelular do vaso sofre danos pelas mesmas, modificando a sua conformação geométrica. O batimastat, um IM não específico, não demonstrou efeito na neoproliferação arterial em ilíacas porcinas, tendo havido benefício no remodelamento⁸⁴. Existem, entretanto, poucos estudos na literatura em humanos com esta classe de drogas. Segundo recente publicação, a presença da força de cisalhamento inibe a migração de células musculares lisas por regulação negativa da atividade das metaloproteinases, a qual ocorre através de mecanismo mediado por NO⁸⁵. Este fato pode ser uma das explicações para a ação da L-arginina na neoproliferação intimal.

Antioxidantes têm sido empregados com relativo sucesso na tentativa de inibição neoproliferativa. As vitaminas C e E parecem não ter ação sobre a reestenose¹¹, entretanto o probucol pode reduzir a reestenose angiográfica em cerca de 50%^{11,86}. Porém, para tal benefício, possivelmente o mesmo deve ser

administrado cerca de um mês antes da angioplastia e ter seu uso mantido por cerca de 24 a 26 semanas após o procedimento¹¹.

Recentemente, a braquiterapia tem sido testada e, por vezes empregada na tentativa de resolução da redução luminal após angioplastia. Baseia-se no pressuposto de que a radiação ionizante provoca modificações celulares que impedem a replicação por alterações nucleares, minimizando desta maneira a neoproliferação intimal. Em modelo experimental semelhante ao utilizado neste trabalho,⁸⁷ demonstrou-se redução na neoproliferação intimal com a utilização de 15 Gy de samário-153 dentro do balão de angioplastia⁸⁷. Porém, tem sido crescente a percepção da radiolesão vascular, fato que limita esta modalidade para utilizar doses que possivelmente seriam mais efetivas⁸⁸.

Um dos maiores avanços na área da hemodinâmica reside, sem dúvida, no advento crescente dos *stents* revestidos com imunossupressores, notadamente a rapamicina e o paclitaxel. Houve grande entusiasmo inicial com o estudo RAVEL¹⁶ e, em trabalhos posteriores, a utilização de rapamicina⁸⁹ foi confirmada como opção eficaz para reestenose. Em recente artigo⁹⁰, entretanto, a persistência de taxa elevada de reestenose em pacientes diabéticos evidenciou a não resolução completa do problema e a necessidade de soluções complementares. Além disso, na maioria dos países, o uso deliberado de *stents* revestidos com drogas é limitado pelo alto valor financeiro destes equipamentos.

Pelo exposto, a busca de solução para a reestenose avançou muito nos últimos anos. Não houve, entretanto, solução definitiva para o problema, a qual, possivelmente envolverá uma combinação de técnicas e medicações. Nesse contexto, a possibilidade da L-arginina ter seu papel na prevenção deste fenômeno surge em um momento no qual a função endotelial normal está sendo cada vez mais valorizada e a doença do endotélio responsabilizada por um grande número de entidades patológicas. A administração de L-arginina em estudos clínicos não resultou em efeitos colaterais mais importantes e se mostrou especialmente benéfica em momentos de elevação sérica do inibidor da NOs (dimetilarginina)⁹¹. A utilização desta substância para reestenose se baseia nas propriedades farmacológicas acima expostas e necessita de maiores estudos.

O resultado encontrado neste trabalho difere do que havia na literatura até a presente data, pois a L-arginina demonstrou benefício efetivo na dimensão luminal, agindo positivamente na neoproliferação intimal e de forma neutra no remodelamento. Levando em conta sua baixa toxicidade, esta droga poderia ser uma opção isolada ou associada a demais estratégias de inibição da reestenose, após novos estudos.

7 CONCLUSÃO

A partir deste trabalho, é possível concluir que, no modelo experimental utilizado e na dose empregada, a L-arginina:

- 1)é capaz de reduzir a neoproliferação intimal em artérias ilíacas de coelhos hipercolesterolêmicos;
- 2)não tem ação sobre o remodelamento arterial.

8 REFERÊNCIAS

1. MUELLER, R.; SANBORN, T. A. The history of interventional cardiology: cardiac catheterization, angioplasty and related interventions. **Am. Heart J.**, v. 129, p. 146-152, 1995.
2. SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEMODINÂMICA E CARDIOLOGIA INVASIVA. Registro CENIC. Disponível em: <http://www.sbhci.org.br/relatorios_geral.asp> Acesso em: 15 mai. 2005
3. FAVARATO, D. et al. Relative cost comparison of treatments for coronary artery disease: the First Year Follow-Up of MASS II Study. **Circulation.**, .v. 9, supl. 1, p. 21-23, 2003.
4. NOBUYOSHI, M. et al. Restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty: serial angiographic follow-up of 229 patients. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 12, p. 616-623, 1988.
5. ISNER, J. et al. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. **Circulation**, v. 91, p. 2703-2706, 1995.
6. SERRUYS, P. et al. A comparison of ballon-expandable-stent implantation with ballon angioplasty in patients with coronary artery disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 331, p. 489-495, 1994.

7. ASSADA, Y. et al. Effects of insufflation pressure of balloon catheter on vascular injuries and subsequent development of intimal hyperplasia in rabbit aorta. **Atherosclerosis**, v. 121 p. 45-53, 1996.
8. BANAI, S. et al. Rabbit ear model of injury-induced arterial smooth muscle cell proliferation. **Circ. Res.**, v. 69, p. 748-756, 1991.
9. FUKUMOTO, Y. et al. Augmented vasodilator response to L-arginine after coronary angioplasty may attenuate restenosis. **Heart Vessels**, v. 16, p. 171-174, 2002.
10. SCHWARTZ S.M.; DEBLOIS D.; O'BRIEN E.R. The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. **Circ Res.**, v. 77, p. 445-465, 1995.
11. TARDIF, J. C.; GREGOIRE, J.; L'ALLIER, P. L. Prevention of restenosis with antioxidants: mechanisms and implications. **Am. J. Cardiovasc. Drugs.**, v. 2, p. 323-234, 2002.
12. DAUGHARTY, A.; ROSECLAAR, S. E. Lipoprotein oxidation as a mediator of atherosclerosis: insights from pharmacological studies. **Cardiovasc. Res.**, v. 29, p. 297-311, 1995.
13. FREYSCHUSS, A. et al. Antioxidant treatment inhibits the development of intimal thickening after balloon injury of aorta in hypercholesterolemic rabbits. **J. Clin. Invest.**, v. 91, p. 1282-1288, 1993.

14. FISCHALL, T.; KHARMA, B. K.; FISCHALL, D. R. Low-dose-particle emission from stent wire results in complete, localized inhibition of smooth muscle cell proliferation. **Circulation**, v. 90, p. 2956-2963, 1994.
15. BHARGAVA, B.; VODOVOTZ, Y.; WAKSMAN, R. Intracoronary radiation therapy for prevention of restenosis. **Indian Heart J.**, v. 50, p. 120-129, 1998.
16. REGAR, E. et al. Angiographic findings of the multicenter Randomized Study With the Sirolimus-Eluting Bx Velocity Balloon-Expandable Stent (RAVEL): sirolimus-eluting stents inhibit restenosis irrespective of the vessel size. **Circulation**, v. 106, p. 1949-1956, 2002.
17. KALINOWSKI, M. et al. Comparative trial of local pharmacotherapy with L-arginine, r-hirudin, and molsidomine to reduce restenosis after balloon angioplasty of stenotic rabbit iliac arteries. **Radiology**, v. 219, p. 716-720, 2000.
18. NIEBAUER, J. et al. Local L-arginine delivery after balloon angioplasty reduces monocyte binding and induces apoptosis. **Circulation**, v. 100, p. 1830-1835, 1999.
19. INDOLFI, C. et al. Physical training increases eNOS vascular expression and activity and reduces restenosis after balloon angioplasty or arterial stenting in rats. **Circ. Res.**, v. 91, p. 1190-1197, 2002.

20. GRAVANIS, M.; ROUBIN, G. S. Hystopathologic phenomena at the site of percutaneous transluminal coronary angioplasty: The problem of restenosis. **Hum Pathol.**, v. 20, p. 477-485, 1989.
21. NOBUYOSHI, M.; KIMURAH, T.; OHISHI, H. Restenosis after percutaneous transluminal angioplasty: pathologic observations in 20 patients. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 17, p. 433-439, 1991.
22. CARAMORI, P.; YAMAMOTO, G. I.; ZAGO, A. J. Reestenose pós-angioplastia. Fisiopatogenia. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 69, p. 141-150, 1997.
23. SCHWARTZ, S. M.; DEBLOIS, D.; O'BRIEN, E. R. M. The Intima: Soil for atherosclerosis and restenosis. **Circ. Res.**, v. 77, p. 445-465, 1995.
24. WELCH, G.; LOSCALZO, J. Nitric oxide and the cardiovascular system. **J. Card. Surg.**, v. 9, p. 361-371, 1994.
25. TSAO, P.; WANG, B.; BUITRAGO, R. Nitric Oxide regulates monocyte chemostatic protein-1. **Circulation**, v. 96, p. 934-940, 1997.
26. WOLF, A. et al. Dietary L-arginine supplementation normalized platelet aggregation in hypercholestrolemic humans. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 29, p. 479-485, 1997.

27. TSAO, P. et al. Enhanced endothelial adhesiveness in hypercholesterolemia is attenuated by L-arginine. **Circulation.**, v. 89, p. 2176-2182, 1994.
28. HOLM, A. et al. Effects of L-arginine on vascular smooth muscle cell proliferation and apoptosis after balloon injury. **Scand. Cardiovasc. J.**, v. 34, n. 1, p. 28-32, 2000.
29. HERMILLER, J.; TENAGLIA, A. N.; KISSLO, K. In vivo validation of compensatory enlargement of atherosclerotic arteries. **Am. J. Cardiol.**, v. 71, p. 665-668, 1993.
30. GLAGOV, S.; WEINSBERG, E.; ZARINS, C. Compensatory enlargement of human atherosclerotic arteries. **N. Engl. J. Med.**, v. 316, p. 1371-1375, 1987.
31. SCHWARTZ, R. et al. Artery size, neointima, and remodeling: time for some standards. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 32, p. 2087-2094, 1998.
32. CURRIER, J.; FAXON, D. P. Restenosis after percutaneous angioplasty: Have we been aiming at the wrong target? **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 25, p. 516-520, 1995.
33. GALIS, Z.; KHATRI, J. J. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. **Circ. Res.**, v. 90, p. 251-262, 2002.

34. HECKENCAMP, J.; GAWENDA, M.; BRUNKWALL, J. Vascular restenosis: Basic science and clinical implications. **J. Cardiovasc. Surg.**, v. 43, p. 349-357, 2002.
35. POST, M.; BORST, C.; KURTZ, R. E. 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**, v. 89, p. 2816-2821, 1994.
36. GERTZ, S.; SIMPLE, L. W.; BANAI, S. Geometric remodeling is not the principal pathogenic process in restenosis after balloon angioplasty. **Circulation**, v. 90, p. 3001-3008, 1994.
37. WILENSKY, R. et al. Vascular injury, repair, and restenosis after percutaneous transluminal angioplasty in the atherosclerotic rabbit. **Circulation**, v. 92, p. 2995-3005, 1995.
38. LIU, M.; ROUBIN, G. S.; KING, S. II. Restenosis after coronary angioplasty. **Circulation**, v. 79, p. 1373-1387, 1989.
39. NUNES, G.; SGOUTAS, D. S.; REDDEN, R. A. Combinations of vitamins C and E alters response to coronary balloon injury in the pig. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 15, p. 156-165, 1995.

40. TOURNEAU, T. L.; VAN BELLE, E.; CORSEAUX, D. Role of nitric oxide in restenosis after experimental balloon angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit: effects on neointimal hyperplasia and vascular remodeling. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 33, p. 876-882, 1999.
41. VANE, J.; ANGGARD, E. E.; BOTTING, R. M. Regulatory functions of the vascular endothelium. **N. Engl. J. Med.**, v. 323, p. 27-36, 1990.
42. PALMER, R.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of the endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, n. 327, v. 523-526, 1987.
43. MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine nitric oxide pathway. **N. Engl. J. Med.**, v. 329, p. 2002-2012, 1993.
44. IGNARRO, L. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. **Circ. Res.**, v. 65, p. 1-21, 1989.
45. ROLLAND, P.; LATRILLE, V.; GHIRINGHELLI, O. Chronic treatment of atherosclerotic minipigs with isosorbide dinitrate inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and induces nitric oxide-synthase in endothelial cells. **Circulation**, v. 90, p. 129, 1994.

46. SEKI, J. et al. FK 409, a new nitric oxide donor, suppresses smooth muscle proliferation in the rat model of balloon angioplasty. **Atherosclerosis**, v. 117, p. 97-116, 1995.
47. CAYATTE, A. et al. Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. **Arterioscler Thromb.**, v. 14, p. 753-759, 1994.
48. AZUMA, H.; ISHIKAWA, M.; SEKIZAKI, S. Endothelium-dependent inhibition of platelet aggregation. **Br. J. Pharmacol.**, v. 88, p. 411-415, 1986.
49. ADAMS, M. et al. Oral L-arginine in humans: effect on platelet aggregation, hemodynamics and endothelium-dependent dilatation. **Circulation**, v. 90, p. 1138, 1994.
50. YAO, S. et al. Endogenous and exogenous nitric protect against intracoronary thrombosis and reocclusion after thrombolysis. **Circulation**, v. 92, p. 1005-1010, 1995.
51. CLANCY, R. M.; LESZCZYNSKA-PIZIAK, J.; ABRAMSON, S. B. Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. **J. Clin. Invest.**, v.90, p. 1116-1121, 1992.

52. GORNIK, H. L.; CREAGER, M. A. Arginine and endothelial and vascular health. **J. Nutr.**, v. 134, supl. 10, p. 2880-2887, 2004.
53. ZEIHNER, A. et al. Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. **Circ. Res.**, v.76, p. 981-986, 1995.
54. LIO, J.; PENG, H. B.; RAJAVASHISTH, T. B. Nitric oxide inhibits macrophage colony stimulating factor gene transcription in endothelial cells. **Circulation**, v. 92, p. 1506, 1995.
55. SRIVATSA, S. et al. Nitric oxide synthase is prominently expressed in neointimal hyperplasia following experimental vascular injury. **Circulation**, v. 90, p. 1298, 1994.
56. McNAMARA, D. et al. L-arginine inhibits balloon catheter-induced intimal hyperplasia. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 193, p. 291-296, 1993.
57. PREIK-STEINHOFF, H. et al. Transport of L-arginine in endothelial cells. **Circulation**, v. 90, p. 34, 1994.
58. ZICHE, M. et al. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. **J. Clin. Invest.** 1994, v. 94, p. 2036-2044, 1994.

59. BEZERRA, H. et al. Atheromas that cause fatal thrombosis are usually large and frequently accompanied by vessel enlargement. **Cardiovasc. Pathol.**, v. 10, p. 189-196, 2001.
60. JORGE, P. A. et al. Effects of atorvastatin, fluvastatin, pravastatin and simvastatin on endothelial function, lipid peroxidation and aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 84, p. 314-319, 2005.
61. JOHNSON, G.; GRIGGS, T. R.; BADIMON, L. The utility of animal models in the preclinical study of interventions to prevent human coronary artery restenosis: analysis and recommendations. On behalf of the Subcommittee on Animal, Cellular and Molecular Models of Thrombosis and Haemostasis of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. **Thromb. Haemost.**, v. 81, p. 835-843, 1999.
62. STARY, H. et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 15, p. 1512-1531, 1995.
63. KOJIC, Z. Z. Animal models in the study of atherosclerosis. **Srp. Arh. Celok. Lek.**, v. 131, p. 266-270, 2003.

64. DUDEK, D. et al. Effects of L-arginine supplementation on endothelial function after stent implantation. **Kardiol. Pol.**, v. 57, p. 389-397, 2002.
65. DUDEK, D. et al. L-Arginine supplementation does not inhibit neointimal formation after coronary stenting in human beings: an intravascular ultrasound study. **Am. Heart J.**, v. 147, p. E12, 2004.
66. EAGLETON, M. et al. Nitric oxide inhibition increases aortic wall matrix metalloproteinase-9 expression. **J. Surg. Res.**, v. 104, p. 15-21, 2002.
67. HAARER, S.; EMIG, L. L.; KEISER, J. A. Vascular remodeling in balloon injured rabbit iliac arteries. **Basic Res. Cardiol.**, v. 93, p. 210-217, 1998.
68. CHAN, A. W.; CHEW, D. P.; LINCOFF, M. Update on Pharmacology for Restenosis. **Current Int. Card. Rep.**, v. 3, p. 149-155, 2001.
69. MINTZ, G.; POPMA, J. J.; RICHARD, A. D. Arterial remodeling after coronary angioplasty: a serial intravascular ultrasound study. **Circulation**, v. 94, p. 35-43, 1996.
70. HOFFMAN, R. et al. Patterns and mechanisms of in-stent restenosis. A serial intravascular ultrasound study. **Circulation**, v. 94, p. 1247-1254, 1996.

71. HELLER, R. et al. Nitric oxide inhibits proliferation of human endothelial cells via a mechanism independent of cGMP. **Atherosclerosis**, v. 144, p. 49-57, 1999.
72. GREENLESS, C. et al. The effects of L-arginine on neointimal formation and vascular function following balloon injury in heritable hyperlipidaemic rabbits. **Cardiovasc Res.**, v. 35, p. 351-359, 1997.
73. SUZUKI, T. et al. Effect of local delivery of L-arginine on in-stent restenosis in humans. **Am. J. Cardiol.**, v. 89, p. 363-367, 2002.
74. FULTON, G. J. et al. Local effects of nitric oxide supplementation and suppression in the development of intimal hyperplasia in experimental vein grafts. **Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.**, v. 15, p. 279-289, 1998.
75. KOWN, M. H. et al. L-arginine polymers inhibit the development of vein graft neointimal hyperplasia. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v. 121, 971-980, 2001.
76. PERRAULT, L. P. et al. Inhibiting the NO pathway with intracoronary L-NAME infusion increases endothelial dysfunction and intimal hyperplasia after heart transplantation. **J. Heart Lung Transplant.**, v. 22, p. 439-451, 2003.
77. AZUMA, H. Role of L-arginine-endogenous NOS inhibitors-endothelin-1 pathway for the vascular remodelling. **Nippon Yakurigaku Zasshi.**, v. 114, p. 33-40, 1999.

78. KOBBS, R. W. et al. Linked mechanical and biological aspects of remodeling in mouse pulmonary arteries with hypoxia-induced hypertension. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 288, p. 1209-1217, 2005.
79. BURKE, A. P. et al. Morphological predictors of arterial remodeling in coronary atherosclerosis. **Circulation**, v. 105, p. 297-303, 2002.
80. TOPOL, E. J. et al. Randomised trial of coronary intervention with antibody against platelet IIb/IIIa integrin for reduction of clinical restenosis: results at six months. The EPIC Investigators. **Lancet.**, v. 343, p. 881-886, 1994.
81. The EPILOG investigators: Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade and low-dose heparin during percutaneous coronary revascularization. **N. Engl. J. Med.**, v. 336, p. 1689-1696, 1997.
82. TSUCHIKANE, E. et al. Impact of cilostazol on intimal proliferation after percutaneous coronary balloon angioplasty. **Circulation**, v. 100, p. 21-26, 1998.
83. PARK, S. et al. Effects of cilostazol on angiographic restenosis after stent placement. **Am. J. Cardiol.**, v. 86, p. 499-503, 2000.
84. SMET, B. et al. Metalloproteinase inhibition reduces constrictive arterial remodeling after balloon angioplasty: a study in the atherosclerotic Yucatan micropig. **Circulation**, v. 101, p. 2962-2967, 2000.

85. GARANICH, J. S.; PAHAKIS, M.; TARBELL, J.M. Shear stress inhibits smooth muscle cell migration via nitric oxide-mediated downregulation of matrix metalloproteinase-2 activity. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 288, p. 2244-2252, 2005.
86. SEKIYA, M. et al. Effects of probucol and cilostazol alone and in combination on frequency of post-stenting restenosis. **Am. J. Cardiol.**, v. 82, p. 144-147, 1998.
87. MOURA, A. V. et al. Samarium-153 for intravascular irradiation therapy with liquid-filled balloons to prevent restenosis: acute and long-term results in a hypercholesterolemic rabbit restenosis model. **Cardiovasc. Radiat. Med.**, v. 2, p. 69-74, 2001.
88. PRECOMA, D. B. et al. Alterações histopatológicas associadas à braquiterapia intra-arterial com o samário-153. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 40, p. 113-122, 2004.
89. SCHOFER, J. et al. Sirolimus-eluting stents for treatment of patients with long atherosclerotic lesions in small coronary arteries: double-blind, randomised controlled trial (E-SIRIUS). **Lancet.**, v. 362, p. 1093-1099, 2003.

90. MOUSSA, I. et al. SIRollmUS-coated stent in treatment of patients with de novo coronary artery lesions. A SIRIUS (SIRollmUS-coated Bx Velocity balloon-expandable stent in the treatment of patients with de novo coronary artery lesions) Substudy. **Circulation**. v. 109, p. 2273-2278, 2004.
91. BOGER, R. H.; BODE-BOGER, S. M. The Clinical Pharmacology of L-arginine. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 41, p. 79-99, 2001.

ANEXOS

ANEXO I

RELATÓRIO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS



Campina Grande do Sul, 23 de outubro de 2002

De COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA
Para Dr. Jose Knopfholz <jknopfholz@hotmail.com>
Assunto Parecer (referência projeto de dissertação)

Título do projeto

EFEITO DA L-ARGININA NA NEOPROLIFERAÇÃO INTIMAL E NO REMODELAMENTO ARTERIAL APÓS LESÃO POR BALÃO EM ILÍACAS DE COELHOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS

Relator

Dr. João Carlos Domingues Repka

Animais a serem utilizados

19 coelhos

Avaliação dos procedimento (s) previsto (s) :

| Procedimento(s) | Avaliação / sugestão(s) |
|--|--|
| Anestesia : xilazina 5 mg/Kg associado a Ketamine 3,5 mg/Kg, sob a forma de injeção intramuscular em região da coxa. | Satisfatória Estabelecer critério de avaliação de perda de nocicepção, sugerimos aqueles determinados por BACELAR (1999). |
| Tricotomia em região inferior do abdome e inguinal. | Satisfatório Evitar equimoses e outras lesões que possam evoluir durante o experimento com infecção e dor. |
| Anti-sepsia com iodo. | Satisfatório |
| Incisão na prega inguinal de 2 a 3 cm de extensão no sentido longitudinal, e exposição das artérias femorais direita e esquerda. | Satisfatório |
| Introdução de uma guia metálica número | Satisfatório |

| | |
|--|---|
| 0,014, porá os cateteres balão de 3,0 mm de diâmetro por 20 mm de comprimento, a serem inseridos no lúmen da artéria ilíaca. | |
| Nos coelhos do grupo 1 (controle), os cateteres serão insuflados pelo tempo de 5 minutos, com água destilada e com a pressão de 5 ATM. | Satisfatório |
| Nos coelhos do grupo 2 (irradiados) os cateteres balão serão insuflados com uma solução de ¹⁵³ Samarium EDTMP sob a mesma pressão e tempo do grupo 1. | Satisfatório |
| Ao término do procedimento, o balão será desinsuflado e as artérias ligadas com fio de algodão 3-0. | Satisfatório |
| A pele será suturada e a seguir administrado por via intramuscular o analgésico flunixin 25 mg e 100 mg de antibiótico oxitetraciclina 100 mg. | Satisfatório |
| O analgésico será mantido por 2 a 3 dias e o antibiótico por 4 dias, após a operação. | Satisfatório Verificar as características clínicas como pilo-ereção, deambulação e apetite, sinais cardeais de dor em animais, caso estejam presentes, sugerimos adequar a dose do analgésico (Dipirona) |
| Os coelhos serão encaminhados novamente para a gaiola, juntamente com mesmos dois outros animais do período prévio a esta fase, para melhor adaptação. | Satisfatório |
| Ao 15 ^o aos animais serão pesados e anestesiados e retirado amostra de sangue para os exames laboratoriais, através de punção intracardíaca, a seguir administrado dose letal de barbitúrico. | Satisfatório |
| As artérias serão e lavadas e fixadas com formaldeído 10% tamponado com fosfato (ph=7,6), sendo em seguida identificadas e removidas. | Satisfatório |
| As carcaças serão removidas para o expurgo hospitalar e transportadas para o aterro sanitário de Curitiba. | Satisfatório Sugerimos envolver cada carcaça em sacos plásticos de lixo hospitalar e fechá-los |

| | |
|---|--|
| | de maneira hermética. |
| Serão respeitadas as normas de Biossegurança previstas para a manipulação de animais de laboratório e de material radioativo. | Satisfatório Sugerimos as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação animal (COBEA) |
| Somente estarão envolvidos neste experimento profissionais com experiência comprovada nesta metodologia | Satisfatório |

Parecer Final :

Todos os procedimentos analisados pela Comissão de Ética em Pesquisa foram considerados **satisfatórios**, sendo este protocolo **autorizado** para sua execução nas dependências do centro de experimentação animal deste hospital.

| Nome: | Profissão/ Especialidade | Maior Titulação |
|------------------------------|---|----------------------------|
| Isabel Cristina de Souza | Assistente Social | Graduação |
| Fernando Zenóbio de Carvalho | Economista | Especialização |
| Antonio Celso Albuquerque | Advogado | Graduação |
| João Eduardo Leal Nicoluzzi | Médico Cirugia Geral Transplantes | Doutorado |
| Antonio Borges Neto | Farmacêutico Bioquímico | Graduação |
| José Messias Almeida Santos | Padre Teologia | Mestrado |
| Meire Cristiane Cordeiro | Nutricionista | Graduação |
| Ana Cristina Hansaul | Farmacêutica Bioquímica | Mestrado |
| Sunilda W.C.Marmanillo | Psicóloga | Graduação |
| Irinei Melek | Médico Clínico Geral | Especialista |

| | | |
|------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Pedro Ernesto Caron | Médico Cirurgião Geral | Especialista/ Mestrando |
| Cristiane Lange Sabóia | Médica Hematologista | Especialização |

Atenciosamente

Dr. João Carlos Domingues Repka

ANEXO II

AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA