

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS  
CIRÚRGICAS**

**ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA DE  
CARÓTIDAS APÓS O IMPLANTE DE STENT DE CROMO-  
COBALTO SEM E COM REVESTIMENTO DE POLÍMERO:  
MODELO EXPERIMENTAL PORCINO**

**Marco Aurélio Grudtner**

Porto Alegre  
2009

**ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA DE  
CARÓTIDAS APÓS O IMPLANTE DE STENT DE CROMO-  
COBALTO SEM E COM REVESTIMENTO DE POLÍMERO:  
MODELO EXPERIMENTAL PORCINO**

**Marco Aurélio Grudtner**

A apresentação desta tese é exigência do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para a obtenção do título de Doutor, área de concentração: Cirurgia Cardiovascular.

Orientador: Prof. Dr. Adamastor Humberto Pereira

Porto Alegre  
2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Reitor: Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto

Vice-Reitor: Prof. Dr. Rui Vicente Oppermann

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor: Prof. Mauro Antônio Czepielewski

Vice-diretor: Prof. José Geraldo Lopes Ramos

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS CIRÚRGICAS

Chefe: Prof. Milton Berger

Chefe Substituto: Prof. José Carlos Soares de Fraga

COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS CIRÚRGICAS

Coordenador: Walter José Koff

Coordenador substituto: Cleber Dario Pinto Kruel

**G885a** Grudtner, Marco Aurélio

Análise histológica e histomorfométrica de carótidas após o implante de stent de cromo-cobalto sem e com revestimento de polímero : modelo experimental porcino / Marco Aurélio Grudtner ; orient. Adamastor Humberto Pereira. – 2009.

90 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas. Porto Alegre, BR-RS, 2009.

1. Estenose das carótidas 2. Stents 3. Ligas de cromo 4. Hiperplasia 5. Modelos animais I. Pereira, Adamastor Humberto II. Título.

NLM: WG 170

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

Departamento de Ciências Cirúrgicas

Rua Ramiro Barcelos, nº. 2400

Campus Saúde

Bairro Santa Cecília

CEP: 90035-003

Porto Alegre/RS

Fone: (51) 3308.5161 - 3308.5117

Fax: 3308.5232

Marco Aurélio Grudtner

**ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA DE  
CARÓTIDAS APÓS O IMPLANTE DE STENT DE CROMO-COBALTO  
SEM E COM REVESTIMENTO DE POLÍMERO: MODELO  
EXPERIMENTAL PORCINO**

Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Medicina: Cirurgia, Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul,  
para a obtenção do título de  
Doutor, área de concentração:  
Cirurgia Cardiovascular.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a  
Dissertação/Tese ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA  
DE CARÓTIDAS APÓS O IMPLANTE DE STENT DE CROMO-COBALTO  
SEM E COM REVESTIMENTO DE POLÍMERO: MODELO  
EXPERIMENTAL PORCINO, elaborada por Marco Aurélio Grüdtner, como  
requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em Cirurgia Cardiovascular.

Comissão Examinadora:

---

Prof. Dr. Airton Delduque Frankini  
Fundação Faculdade de Ciências da Saúde de Porto Alegre

---

Prof. Dr. Luiz Francisco Machado Costa  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Prof. Dr. Orlando Wender (suplente)  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Dr. Gilberto Gonçalves de Souza  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre

À minha esposa Roberta,  
pelo seu amor, carinho e dedicação,  
e ao nosso filho Gustavo,  
nossa maior felicidade.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Adamastor Humberto Pereira, orientador desta tese de doutorado, pela formação profissional e acadêmica, pela disponibilidade, estímulo e apoio permanentes.

Ao Prof. Dr. Luiz Francisco Costa, pela formação profissional e acadêmica, pelo espírito crítico e pela dedicação associativa.

Ao Prof. Dr. Paulo S. Gutierrez, pela inestimável contribuição na área de Patologia.

Ao Prof. Dr. Pedro Alves Lemos Neto, por propiciar a realização de parte desse trabalho no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de São Paulo.

À Dra. Luciene Machado dos Reis, pela preparação das peças cirúrgicas.

Aos Drs. Gilberto Gonçalves de Souza e Sharbel Mahfuz Boustany, pela amizade e convívio profissional.

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela avaliação do projeto e pelas pertinentes considerações.

Ao Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, especialmente à Médica Veterinária Fabíola Schons Meyer e à Enfermeira Marta Cioato, pela importante contribuição e apoio, fundamentais à viabilização desse trabalho.

Ao Sr. Luciano da Silva Duarte, pela doação dos stents utilizados nesse trabalho.

À Srta. Vânia Naomi Hirakata, pela assessoria na análise estatística.

Aos colegas médicos-residentes do Serviço de Cirurgia Vasculardo Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo estímulo à busca do conhecimento científico.

Ao Dr. João Luiz Elesbão, pela amizade e importante contribuição nos procedimentos experimentais.

Ao Dr. Joel Alex Longhi, pela amizade e colaboração na formatação deste trabalho.

À Profa. Neuza da Silva Costa, pela revisão ortográfica deste trabalho.

Aos meus pais, Ademar e Aida, pelo amor e apoio incondicionais.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

**Introdução:** Apesar dos avanços significativos no tratamento endovascular das doenças arteriais coronarianas e periféricas, a reestenose intra-stent continua sendo o principal limitante a médio prazo desses procedimentos. O mecanismo da reestenose intra-stent é principalmente a hiperplasia intimal, já que o stent impede a retração elástica aguda e resiste ao remodelamento geométrico negativo tardio. A hiperplasia intimal ocorre basicamente em resposta à formação de trombo local, à inflamação e às dissecções intimais e mediais secundárias à injúria causada pelo stent, sendo o grau de resposta intimal a base dos efeitos a longo prazo. O uso de stents com hastes menores e revestidos com drogas ou polímeros tem sido considerado uma nova alternativa para a prevenção da reestenose intra-stent. **Objetivo:** Analisar a resposta arterial ao implante de stent de cromo-cobalto sem e com revestimento de polímero Camouflage® em artérias carótidas de suínos, utilizando os seguintes parâmetros histológicos: grau de endotelização, conteúdo de células musculares lisas, grau de angiogênese, conteúdo de fibrina, grau de inflamação e injúria; além da análise histomorfométrica. **Método:** Stents balões-expansíveis de cromo-cobalto ( 8 stents CC Flex e 5 stents CC Flex Proactive) de 4 x 16 mm foram implantados em artérias carótidas comuns de oito suínos jovens, sendo um stent liberado em cada artéria. Após 30 dias, as artérias contendo os stents foram removidas, fixadas e coradas pelos métodos de hematoxilina/eosina e Verhoeff/Van Giesson. O segmento arterial contendo o stent foi dividido em 3 blocos distintos: proximal, médio e distal. Os cortes histológicos foram obtidos utilizando-se micrótomo de impacto (Polycut S, Leica, Alemanha) equipado com navalha de tungstênio de 16 cm, tipo D (Leica, Alemanha), com 5 µm de espessura. A navalha de tungstênio mantém as hastes dos stents intactas nas secções transversas, minimizando os artefatos potenciais causados pela retirada dos stents. A avaliação foi realizada através de critérios histológicos e histomorfométricos. **Resultados:** Todos os stents foram implantados com sucesso e sem dificuldades técnicas. A análise histológica em 30 dias evidenciou alto grau de endotelização em todos os segmentos avaliados e leve à moderada infiltração de células musculares na íntima. Observou-se baixo grau de angiogênese em cerca de 50% dos segmentos avaliados e ausência completa de deposição de fibrina em pelo menos 80%, com distribuição semelhante entre os grupos. A resposta inflamatória e o grau de injúria causadas pelas hastes dos stents também foram discretas e similares entre os grupos e não houve correlação entre resposta inflamatória e injúria e desses parâmetros com a área de neo-íntima. O grau de obstrução neo-intimal identificada neste período foi pequeno (15,1% +/- 8,38 CC Flex x 15,5% +/- 5,39 CC Flex ProActive) e estatisticamente não significativo entre os grupos (p=0,785). **Conclusão:** Os achados deste estudo experimental sugerem que o uso de stents de cromo-cobalto revestidos com polímero Camouflage® em artérias carótidas de suínos parece estar associado, pelo menos no curto prazo, a uma resposta histológica semelhante àquela encontrada após o implante de stents de cromo-cobalto não revestidos. Neste

período não se observou uma menor hiperplasia intimal em virtude do revestimento de polímero.

**Palavras-chave:** Reestenose intra-stent. Hiperplasia intimal. Stents recobertos com polímero. Modelo experimental de reestenose intra-stent. Stent de cromo-cobalto.



## ABSTRACT

**Introduction:** Despite all the advances in the endovascular treatment of coronary and peripheral artery diseases, in-stent restenosis is still the main limiting factor of these procedures in the medium and long-term. The mechanism of in-stent restenosis is mainly the intimal hyperplasia, as the stent prevents acute elastic recoil and later negative geometric arterial remodeling. Intimal hyperplasia occurs basically in response to the formation of local thrombus, inflammation and intimal and medial dissections secondary to the injury caused by the stent, with the degree of intimal response being the cause of long-term effects. Coating drug-eluting stents with polymers and drugs with thinner struts have been considered a new alternative for in-stent restenosis prevention. **Objective:** Analyse the arterial response to the cobalt-chromium stent implant with and without polymer coating Camouflage® in carotid arteries of pigs, using the following histological parameters: degree of endothelialization, smooth muscle cells (SMC) content, degree of angiogenesis, intimal fibrin content, degree of inflammation and injury; plus histomorphometric analysis. **Method:** Cobalt-chromium balloon-expandable stents (8 CC Flex stents and 5 CC Flex Proactive), 4 x 16 mm, were deployed in common carotid arteries of 8 young pigs, with one stent being deployed in each artery. After 30 days, the arteries containing the stents were removed and underwent fixation and staining using the hematoxylin/eosin and Verhoeff /Van Giesson methods. The arterial segment containing the stent was divided into 3 distinct portions: proximal, middle and distal. The histological sections were obtained using impact microtome (Polycut S, Leica, Germany), equipped with a 16 cm, type D, 5 µm thick tungsten knife (Leica, Germany). The tungsten knife maintains the stent shaft intact in cross sections, minimizing the potential artifacts caused by stent removal. The evaluation was carried out using histological and histomorphometric criteria. **Results:** All the stents were deployed with success and with no technical difficulties. The histological analysis performed after 30 days showed a high level of endothelialization in all the evaluated portions and mild to moderate infiltration of the SMC in the intima layer. A low level of angiogenesis of about 50% of the evaluated portions was observed and a complete absence of fibrin deposition in at least 80% of the portions, with similar distribution among the groups. The inflammatory response and the level of injury caused by the struts of the stents were also minimum and this was similar among the groups. There was no correlation between inflammatory response and injury and between the two latter parameters and the neo-intima area. The level of neo-intimal obstruction identified in this period was small (15,1% +/- 8,38 CC Flex x 15,5% +/- 5,39 CC Flex ProActive ) and no statistical significance between the groups (p=0,785). **Conclusion:** The findings of this experimental study suggest the use of balloon-expandable cobalt-chromium stents coated with polymer Camouflage® in carotid arteries of pigs seems to be associated, at least in the short-term, with a similar histological response to that found in the implantation of non-coated cobalt-

chromium stents. In this period, a lower intimal hyperplasia was not observed with polymer coating stents.

**Keywords:** In-stent restenosis. Intimal hyperplasia. Polymer coating stent. In-stent restenosis experimental model. Cobalt-chromium stent.

## ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO LÍNGUA VERNÁCULA

Grudtner MA<sup>1</sup>, Elesbão JL<sup>2</sup>, Lemos Neto PA<sup>3</sup>, Gutierrez PS<sup>3</sup>, Meyer FS<sup>4</sup>, Pereira AH<sup>5</sup>. Análise histológica de stents de cromo-cobalto sem e com revestimento de polímero Camouflage®: Modelo experimental em carótida porcina.

<sup>1</sup> Cirurgião Vascular, doutorando do Programa de Pós-graduação em Medicina : Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

<sup>2</sup> Cirurgião Vascular, mestrando do Programa de Pós-graduação em Medicina : Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

<sup>3</sup> Instituto do Coração (Incor), Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

<sup>4</sup> Médica Veterinária, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

<sup>5</sup> Chefe do Serviço de Cirurgia Vascular Periférica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

### 1 INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços significativos no tratamento endovascular das doenças arteriais coronarianas e periféricas, a reestenose intra-stent continua sendo o principal limitante a médio e longo prazo desses procedimentos. Mesmo com as melhoras tecnológicas na concepção dos stents, a incidência da reestenose intra-stent continua alta, principalmente como consequência da hiperplasia intimal, já que o stent impede a retração elástica aguda e resiste ao remodelamento arterial geométrico negativo relacionado à angioplastia<sup>1,2</sup>.

Os mecanismos fisiopatológicos da hiperplasia intimal são complexos; entretanto, considera-se que a hiperplasia intimal ocorra basicamente em resposta à formação de trombo local, à inflamação e às dissecções intimais e mediais secundárias à injúria causada pelo stent, sendo o grau de resposta intimal a base dos efeitos a longo prazo<sup>3,4,5</sup>.

Os stents confeccionados com liga de cromo e cobalto da série 605L foram desenvolvidos com o objetivo de manter a radiopacidade e a força radial sem comprometer os resultados a longo prazo observados com os stents de maior espessura como os de aço inoxidável ou nitinol. A liga de cromo e cobalto é considerada mais forte do que a de aço inoxidável, permitindo a confecção de hastes mais finas com aumento da flexibilidade e semelhante visibilidade radiológica<sup>6,7</sup>. Além disso, algumas evidências clínicas têm sugerido que as menores hastes estão associadas à menor indução de hiperplasia intimal e, portanto, melhor evolução clínica<sup>8,9</sup>.

O revestimento de stents com drogas ou polímeros tem sido considerado uma nova alternativa para a prevenção da reestenose intra-stent, a partir da hipótese de que a liberação controlada de uma medicação por um revestimento inerte seja capaz de evitar a reestenose intra-stent. A tecnologia atual tem sido direcionada ao desenvolvimento de uma plataforma de stent que não exacerbe as respostas trombóticas e inflamatórias locais, bem como na identificação de um fármaco eficiente e seguro que seja liberado dessa plataforma e que possua nitidamente propriedades antireestenóticas<sup>7,10,11</sup>.

Os stents revestidos com paclitaxel ou sirolimus reduziram significativamente as taxas de reestenose coronariana, quando comparados com os stents convencionais não revestidos<sup>11,12</sup>. Entretanto, no sistema arterial periférico, os stents revestidos com drogas ou polímeros ainda são considerados experimentais e os resultados clínicos obtidos insuficientes<sup>13,14</sup>.

O glicocálix endotelial é uma rede de glicoproteínas (selectinas, moléculas de adesão), proteoglicanas e glicosaminoglicanas ligadas à membrana celular e que formam uma delicada camada de revestimento, com carga negativa, no lúmen endotelial. O glicocálix endotelial tem um importante papel na

fisiologia vascular, atuando na hemostasia e nas interações da parede vascular com as células sanguíneas, em situações normais e em resposta à injúria<sup>15,16</sup>.

A utilização de um stent com hastes menores, como os de cromo-cobalto, associados a um revestimento que simule o glicocálix endotelial pode ser uma alternativa na prevenção da hiperplasia intimal e, conseqüentemente, da reestenose intra-stent.

Nesse estudo, nós comparamos stents de cromo-cobalto sem e com revestimento de polímero Camouflage®, uma heparina modificada com características semelhantes ao glicocálix endotelial, que forma uma superfície permanente não trombogênica para o stent.

## **2 MÉTODO**

O estudo foi aprovado pelo Grupo de Pesquisa e Pós-graduação (GPPG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e o experimento foi realizado de acordo com o protocolo de anestesia veterinária do Centro de Pesquisas do HCPA.

O experimento foi conduzido com 9 suínos jovens, sem raça definida (Landrace X Large White), em dieta não aterosclerótica (pesando em média 20 Kg) e todas as intervenções foram realizadas com o animal sob anestesia geral. Os animais foram pré-medicados com Cloridrato de Cetamina (15mg/kg) e Midazolam (0,5mg/kg), por via intramuscular. Após 10 minutos foi realizado o acesso venoso na veia cefálica, para administração de fluidoterapia, SF 0,9% (5ml/kg/h).

Os animais foram pré-oxigenados durante 5 minutos, antes da indução anestésica, realizada com propofol (1mg/kg). A manutenção da anestesia geral foi com infusão de propofol a 0,8mg/kg/min. Para analgesia no transoperatório foi utilizado fentanil (50 mcg/kg) e bupivacaína como anestésico local (1mg/kg). No pós-operatório imediato foi aplicado cetoprofeno (2mg/kg) por via

intramuscular. Após a intubação endotraqueal os animais foram mantidos sob ventilação mecânica e propofol, com monitorização eletrocardiográfica e hemodinâmica contínua durante o procedimento.

Uma artéria femoral foi exposta cirurgicamente e uma bainha 6F de 90 cm foi introduzida sobre um fio-guia 0,035. A bainha foi avançada sob controle fluoroscópico até a aorta torácica. Foi administrado 5000 UI de heparina (Heptar-Eurofarma) intravenosa e seletivamente canuladas as artérias carótidas, utilizando-se para tal um cateter vertebral 5F de 100 cm.

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Centro de Pesquisas do HCPA com acompanhamento de médico-veterinário e enfermeira cirúrgica. Sob fluoroscopia, a artéria carótida comum foi manipulada com um fio-guia 0.035 hidrofílico e a bainha 6F avançada até a origem da mesma. Realizou-se a troca do fio-guia 0.035 por 0.014 e sobre este foi introduzido um stent balão-expansível 4 x 16 mm. O balão foi inflado com pressão nominal de 08 ATM durante cerca de 30 seg. e o stent liberado de forma a manter a relação stent/artéria 1,1-1,2:1,0. Após retirada do sistema de liberação do stent foi realizada angiografia de controle para documentar a posição do stent e a perviedade da artéria carótida comum. Um total de 15 stents balões-expansíveis foram implantados. Os stents utilizados foram todos da marca Eucatech® e de mesmas dimensões 4 x 16 mm, sendo que 9 stents de cromo-cobalto (CC-Flex) foram liberados nas carótidas comuns à direita e 6 stents de cromo-cobalto com polímero (CC-Flex Proactive Camouflage®) nas carótidas comuns à esquerda. Nenhuma medicação ou anticoagulação pós-operatória foi utilizada; exceto medicação analgésica ao término do procedimento. Após a retirada do introdutor e fio-guia, a artéria femoral comum foi suturada e a região inguinal fechada por planos. Os procedimentos cirúrgicos foram bem tolerados pelos animais, com exceção de um animal que desenvolveu hipertermia maligna e evoluiu para óbito no período transoperatório, após o implante com sucesso dos stents. Dessa forma, permaneceram oito (8) animais que foram mantidos em observação por 30 dias e, posteriormente, submetidos a nova reintervenção cirúrgica e angiografia de controle, seguindo-se de eutanásia para retirada das peças anatômicas. As peças

anatômicas foram depositadas isoladamente em frascos rotulados e imersos com formalina neutra tamponada a 10% para fixação por > 24hs. Os segmentos arteriais foram posteriormente encaminhados para preparação e emblocamento em resina acrílica de acordo com o protocolo do Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto do Coração (Incor), Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Os cortes histológicos foram obtidos utilizando-se micrótomo de impacto (Polycut S, Leica, Alemanha) equipado com navalha de tungstênio de 16 cm, tipo D (Leica, Alemanha), com 5 µm de espessura. A navalha de tungstênio mantém as hastes dos stents intactas nas secções transversas, minimizando os artefatos potenciais causados pela retirada dos stents. O segmento arterial contendo o stent foi dividido em 3 blocos distintos: proximal, médio e distal e de cada bloco foi obtido 1 corte seccional para análise microscópica. Os cortes histológicos foram desplastificados e corados para análise histológica com hematoxilina-eosina.

As lâminas coradas pela hematoxilina e eosina foram utilizadas para avaliação qualitativa dos fragmentos. O grau de endotelização do stent foi avaliado de acordo com a descrição de Suzuki et al<sup>17</sup>. O grau de injúria do stent na parede vascular foi determinado por dois métodos, descritos por Schwartz e Edelman<sup>18</sup> e Gunn et al<sup>19</sup>. O grau de inflamação também foi avaliado por dois métodos, descritos por Kornowski et al<sup>20</sup> e Lowe et al<sup>21</sup>.

A avaliação dos cortes histológicos foi analisada por um observador independente, cego para o tipo de stent utilizado.

### **3 DESIGN DOS STENTS**

Os stents de cromo-cobalto utilizados no experimento são fabricados pela empresa Eucatech (Alemanha) e confeccionados para uso coronariano, do tipo balão-expansível, sendo compatíveis com cateter-guia 5F.

O stent CC Flex apresenta um design de células abertas conectado com 3 interlink por segmento, com 9 elementos em zig-zag por segmento de anel.

O stent CC Flex Proactive apresenta um design de células abertas conectado com 3 interlink por segmento, com 9 coroas por segmento de anel. O revestimento Camouflage® é uma heparina modificada que simula o glicocálix endotelial formando uma camada de 100 nm de espessura.

#### **4 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

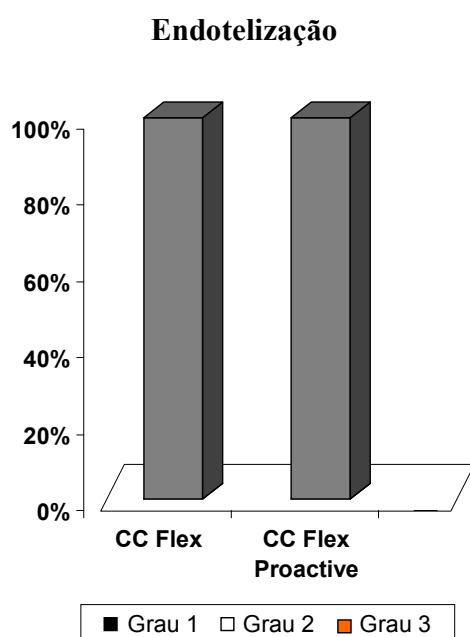
Os dados foram apresentados como média +/- desvio padrão (DP). As comparações entre os grupos foram realizadas através do teste U de Mann-Whitney. Para medida de intensidade de associação entre os dados histológicos foi utilizado o teste de correlação de Spearman. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa Statistical Package for Social Sciences (SPSS, versão 16.0), com nível de significância de 0,05.

#### **5 RESULTADOS**

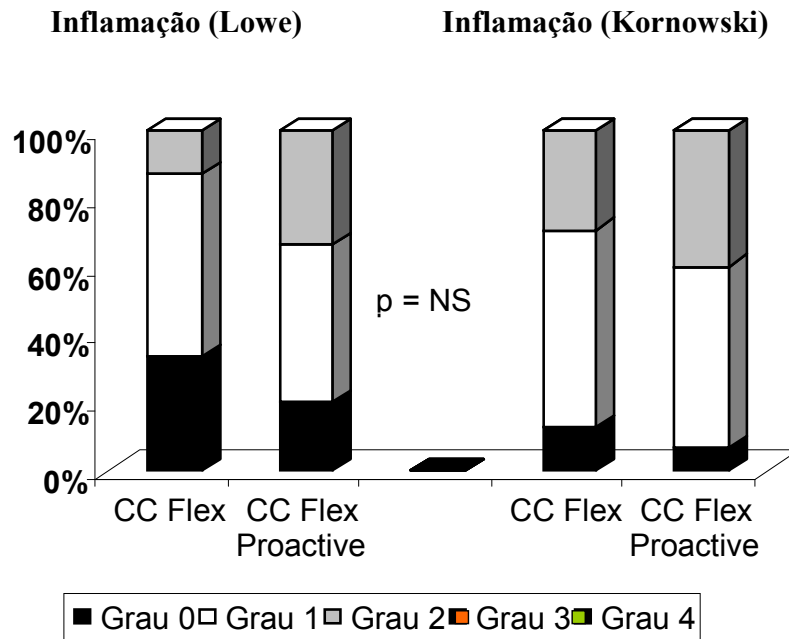
Nesse modelo porcino todos os stents foram implantados com sucesso. Um animal evoluiu para óbito no transoperatório devido à hipertermia maligna e foi excluído da análise. Após 30 dias todos os stents encontravam-se pérvios. Foram avaliados 8 stents CC Flex e 5 stents CC Flex Proactive, divididos em 3 segmentos (proximal, médio e distal), num total de 39 cortes histológicos (24 cortes à direita e 15 cortes à esquerda). A análise histológica revelou endotelização significativa (Grau 3) em todos os stents, independentemente do segmento avaliado (proximal, médio ou distal) ou do tipo de stent utilizado (Gráfico 1). A resposta inflamatória local e o grau de injúria relacionado às



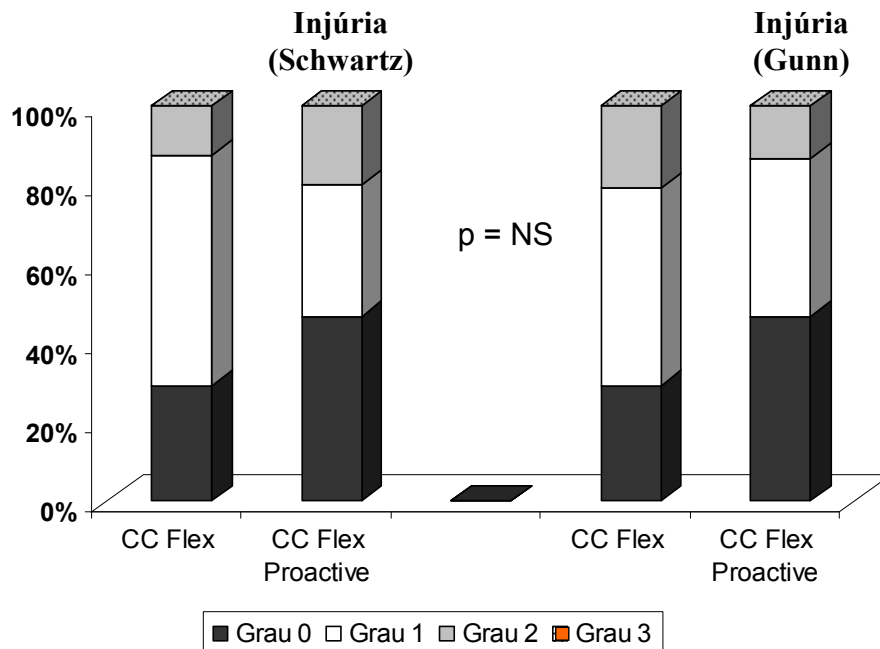
hastes dos stents foram avaliados, respectivamente, por dois métodos validados em estudos de coronárias (Gráfico 2 e Gráfico 3). Identificou-se um leve infiltrado inflamatório e um discreto a moderado grau de injúria na parede arterial relacionado às hastes dos stents, por ambos os métodos, sem relação com o tipo de stent ou o segmento analisado. Também não se observou uma correlação entre inflamação e injúria.



**Gráfico 1** – Distribuição dos graus de endotelização nos grupos de tratamento (CC Flex x CC Flex Proactive).  
Fonte: Dados da pesquisa.



**Gráfico 2** – Distribuição dos graus de inflamação nos grupos CC Flex e CC Flex Proactive pelos métodos de Lowe et al<sup>21</sup> e Kornowski et al<sup>20</sup>.  
Fonte: Dados da pesquisa.



**Gráfico 3** – Distribuição dos graus de injúria nos grupos CC Flex e CC Flex Proactive pelos métodos de Schwartz et al<sup>36</sup> e Gunn et al<sup>19</sup>.  
Fonte: Dados da pesquisa.

## 6 DISCUSSÃO

A crescente utilização da terapia endovascular no tratamento da doença arterial periférica, em particular com a difundida utilização de stents, tem sido associada a um maior número de relatos sobre tentativas de prevenção e tratamento da principal complicação dessa tecnologia médica, a reestenose intra-stent.

A reestenose é uma realidade frequente no seguimento dos pacientes submetidos a intervenções percutâneas coronárias ou periféricas. O uso de stents no leito coronariano tem sido acompanhado de uma redução nas taxas de reestenose e necessidade de nova revascularização quando comparado com a angioplastia isoladamente. Entretanto, a longo prazo, a eficácia do uso do stent também tem sido limitada pela necessidade de repetida revascularização devido à reestenose intra-stent<sup>22</sup>. Os stents revestidos com drogas surgiram como alternativa para impedir a reestenose intra-stent e tem-se mostrado superiores aos stents convencionais<sup>23</sup>, mas os relatos de trombose tardia no leito coronariano levantaram questões sobre a sua eficácia a longo prazo<sup>24,25</sup>. No sistema arterial periférico, o uso de stents revestidos com drogas ou polímeros ainda é considerado investigacional pela ausência de estudos clínicos comparativos demonstrando sua superioridade em relação aos stents convencionais<sup>13,14</sup>.

Em nosso estudo, um modelo porcino carotídeo foi utilizado para testar se stents de cromo-cobalto com revestimento de polímero Camouflage® apresentam uma resposta histológica diferente pela presença do polímero. Como todos os polímeros atuais induzem algum grau de resposta inflamatória, o teste de stents revestidos em estudos experimentais devem incluir uma avaliação qualitativa de inflamação. Os métodos mais frequentemente utilizados para avaliação de inflamação foram validados em estudos de coronárias.

O conhecimento atual sobre a reação arterial ao implante de stents ainda é incompleto, principalmente pelas limitações técnicas inerentes à análise histológica dos tecidos arteriais contendo os stents. Os métodos convencionais de

fixação em parafina e secção tecidual são considerados inadequados, uma vez que a maioria deles necessita a completa remoção do stent implantado durante o preparo da peça, o que acarreta a destruição da parede arterial e, particularmente, da interface stent-artéria. Além disso, a maioria dos laboratórios de patologia não é equipado adequadamente ou não tem experiência suficiente para o manejo de tecidos biológicos contendo próteses metálicas, o que limita significativamente a avaliação desses dispositivos<sup>26</sup>.

Atualmente, para se estudar a resposta vascular ao implante de stent emprega-se para fixação algumas das formulações de resinas de metacrilato. As resinas mais frequentemente utilizadas são glicolmetacrilato, metilmetacrilato e combinações de metilmetacrilato e n-butylmetacrilato, que mantêm a atividade enzimática e a antigenicidade proteica dos tecidos, permitindo a análise histoquímica, imunohistoquímica e por microscopia eletrônica de transmissão<sup>27</sup>.

Neste trabalho a metodologia empregada na preparação e realização dos cortes histológicos das artérias carótidas com stent foi adaptada da metodologia normalmente utilizada para o estudo e diagnóstico de doenças ósseas metabólicas em tecido ósseo calcificado, com algumas modificações. A mesma técnica de preparo das peças tem sido utilizada em nosso meio para a análise de artérias coronárias contendo stents<sup>28</sup>. Os stents mantidos “in situ” nos cortes histológicos minimizam os artefatos potenciais causados pela remoção das hastes. A resina acrílica utilizada tanto na obtenção de cortes histológicos de tecido ósseo calcificado quanto das artérias carótidas com stent é utilizada como um “suporte” com um determinado nível de dureza. A dureza da resina acrílica e a robustez oferecida pelo micrótomo de impacto são os fatores determinantes para a obtenção de cortes íntegros para posterior análise. O micrótomo utilizado com navalha de tungstênio permite cortes finos e adequados para a avaliação histológica proposta.

O conhecimento atual sobre a hiperplasia intimal e a reestenose é decorrente de estudos em modelos experimentais e na comparação com materiais humanos, que na imensa maioria são derivados de autópsias. Os modelos experimentais mais frequentemente utilizados para o estudo da reestenose

envolvem o implante de stents em artérias coronárias de suínos ou em artérias ilíacas de coelhos, apesar de já terem sido testados modelos com implante de stents em ratos, camundongos, cães e primatas em várias localizações da árvore arterial<sup>29,30</sup>.

Na circulação carotídea extracraniana existem relatos esporádicos de estudos experimentais envolvendo o implante de stents, mesmo sendo o procedimento considerado tecnicamente simples e de baixa morbidade<sup>30,31</sup>. Estudos experimentais sugerem que o tamanho, a via de acesso e a resposta à injúria pelo implante de stent em artérias coronárias de suínos e em artérias ilíacas de coelhos sejam similares às coronárias humanas e, portanto, adequadas para a análise desses dispositivos<sup>32</sup>. Por outro lado, alguns estudos também têm demonstrado que artérias de localizações anatômicas diferentes apresentam resposta vascular à injúria diferentes<sup>32,33</sup>. Em modelo porcino, um maior grau de hiperplasia intimal foi observado após 5 semanas em artérias coronárias em relação às artérias ilíacas internas após o implante de stent<sup>32</sup>. Entretanto, Dubé et al<sup>33</sup> observaram, após 6 meses, maior hiperplasia intimal e reestenose intra-stent em artérias femorais de suínos submetidas ao implante de stents balões expansíveis revestidos com fosforilcolina em relação às artérias coronárias<sup>33</sup>. As diferenças de tamanho, as bifurcações, a elasticidade e as curvaturas que afetam o fluxo sanguíneo através de determinada artéria, o maior conteúdo de células musculares lisas em artérias periféricas, assim como o ciclo cardíaco que mantém o fluxo sanguíneo na diástole nas coronárias e na sístole nas artérias periféricas são todos implicados nessa diferença de resposta vascular<sup>33,34</sup>. Tais diferenças justificam a realização de estudos em artérias diferentes e sua comparação para um melhor entendimento do processo de reestenose. Acreditamos que o modelo desenvolvido em carótida extracraniana de suíno mostrou-se adequado por duas razões. Além de permitir a pesquisa envolvendo stents farmacológicos no leito periférico, o modelo serve como alternativa para treinamento em técnicas de cateterismo seletivo, angioplastia e implante de stents.

É importante considerarmos que o termo `reestenose` em estudos animais na verdade se refere ao espessamento intimal resultante da injúria controlada que

é induzida em artérias normais. Os modelos atuais utilizam a lesão por cateter-balão ou o implante de stent, já que o modelo aterosclerótico animal não existe. Neste sentido, os modelos animais que envolvem dupla lesão (cateter-balão + stent), apesar de biologicamente interessantes, pois simulam muitas condições reais na prática clínica, oferecem uma variabilidade muito grande de resposta intimal e são desaconselháveis<sup>29</sup>.

Tepe et al<sup>30</sup> avaliaram com ultrassom intravascular o espessamento intimal após o implante de stents autoexpansíveis recobertos com sirolimus em carótidas de suínos e observaram quase ausência de neointima no grupo que recebeu stent farmacológico. Além disso, identificaram uma alta incidência de trombose em ambos os grupos avaliados, fato que correlacionaram com a inadequada inibição plaquetária pós-intervenção<sup>30</sup>. Em nosso estudo, não observamos nenhuma trombose aguda ou subaguda, o que sugere que nesse modelo animal a não utilização de antiplaquetário não parece estar associada à trombose. Mesmo na literatura experimental, vários regimes medicamentosos com e sem antiagregantes plaquetários têm sido utilizados, com resultados igualmente controversos<sup>30,31,32</sup>.

A endotelização retardada ou a endotelização parcial observada nos stents farmacológicos tem sido sugerida como uma das causas responsáveis pela trombose tardia dos stents, limitando sua eficácia a longo prazo<sup>23,24,25</sup>. Neste estudo, o grau de endotelização foi completo e não diferiu entre os dois grupos de stents ou no mesmo grupo em relação ao segmento avaliado (proximal, médio e distal).

A hiperplasia intimal é um processo decorrente tanto da injúria vascular causada pela penetração das hastes do stent na parede vascular quanto de fatores hemodinâmicos locais como a recirculação, áreas de separação de fluxo e gradientes de força de cisalhamento na parede vascular<sup>34,35</sup>. Em artérias ilíacas de suínos, Sullivan et al<sup>35</sup> observaram que a manutenção de uma lâmina elástica interna intacta é um fator importante na prevenção da hiperplasia intimal e que a geometria ou a espessura das hastes do stent pode estar relacionada a uma resposta proliferativa local exagerada se estiver associada à fratura da lâmina

elástica interna, questionando o habitual oversizing de 10% realizado nos procedimentos de ATP e implante de stent<sup>35</sup>. Por outro lado, Kirsch et al<sup>31</sup> não observaram correlação entre a maior força radial causada por oversizing de até 40% em stents autoexpansíveis e a hiperplasia intimal em artérias carótidas num modelo canino<sup>31</sup>. Schwartz et al<sup>36</sup> estabeleceram uma correlação significativa entre o grau de injúria arterial causado pelo stent e a resultante hiperplasia intimal em coronárias de suínos, sugerindo um escore de injúria que vem sendo frequentemente utilizado em estudos sobre reestenose. No presente estudo, dois métodos para avaliação de injúria foram utilizados, o descrito por Schwartz et al<sup>36</sup> e o de Gunn et al<sup>19</sup>. Os achados neste estudo foram semelhantes, independentemente do segmento do stent avaliado ou do tipo de stent utilizado.

Kornowski et al<sup>20</sup> demonstraram o importante papel da resposta inflamatória na reestenose e a sua correlação com a injúria arterial, validando um escore de inflamação e sugerindo que abordagens anti-inflamatórias poderiam ser de valor na redução da reestenose<sup>20</sup>. Em nosso estudo, o método descrito por Kornowski et al<sup>20</sup> e o utilizado por Lowe et al<sup>21</sup> foram aplicados, e também não observamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos de tratamento no que se refere a esses parâmetros.

Portanto, o uso de stent revestido com polímero não foi associado a uma resposta histológica diferente daquela observada com stents de cromo-cobalto sem revestimento, quando analisados qualitativamente através de escores de endotelização, injúria e inflamação.

Algumas limitações deste estudo devem ser mencionadas. Primeiro, como o experimento foi realizado em animais saudáveis e sob dieta não aterogênica, a extrapolação dos resultados para humanos tem limitações uma vez que não havia lesão estenótica ou oclusão preexistente relacionada à presença de placa aterosclerótica. Por outro lado, como observado por França et al<sup>37</sup> em modelo suíno, a hiperplasia intimal após o implante de stent desenvolve-se independentemente da presença de dieta normal ou aterogênica<sup>37</sup>. Está bem definido que o pico de hiperplasia intimal varia entre as espécies, sendo de 28 dias em suínos e de 6-12 meses em humanos<sup>38</sup>. Como o objetivo era avaliar a

resposta da parede vascular a dois stents, cuja única diferença era o revestimento com polímero, o modelo animal foi considerado adequado. O modelo animal suíno apresenta a vantagem da semelhança com o humano em relação ao perfil lipídico e a resposta vascular à injúria<sup>39</sup>. Segundo, nesse estudo, as artérias carótidas não foram submetidas à pré-dilatação com cateter-balão, situação que melhor se assemelha à prática clínica, mas que por si só pode ser um fator adicional de hiperplasia intimal após o implante de stent. Entretanto, a atual metodologia se justifica porque a intenção foi estudar a resposta vascular induzida apenas pela presença do stent, excluindo a resposta vascular provocada pelo maior trauma secundário à angioplastia. Terceiro, os stents atualmente utilizados no tratamento tanto da doença carotídea aterosclerótica quanto da doença arterial periférica são preferencialmente do tipo autoexpansíveis, com teoricamente maior flexibilidade e menor força radial e, portanto, provavelmente menos indutores de resposta vascular local. Quarto, o fato de que em 30 dias o processo de resposta vascular tenha sido semelhante em ambos os grupos experimentais podem sinalizar que este período curto de observação não seja adequado para a avaliação de stents revestidos, o que também já é sugerido em alguns estudos experimentais mais recentes. A deposição e a organização da matriz extracelular é o maior componente da massa tecidual da hiperplasia intimal. As alterações da matriz extracelular continuam a ocorrer mesmo após encerrada a fase proliferativa e de migração de células musculares lisas e é uma etapa ainda muito obscura no processo de hiperplasia intimal. Certamente, estudos experimentais de longo prazo são necessários para se avaliar se os efeitos do polímero utilizado são benéficos e duradouros.

Este é o primeiro relato de um estudo experimental comparando stents balões-expansíveis de cromo-cobalto sem e com polímero em artérias carótidas de suínos. Em nosso meio, também é o primeiro estudo a avaliar artérias periféricas utilizando-se micrótomo específico para corte de dispositivos metálicos, minimizando os artefatos decorrentes da retirada dos stents. No presente estudo nós realizamos a avaliação histológica através de uma metodologia validada para estudos em coronárias que incluiu a análise de três



variáveis qualitativas (endotelização, inflamação e injúria). Apesar de não observarmos diferença entre os grupos de tratamento, estudos de maior seguimento podem contribuir para uma melhor interpretação desses resultados.

## **7 CONCLUSÃO**

Os achados desse estudo experimental sugerem que o uso de stents de cromo-cobalto, balões-expansíveis e revestidos com polímero Camouflage® em artérias carótidas de suínos parece estar associado, pelo menos no curto prazo, a uma resposta histológica semelhante àquela encontrada no implante de stents de cromo-cobalto não revestidos. Neste período não se observou um retardo na endotelização, uma maior resposta inflamatória local ou uma maior injúria vascular em virtude do revestimento de polímero.

## REFERÊNCIAS

1. Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzler NR, Bakal CW, Creager MA, Halperin JL, et al. ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease): endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation. *Circulation* 2006 Mar; 113(11):463-654.
2. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg.* 2007 Jan;45:Suppl S:S5-67.
3. Golledge J, Campbell JH. Local Therapy for Restenosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005 ;30:571–572.
4. Mitra AK, Agrawal DK. In stent restenosis: bane of the stent era. *J Clin. Pathol* 2006;59:232-239.
5. Versaci F, Gaspardone A. Prevention of restenosis after stenting: the emerging role of inflammation. *Coron Artery Dis* 2004 Sep;15(6):307-11.
6. Kereiakes DJ, Cox DA, Hermiller JB, Midei MG, Bachinsky WB, Nukta ED, et al. Usefulness of a cobalt-chromium coronary stent alloy. *Am J Cardiol* 2003;92:463-6.
7. Ako J, Bonneau HN, Honda Y, Fitzgerald PJ. Design Criteria for the Ideal Drug-Eluting Stent. *Am J Cardiol* 2007;100[suppl]: 3M–9M.
8. Kastrati A, Mehilli J, Dirschinger J, Dotzer F, Schühlen H, Neumann FJ, et al. Intracoronary stenting and angiographic results: strut thickness effect on restenosis outcome (ISARSTEREO) trial. *Circulation* 2001;103(23):2816-21.
9. Pache J, Kastrati A, Mehilli J, Schühlen H, Dotzer F, Hausleiter J, et al. Intracoronary stenting and angiographic results: strut thickness effect on restenosis outcome (ISAR-STEREO-2) trial. *J Am Coll Cardiol* 2003;41(8):1283-8.

10. Henry M, Klonaris C, Amor M, Henry I, Tzvetanov K. Which Stent for Which Lesion in Peripheral Interventions? *Tex Heart Inst J* 2000;27:119-26.
11. Butany J, Carmichael K, Leong SW, Collins MJ. Coronary artery stents: identification and evaluation. *J Clin Pathol* 2005;58:795-804.
12. Fattori R, Piva T. Drug-eluting stents in vascular intervention. *Lancet* 2003;361:247-49.
13. White CJ, Gray WA. Endovascular Therapies for Peripheral Arterial Disease An Evidence-Based Review. *Circulation* 2007;116:2203-2215.
14. Bosiers M, Cagiannos C, Deloose K, Verbist J, Peeters P. Drug-eluting stents in the management of peripheral artery disease. *Vasc Health Risk Manag* 2008;4(3):553-559.
15. Constantinescu AA, Vink H, Spaan JA. Endothelial cell glycocalyx modulates immobilization of leukocytes at the endothelial surface. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23:1541–1547.
16. Mulivor AW, Lipowsky HH. Role of glycocalyx in leukocyte-endothelial cell adhesion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:1282–1291.
17. Suzuki T, Kopia G, Hayashi S, Bailey LR, Llanos G, Wilensky, et al. Stent-based delivery of sirolimus reduces neointimal formation in a porcine coronary model. *Circulation* 2001;104:1188-1193.
18. Schwartz RS, Edelman ER. Drug-eluting stents in preclinical studies: Recommended evaluation from a consensus group. *Circulation* 2002;106:1867-1873.
19. Gunn J, Arnold N, Chan KH, Shepherd L, Cumberland DC, Crossman DC. Coronary artery stretch versus deep injury in the development of in-stent neointima. *Heart* 2002;88:401-5.
20. Kornowski R, Hong MK, Tio FO, Bramwell O, Wu H, Leon MB. In-stent restenosis: Contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:224-230.
21. Lowe HC, Schwartz RS, Mac Neill BD, Jang IK, Hayase M, Rogers C, et al. The porcine coronary model of in-stent restenosis: current status in the era of drug-eluting stents. *Catheter Cardiovasc Interv* 2003;60:515-23.
22. Serruys PW, Kutryk MJB, Ong ATL. Coronary artery stents. *N Engl J Med* 2006;354:483-95.
23. Stone GW, Ellis SG, Cannon L, Mann JT, Greenberg JD, Spriggs D, et al. Comparison of a Polymer-Based Paclitaxel-Eluting Stent With a Bare Metal Stent in Patients With Complex Coronary Artery Disease A Randomized Controlled Trial. *JAMA* 2005;294(10):1215-1223.

24. Philpott AC, Southern DA, Clement FM, Galbraith BN, Traboulsi M, Knudtson ML, et al. Long-term outcomes of patients receiving drug-eluting stents. *CMAJ* 2009;180(2):167-74.
25. Vaknin-Assa H, Assali A, Ukabi S, Lev E, Kornowski R. Stent thrombosis following drug-eluting stent implantation. A single-center experience. *Cardiovasc Revasc Med*, 2007;8:243-7.
26. Froeschl M, Olsen S, Ma X, O'Brien ER. Current understanding of in-stent restenosis and the potential benefit of drug eluting stents. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2004;4:103-117.
27. Rippstein P, Black MK, Boivin M, Veinot JP, Ma X, Chen YX, et al. Comparison of processing and sectioning methodologies for arteries containing metallic stents. *J Histochem Cytochem* 2006 June;54(6):673-681.
28. Lemos PA, Laurindo FRM, Morato SP, Takimura C, Campos CA, Gutierrez PS, et al. Stent coronário de liga cobalto cromo concebido no Brasil: achados histológicos preliminares em modelo experimental porcino. *Rev Bras Cardiol Invas* 2007;15(4): 378-385.
29. Schwartz RS, Chronos NA, Virmani R. Preclinical Restenosis Models and Drug-Eluting Stents: still Important, Still Much to Learn. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:1373- 85.
30. Tepe G, Muschick P, Laule M, Reddig F, Claussen CD, Dinkelborg LM, et al. Prevention of Carotid Artery Restenosis after Sirolimus-coated stent implantation in pigs. *Stroke* 2006 Feb;37(2):492-4.
31. Kirsch EC, Khangure MS, Morling P, Terry JY, McAuliffe W. Oversizing of self-expanding stents: influence on the development of neointimal hyperplasia of the carotid artery in a canine model. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2002 Jan;23(1):121-7.
32. Krueger KD, Mitra AK, DelCore MG, Hunter WJ, Agrawal DK. A comparison of stent-induced stenosis in coronary and peripheral arteries. *J Clin Pathol* 2006 June;59(6)575-9.
33. Dubé H, Clifford AG, Barry CM, Schwarten DE, Schwartz LB. Comparison of the vascular responses to balloon-expandable stenting in the coronary and peripheral circulations: long-term results in an animal model using the TriMaxx stent. *J Vasc Surg* 2007;45:821-7.
34. Rogers C, Edelman ER. Endovascular stent design dictates experimental restenosis and thrombosis. *Circulation* 1995;91:2995-3001.
35. Sullivan TM, Ainsworth SD, Langan EM, Taylor S, Snyder B, Cull D, et al. Effect of endovascular stent strut geometry on vascular injury, myointimal hyperplasia, and restenosis. *J Vasc Surg* 2002;36(1):143-9.

36. Schwartz RS, Huber KC, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vlietstra RE, et al. Restenosis and proportional neointimal response to coronary artery injury: Results in a porcine model. *J Am Coll Cardiol* 1992;19:267-274.
37. França LH, Pereira AH, Perini SC. Self-expandable nitinol stent placement in homocysteinemic porcine aorta. *Clinics* 2008 Apr; 63(2):229-36.
38. Virmani R, Kolodgie FD, Farb A, Lafont A. Drug eluting stents: are human and animal studies comparable? *Heart* 2003;89:133-8.
39. Narayanaswamy M, Wright KC, Kandarpa KJ. Animal Models for Atherosclerosis, Restenosis, and Endovascular Graft Research. *J Vasc Interv Radiol* 2000;11:5-17.

## ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO LÍNGUA INGLESA

Grudtner MA<sup>1</sup>, Elesbão JL<sup>2</sup>, Lemos Neto PA<sup>3</sup>, Gutierrez PS<sup>3</sup>, Meyer FS<sup>4</sup>, Pereira AH<sup>5</sup>. Histological analysis of cobalt-chromium stents with and without Camouflage® polymer coating: Experimental model in porcine carotid artery.

<sup>1</sup> Vascular Surgeon, in Doctor's Degree Program for Medicine Postgraduate Program: Surgery, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul.

<sup>2</sup> Vascular Surgeon, in Master's Degree Program for Medicine Postgraduate Program: Surgery, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul.

<sup>3</sup> Heart Institute (Incor), Clínicas Hospital at Faculty of Medicine, University of São Paulo.

<sup>4</sup> Veterinarian, Clinicas Hospital of Porto Alegre

<sup>5</sup> Head of Peripheral Vascular Surgery Service, Clínicas Hospital of Porto Alegre, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul.

### 1 INTRODUCTION

Despite all the advances in the endovascular treatment of coronary and peripheral artery diseases, in-stent restenosis is still the main limiting factor of these procedures in the medium and long-term. Even with technological improvements in stent conception, the incidence of in-stent restenosis remains high, mainly as a result of intimal hyperplasia, which is an overly aggressive healing response, as the stent prevents acute elastic recoil and negative geometric arterial remodeling related to angioplasty<sup>1,2</sup>.

The pathophysiological mechanisms of intimal hyperplasia are complex; however, intimal hyperplasia is considered to occur basically in response to the formation of local thrombus, inflammation and intimal and medial dissections secondary to the injury caused by the stent, with the degree of intimal response being the cause of long-term effects<sup>3,4,5</sup>.

The majority of stents in use today are composed of 316L stainless steel or nitinol alloy mesh tubes. The stents made from cobalt-chromium alloy of 605L series were developed to maintain the radiopacity and radial force without affecting the long-term results obtained with thicker stents, such as those of stainless steel or nitinol. The cobalt-chromium alloy is considered stronger than that of stainless steel, enabling thinner struts with increased flexibility and similar radiological visibility<sup>6,7</sup>. In addition, some clinical evidences has suggested that smaller struts are associated with reduced intimal hyperplasia and a better clinical outcome<sup>8,9</sup>.

The development of drug-eluting stents (DES) has been considered a new option for in-stent restenosis prevention. The current technology has been focused on the development of a stent platform that does not exacerbate the local inflammatory and thrombotic responses, and the identification of an efficient and safe drug that can be released from such platform with clear antirestenotic properties<sup>7,10,11</sup>.

Paclitaxel- or sirolimus-coated stents significantly reduced the coronary restenosis rates when compared to bare metal stents<sup>11,12</sup>. However, in the peripheral arterial system, drug- or polymer-coated stents are still considered as experimental and the clinical results were regarded as insufficient<sup>13,14</sup>.

The endothelial glycocalix is a network of glycoproteins (selectins, adhesion molecules), proteoglycans and glycosoaminoglycans attached to the cell membrane and which creates a delicate coat of negative load in the endothelial lumen. The endothelial glycocalix plays an important role in the vascular physiology, acting on hemostasis and interactions of the vascular wall with blood cells in normal situations and in response to injuries<sup>15,16</sup>.

The utilization of stents with thinner struts, such as the cobalt-chromium stents, associated with a coating type that simulates the endothelial glycocalix, can be an alternative in the prevention of intimal hyperplasia and, consequently, intra-stent restenosis.

In this study, we compared cobalt-chromium stents with and without coating of Camouflage® polymer, a modified heparin with similar characteristics to those of endothelial glycocalix that creates a non-thrombogenic surface for the stent.

## **2 METHOD**

The study was approved by the GPPG (Research and Postgraduate Program Group) of the Clínicas Hospital of Porto Alegre (HCPA) and was conducted according to the veterinary anesthesia protocol of the Research Center of the HCPA.

The study was conducted using 9 young pigs of undefined race (Landrace x Large White), in a non-atherosclerotic diet (average weight of 20 kg). All interventions were performed with the animal under general anesthetic. The animals were pre-medicated with Ketamine (15mg/kg) and Midazolam (0.5mg/kg), via intramuscular injection. After ten minutes, the venous access to the cephalic vein was performed for the administration of fluid therapy, SF 0.9% (5 ml/kg/h).

The animals were preoxygenated for 5 minutes before the anesthetic induction, performed with propofol (1 mg/kg). The maintenance of general anesthetic was made with propofol infusion at 0.8 mg/kg/min. For intraoperative analgesia, fentanyl (50 mcg/kg) and bupivacaine were used as local anesthetic (1 mg/kg). During immediate postoperative period, ketoprofene (2 mg/kg) was applied via intramuscular injection. After the endotracheal intubation, the



animals were kept under mechanical ventilation and propofol, with continuous electrocardiographic and hemodynamic monitoring during the procedure.

One femoral artery was surgically exposed and one 6F sheath of 90 cm was introduced over a 0.035 guide wire. The sheath was taken under fluoroscopic control to the thoracic aorta. 5000 UI heparin (Heptar-Eurofarma) was then administered intravenously and carotid arteries were selectively cannulated, using a 5F vertebral catheter of 100 cm.

The surgical procedures were performed at the Research Center of the HCPA, with the supervision of a veterinarian and a surgical nurse. Under fluoroscopy, the common carotid artery was manipulated with a 0.035 hydrophilic guide wire and a 6F sheath taken to the artery origin. The 0.035 guide wire was changed to a 0.014 guide wire and over it a balloon-expandable stent 4 x 16 mm was introduced. The balloon was inflated at 08 ATM rated pressure for around 30 sec. and the stent was released in a way to maintain the stent-artery ratio of 1.1-1.2:1.0. After removing the stent release system, control angiography was performed to document the stent position and common carotid artery patency. In total, 15 balloon-expandable stents were implanted, all manufactured by Eucatech and presenting the same dimensions (4 x 16 mm), 9 cobalt-chromium (CC-Flex) stents released in the right common carotid arteries and 6 cobalt-chromium stents with polymer (CC-Flex Proactive Camouflage®) released in the left common carotid arteries. No post-operative medication or anticoagulation was used, except for the analgesic medication after the conclusion of the procedure. After removing the introducer and the guide wire, the common femoral artery was sutured and the inguinal region was closed. The surgical procedures were well tolerated by the animals, except for one animal that developed malign hyperthermia and died in the intraoperative period, after the successful stent implantation. For this reason, eight (8) animals remained and were under observation for 30 days. After this period, they were submitted to a new surgical intervention and control angiography, followed by euthanasia to remove the anatomical pieces. The anatomical pieces were placed separately into labeled recipients and immersed in 10% neutral buffered formalin for fixation for

> 24 hours. The arterial segments were later sent for preparation and in acrylic resin embedment, according to the protocol of the Pathological Anatomy Laboratory at the Heart Institute (Incor), Clinicas Hospital at Faculty of Medicine, University of São Paulo.

The histological sections were obtained using impact microtome (Polycut S, Leica, Germany), equipped with a 16 cm, type D, 5 µm thick tungsten knife (Leica, Germany). The tungsten knife maintains the stent shaft intact in cross sections, minimizing the potential artifacts caused by stent removal. The arterial segment containing the stent was divided into 3 distinct portions (proximal, middle and distal), and one section was cut from each portion for microscopic analysis. The histological sections were deplasticized and stained for histological analysis with hematoxylin-eosin.

The glass plates stained with hematoxylin and eosin were used in the qualitative assessment of the fragments. The stent endothelialization degree was evaluated according to the description of Suzuki et al<sup>17</sup>. The stent injury degree on the vascular wall was determined using two methods, one described by Schwartz e Edelman<sup>18</sup> and one by Gunn et al<sup>19</sup>. The inflammation degree was also evaluated using two methods, one described by Kornowski et al<sup>20</sup> and one by Lowe et al<sup>21</sup>.

The assessment of histological sections was analyzed by an independent observer, blindfolded to the stent type employed in this study.

### **3 DESIGN OF STENTS**

All cobalt-chromium stents employed in this study were manufactured by Eucatech (Germany) and developed for coronary application, all were balloon-expandable type and compatible with 5F guide catheter.

The CC Flex stent has an open-cell design with 3 connected interlinks per segment and 9 crown elements per ring segment.

The CC Flex Proactive stent has an open-cell design with 3 connected interlinks per segment and 9 crown elements per ring segment. Camouflage® coating is a modified heparin that simulates endothelial glycocalix, creating a 100 nm thick film.

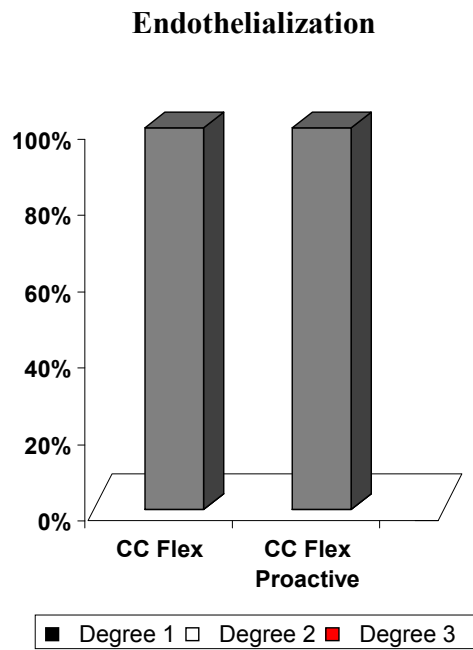
#### **4 STATISTICAL ANALYSIS**

Data were presented as mean +/- standard deviation (SD). The Mann-Whitney U test was used in the comparisons between the groups. The Spearman's correlation coefficient was employed to measure the intensity of association between the histological data. The statistical analyses were made using Statistical Package for Social Sciences (SPSS, version 16.0), with significance level of 0.05.

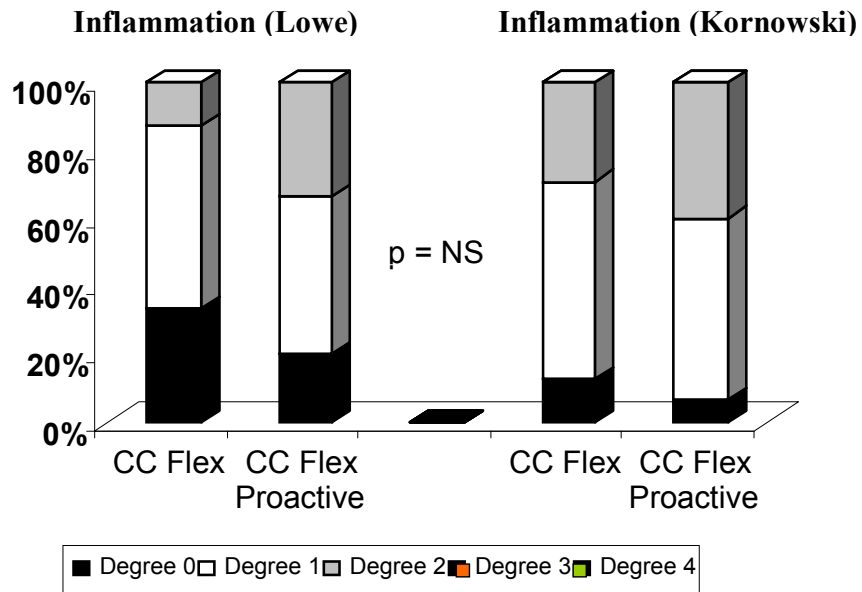
#### **5 RESULTS**

In this porcine model, all stents were successfully implanted. One animal died in the intraoperative period due to malign hyperthermia and was excluded from the analysis. Thirty days after the implantation, all stents were pervious. The assessment was performed in 8 CC Flex stents and 5 CC Flex Proactive stents, divided into 3 segments (proximal, middle and distal), totaling 39 histological sections (24 right sections and 15 left sections). The histological analysis showed significant endothelization (Degree 3) in all stents, regardless of the segment analyzed (proximal, middle or distal) or the stent type (Graphic 1). The local inflammatory response and the injury degree related to the stent shafts were assessed through two methods validated in coronary-related studies (Graphic 2 and Graphic 3). Mild inflammatory infiltrate and mild-to-moderate

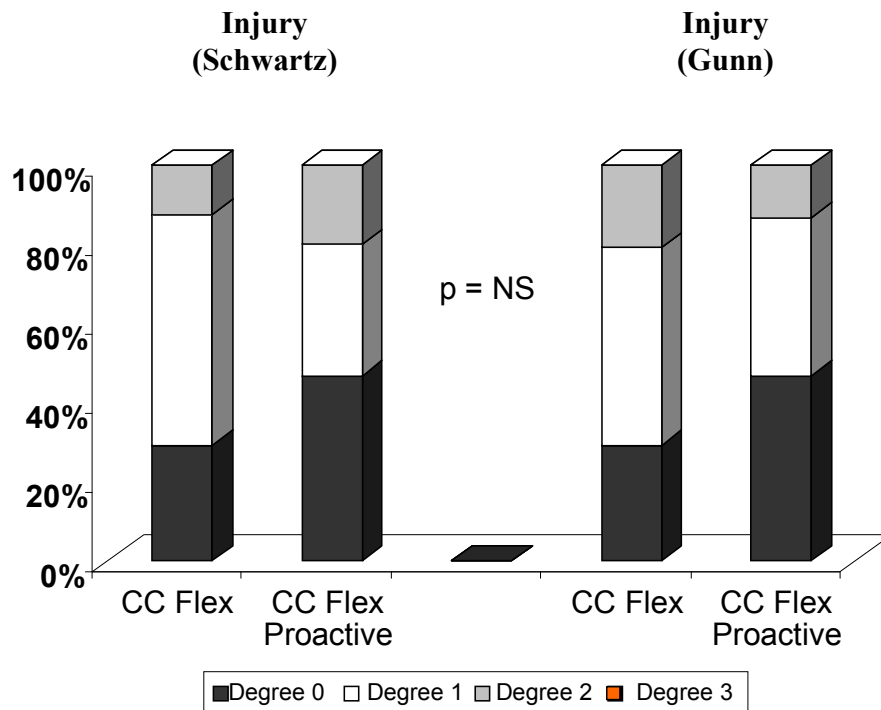
injury were identified on the arterial wall and they were related to the stent shafts, in both methods, with no relation to the stent type or segment analyzed. In addition, no correlation was observed between inflammation and injury.



**Graphic 1** – Endothelialization degrees in the treatment groups (CC Flex x CC Flex Proactive).



**Graphic 2** – Inflammation degrees in the treatment groups (CC Flex and CC Flex Proactive) obtained with the methods of Lowe et al<sup>21</sup> and Kornowski et al<sup>20</sup>.



**Graphic 3** – Injury degrees in the treatment groups (CC Flex and CC Flex Proactive) obtained with the methods of Schwartz et al<sup>36</sup> and Gunn et al<sup>19</sup>.

## 6 DISCUSSION

The increasing indication of endovascular therapy in the treatment of peripheral arterial disease, in particular with the broad use of stents, has been associated with an increased number of reports on attempts to prevent and treat the main complication of the medical technology: in-stent restenosis.

Restenosis is a frequent reality of patients that were submitted to coronary or peripheral percutaneous interventions. The use of stents in the coronary bed has led to reduced restenosis rates and new revascularization, when compared to angioplasty alone. However, in the long term, the stent efficacy has also been limited due to required recurrent revascularization as a result of intra-stent restenosis<sup>22</sup>. Drug-coated stents were developed to prevent intra-stent restenosis and have shown superior results when compared to conventional stents<sup>23</sup>, but the reports concerning late thrombosis in the coronary bed have raised doubts related to their long-term efficacy<sup>24,25</sup>. In the peripheral arterial system, the use of drug- or polymer-coated stents is still considered as investigational, as there are no clinical comparative studies demonstrating their advantages over conventional stents<sup>13,14</sup>.

In our study, a porcine model of carotid artery was used to test whether cobalt-chromium stents with polymer coating Camouflage® present a different histological response due to the presence of polymer. As all current polymers induce some degree of inflammatory response, the test with coated stents in experimental studies should include a qualitative assessment of inflammation. Most frequent methods for inflammation assessment were validated in coronary studies.

The current knowledge of arterial reactions to stent implantation is still incomplete, especially due to technical limitations from histological analyses of the arterial tissues that contain the stents. The conventional methods of paraffin fixation and tissue sectioning are considered inadequate, as most of them require the complete removal of implanted stent during piece preparation, which leads to

the destruction of the arterial wall and, particularly, of the artery-stent interface. Besides this, most pathology laboratories are not properly equipped or have insufficient expertise to handle biological tissues with metallic prostheses, which dramatically limits the evaluation of these devices<sup>26</sup>.

Today, the study of vascular response to stent implantation involves for fixation some formulations of methacrylate resins. Most frequent resins employed are: glycol methacrylate, methyl methacrylate and combinations of methyl methacrylate and n-butyl methacrylate, which maintains the enzymatic activity and protein antigenicity of tissues, enabling the analyses through histochemistry, immunohistochemistry and transmission electron microscopy<sup>27</sup>.

In this study, the methodology utilized in the preparation and execution of histological sectioning of carotid arteries with stent was adapted from the usual methodology for the study and diagnosis of metabolic bone diseases in calcified bone tissue, with some modifications. The same technique for piece preparation has been used in our field for the analysis of coronary arteries with stents<sup>28</sup>. Stents kept *in situ* in histological sections minimize potential artifacts caused by the removal of stents. The acrylic resin used in histological sectioning of calcified bone tissue and carotid arteries with stent is employed as a “support” with a certain level of hardness. The acrylic resin hardness and the rigidity of the impact microtome are determining factors to obtain integral sections for subsequent analysis. The use of microtome with a tungsten knife enables thin cuts, adequate for the proposed histological assessment.

The current knowledge of intimal hyperplasia and restenosis is as a result of studies made in experimental models and the comparison with human materials, which are mostly derived from autopsies. The most frequent experimental models employed in studies on restenosis involve stent implantation in coronary arteries of pigs or iliac arteries of rabbits, although models have been tested with stent implantation in rats, mice, dogs and primates in several locations of the arterial tree<sup>29,30</sup>.

In extra-cranial carotid circulation, there are sporadic reports of experimental studies involving stent implantation, but they apply the technically

simple procedure of low morbidity<sup>30,31</sup>. Experimental studies suggest that the size, way of access and response to injury of the stent implanted in coronary arteries of pigs and in iliac arteries of rabbits are similar to those in human coronary arteries and, therefore, adequate for the analysis of these devices<sup>32</sup>. On the other hand, some studies have demonstrated that arteries of different anatomical locations present different vascular response to injury<sup>32,33</sup>. In a porcine model, a higher degree of intimal hyperplasia was observed in coronary arteries than in internal iliac arteries 5 weeks after the stent implantation<sup>32</sup>. However, Dubé et al<sup>33</sup> observed that after 6 months, there is a higher intimal hyperplasia and intra-stent restenosis in femoral arteries of pigs submitted to the implantation of phosphorylcholine-coated balloon-expandable stents than in coronary arteries<sup>33</sup>. Size differences, bifurcations, elasticity and curvature that affect the bloodstream in a certain artery, the larger content of smooth muscular cells in peripheral arteries, as well as the cardiac cycle that keeps the bloodstream in diastole in coronary arteries and in systole in peripheral arteries are all involved in this difference of vascular response<sup>33,34</sup>. Such differences justify the performance of studies in different arteries and their comparisons, to better understand the restenosis process. We believe that the model developed in extracranial carotid arteries of pigs was shown to be adequate for two reasons: it allowed the study involving pharmacological stents in the peripheral bed and can be considered as an alternative training on techniques of selective catheterization, angioplasty and stent implantation.

It should be noted that restenosis in animal studies refers to the intimal thickening resulting from the controlled injury induced in normal arteries. The current models use lesion due to the balloon catheter or the stent implant, as the animal atherosclerotic model does not exist. In this sense, the animal models that involve double lesion (balloon catheter + stent), although biologically interesting as they simulate many real conditions in clinical practice, offer a very broad variability of intimal response and are not recommended<sup>29</sup>.

Tepe et al<sup>30</sup> evaluated, through intravascular ultrasound, the intimal thickening after the implantation of sirolimus-coated self-expandable stents in



carotid arteries of pigs and observed an almost total absence of neointima in the group that received pharmacological stent. In addition, they identified a high incidence of thrombosis in both groups evaluated, a fact that was correlated with the inadequate platelet inhibition after the intervention<sup>30</sup>. In our study, we did not observe acute or subacute thrombosis, which suggests that, in this animal model, the non-utilization of any antiplatelet drug does not seem to be associated with thrombosis. Even in experimental literature, several drug treatments with and without platelet anti-binders have been used, with equally controversial results<sup>30,31,32</sup>.

Delayed or partial endothelialization observed in pharmacological stents has been suggested as one of the causes of late stent thrombosis, reducing the long-term efficacy of the stents<sup>23,24,25</sup>. In this study, the endothelialization degree was complete and did not present any difference between the two groups of stents or in the same group regarding the segment evaluated (proximal, middle and distal).

Intimal hyperplasia is a process resulting from both the vascular injury due to stent shaft penetration into the vascular wall and local hemodynamic factors, such as recirculation, flow separation areas and shear force gradients on the vascular wall<sup>34,35</sup>. In iliac arteries of pigs, Sullivan et al<sup>35</sup> observed that the maintenance of an intact internal elastic lamina is an important factor in the prevention of intimal hyperplasia and that stent shaft geometry or thickness can be related to exaggerated local proliferative response if associated with internal elastic lamina fracture, questioning the habitual 10% oversizing considered in ATP procedures and stent implantation<sup>35</sup>. On the other hand, Kirsch et al<sup>31</sup> did not observe any correlation between the highest radial force due to oversizing up to 40% in self-expandable stents and intimal hyperplasia in carotid arteries of a dog<sup>31</sup>. Schwartz et al<sup>36</sup> established a significant correlation between the arterial injury degree caused by the stent and the resulting intimal hyperplasia in coronary arteries of pigs<sup>36</sup>, suggesting an injury score that has been frequently used in restenosis studies. In this study, two methods for injury evaluation were used, one described by Schwartz et al<sup>18</sup> and one by Gunn et al<sup>19</sup>. The findings of

this study were similar, regardless of the stent segment evaluated or the stent type utilized.

Kornowski et al<sup>20</sup> demonstrated the important role of the inflammatory response in restenosis and its correlation with arterial injury, validating an inflammation score and suggesting that anti-inflammatory approaches could be significant in restenosis reduction<sup>20</sup>. In our study, the method described by Kornowski et al<sup>20</sup> and the method used by Lowe et al<sup>21</sup> were applied, and again we did not observe any statistically significant difference in these parameters between the treatment groups.

Therefore, the use of a polymer-coated stent was not associated with a different histological response from that observed with non-coated cobalt-chromium stents, when they were qualitatively analyzed through endothelialization, injury and inflammation scores.

Some limitations of this study should be mentioned. Firstly, as the study was conducted in healthy animals in a non-atherogenic diet, the extrapolation of results for humans presents limitations as there was no stenotic lesion or preexisting occlusion related to the presence of atherosclerotic plaque. On the other hand, as observed by França et al<sup>37</sup>, the intimal hyperplasia in pigs developed after the stent implantation regardless of a normal or atherogenic diet<sup>37</sup>. It is well defined that the intimal hyperplasia peak varies with the species, e.g. 28 days in pigs and 6-12 months in humans<sup>38</sup>. As the objective was to assess the vascular wall response to two stents, whose only difference was the polymer coating, the animal model was considered adequate. The pig offers the advantage of being similar to human in terms of lipid profile and vascular response to injury<sup>39</sup>. Secondly in this study, the carotid arteries were not submitted to predilatation with balloon catheter, a situation that is closer to the clinical practice, but that alone can be an additional factor of intimal hyperplasia after the stent implantation. However, the current methodology is justified because the intention was to study the vascular response induced only by the presence of stent, excluding the vascular response caused by larger trauma secondary to angioplasty. Thirdly, the stents currently utilized in the treatment of both

atherosclerotic carotid artery disease and peripheral arterial disease are preferably self-expandable, with theoretically increased flexibility and reduced radial force and, therefore, probably fewer inducers of local vascular response. Fourthly, the fact that within 30 days, the vascular response process was similar in both experimental groups can indicate that this short observation period is not adequate for coated stent assessment, which is also suggested in some more recent experimental studies. The extracellular matrix deposition and organization is the largest component of intimal hyperplasia tissue mass. Alterations to the extracellular matrix continue even after the end of the proliferative and migratory phase of smooth muscular cells; it is still a very obscure phase in the intimal hyperplasia process. Long-term experimental studies are certainly required to evaluate whether the polymer effects are beneficial and durable.

This is the first report of an experimental study comparing balloon-expandable cobalt-chromium stents with and without polymer in carotid arteries of pigs. In our field, it is also the first study that evaluates the peripheral arteries using a specific microtome to cut metallic devices, minimizing the artifacts resulting from the removal of stents. In this study, we made the histological assessment using a methodology validated to coronary-related studies that included the analysis of three qualitative variables (endothelialization, inflammation and injury). Although no difference was observed between the treatment groups, studies of longer analysis period can contribute to a better interpretation of these results.

## **7 CONCLUSION**

The findings of this experimental study suggest the use of balloon-expandable cobalt-chromium stents coated with polymer (Camouflage®) in carotid arteries of pigs seems to be associated, at least in the short-term, with a similar histological response to that found in the implantation of non-coated

cobalt-chromium stents. In this period, neither an endothelialization delay was observed, nor a stronger local inflammatory response or larger vascular injury caused by the polymer coating.

## REFERÊNCIAS

1. Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzler NR, Bakal CW, Creager MA, Halperin JL, et al. ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease): endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation. *Circulation* 2006 Mar; 113(11):463-654.
2. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg.* 2007 Jan;45:Suppl S:S5-67.
3. Golledge J, Campbell JH. Local Therapy for Restenosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005 ;30:571–572.
4. Mitra AK, Agrawal DK. In stent restenosis: bane of the stent era. *J Clin. Pathol* 2006;59:232-239.
5. Versaci F, Gaspardone A. Prevention of restenosis after stenting: the emerging role of inflammation. *Coron Artery Dis* 2004 Sep;15(6):307-11.
6. Kereiakes DJ, Cox DA, Hermiller JB, Midei MG, Bachinsky WB, Nukta ED, et al. Usefulness of a cobalt-chromium coronary stent alloy. *Am J Cardiol* 2003;92:463-6.
7. Ako J, Bonneau HN, Honda Y, Fitzgerald PJ. Design Criteria for the Ideal Drug-Eluting Stent. *Am J Cardiol* 2007;100[suppl]: 3M–9M.
8. Kastrati A, Mehilli J, Dirschinger J, Dotzer F, Schühlen H, Neumann FJ, et al. Intracoronary stenting and angiographic results: strut thickness effect on restenosis outcome (ISARSTEREO) trial. *Circulation* 2001;103(23):2816-21.

9. Pache J, Kastrati A, Mehilli J, Schuhlen H, Dotzer F, Hausleiter J, et al. Intracoronary stenting and angiographic results: strut thickness effect on restenosis outcome (ISAR-STEREO-2) trial. *J Am Coll Cardiol* 2003;41(8):1283-8.
10. Henry M, Klonaris C, Amor M, Henry I, Tzvetanov K. Which Stent for Which Lesion in Peripheral Interventions? *Tex Heart Inst J* 2000;27:119-26.
11. Butany J, Carmichael K, Leong SW, Collins MJ. Coronary artery stents: identification and evaluation. *J Clin Pathol* 2005;58:795-804.
12. Fattori R, Piva T. Drug-eluting stents in vascular intervention. *Lancet* 2003;361:247-49.
13. White CJ, Gray WA. Endovascular Therapies for Peripheral Arterial Disease An Evidence-Based Review. *Circulation* 2007;116:2203-2215.
14. Bosiers M, Cagiannos C, Deloose K, Verbist J, Peeters P. Drug-eluting stents in the management of peripheral artery disease. *Vasc Health Risk Manag* 2008;4(3):553-559.
15. Constantinescu AA, Vink H, Spaan JA. Endothelial cell glycocalyx modulates immobilization of leukocytes at the endothelial surface. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23:1541–1547.
16. Mulivor AW, Lipowsky HH. Role of glycocalyx in leukocyte-endothelial cell adhesion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:1282–1291.
17. Suzuki T, Kopia G, Hayashi S, Bailey LR, Llanos G, Wilensky, et al. Stent-based delivery of sirolimus reduces neointimal formation in a porcine coronary model. *Circulation* 2001;104:1188-1193.
18. Schwartz RS, Edelman ER. Drug-eluting stents in preclinical studies: Recommended evaluation from a consensus group. *Circulation* 2002;106:1867-1873.
19. Gunn J, Arnold N, Chan KH, Shepherd L, Cumberland DC, Crossman DC. Coronary artery stretch versus deep injury in the development of in-stent neointima. *Heart* 2002;88:401-5.
20. Kornowski R, Hong MK, Tio FO, Bramwell O, Wu H, Leon MB. In-stent restenosis: Contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:224-230.
21. Lowe HC, Schwartz RS, Mac Neill BD, Jang IK, Hayase M, Rogers C, et al. The porcine coronary model of in-stent restenosis: current status in the era of drug-eluting stents. *Catheter Cardiovasc Interv* 2003;60:515-23.
22. Serruys PW, Kutryk MJB, Ong ATL. Coronary artery stents. *N Engl J Med* 2006;354:483-95.

23. Stone GW, Ellis SG, Cannon L, Mann JT, Greenberg JD, Spriggs D, et al. Comparison of a Polymer-Based Paclitaxel-Eluting Stent With a Bare Metal Stent in Patients With Complex Coronary Artery Disease A Randomized Controlled Trial. *JAMA* 2005;294(10):1215-1223.
24. Philpott AC, Southern DA, Clement FM, Galbraith BN, Traboulsi M, Knudtson ML, et al. Long-term outcomes of patients receiving drug-eluting stents. *CMAJ* 2009;180(2):167-74.
25. Vaknin-Assa H, Assali A, Ukabi S, Lev E, Kornowski R. Stent thrombosis following drug-eluting stent implantation. A single-center experience. *Cardiovasc Revasc Med*, 2007;8:243-7.
26. Froeschl M, Olsen S, Ma X, O'Brien ER. Current understanding of in-stent restenosis and the potential benefit of drug eluting stents. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2004;4:103-117.
27. Rippstein P, Black MK, Boivin M, Veinot JP, Ma X, Chen YX, et al. Comparison of processing and sectioning methodologies for arteries containing metallic stents. *J Histochem Cytochem* 2006 June;54(6):673-681.
28. Lemos PA, Laurindo FRM, Morato SP, Takimura C, Campos CA, Gutierrez PS, et al. Stent coronário de liga cobalto cromo concebido no Brasil: achados histológicos preliminares em modelo experimental porcino. *Rev Bras Cardiol Invas* 2007;15(4): 378-385.
29. Schwartz RS, Chronos NA, Virmani R. Preclinical Restenosis Models and Drug-Eluting Stents: still Important, Still Much to Learn. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:1373- 85.
30. Tepe G, Muschick P, Laule M, Reddig F, Claussen CD, Dinkelborg LM, et al. Prevention of Carotid Artery Restenosis after Sirolimus-coated stent implantation in pigs. *Stroke* 2006 Feb;37(2):492-4.
31. Kirsch EC, Khangure MS, Morling P, Terry JY, McAuliffe W. Oversizing of self-expanding stents: influence on the development of neointimal hyperplasia of the carotid artery in a canine model. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2002 Jan;23(1):121-7.
32. Krueger KD, Mitra AK, DelCore MG, Hunter WJ, Agrawal DK. A comparison of stent-induced stenosis in coronary and peripheral arteries. *J Clin Pathol* 2006 June;59(6)575-9.
33. Dubé H, Clifford AG, Barry CM, Schwarten DE, Schwartz LB. Comparison of the vascular responses to balloon-expandable stenting in the coronary and peripheral circulations: long-term results in an animal model using the TriMaxx stent. *J Vasc Surg* 2007;45:821-7.

34. Rogers C, Edelman ER. Endovascular stent design dictates experimental restenosis and thrombosis. *Circulation* 1995;91:2995-3001.
35. Sullivan TM, Ainsworth SD, Langan EM, Taylor S, Snyder B, Cull D, et al. Effect of endovascular stent strut geometry on vascular injury, myointimal hyperplasia, and restenosis. *J Vasc Surg* 2002;36(1):143-9.
36. Schwartz RS, Huber KC, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vlietstra RE, et al. Restenosis and proportional neointimal response to coronary artery injury: Results in a porcine model. *J Am Coll Cardiol* 1992;19:267-274.
37. França LH, Pereira AH, Perini SC. Self-expandable nitinol stent placement in homocysteinemic porcine aorta. *Clinics* 2008 Apr; 63(2):229-36.
38. Virmani R, Kolodgie FD, Farb A, Lafont A. Drug eluting stents: are human and animal studies comparable? *Heart* 2003;89:133-8.
39. Narayanaswamy M, Wright KC, Kandarpa KJ. Animal Models for Atherosclerosis, Restenosis, and Endovascular Graft Research. *J Vasc Interv Radiol* 2000;11:5-17.

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1</b>	Animal sob anestesia geral e com acesso venoso através da veia cefálica esquerda	59
<b>Figura 2</b>	Acesso vascular através de dissecação da artéria femoral	60
<b>Figura 3</b>	Corte histológico de artéria carótida seccionada transversalmente, mostrando em negro as fibras elásticas, que constituem as lâminas elásticas internas (seta azul) e externas (seta vermelha). Coloração pelo método de Verhoeff/ Van Gieson, aumento da objetiva 2,5x	63
<b>Figura 4</b>	Corte histológico de artéria carótida seccionada transversalmente, apresentando perfis de stent (alguns indicados com setas amarelas). Coloração pelo método de Verhoeff/ Van Gieson, aumento da objetiva 2,5x	63
<b>Figura 5</b>	Maior aumento da porção indicada em verde na fotografia anterior. Nota-se que o stent comprime a lâmina elástica interna (indicada por seta azul) e há formação de uma neoíntima (parte situada entre essa lâmina e a luz arterial). Coloração pelo método de Verhoeff/ Van Gieson, aumento da objetiva 20x	64



**LISTA DE GRÁFICOS**

<b>Gráfico 1</b>	Distribuição dos Graus de Endotelização nos grupos de tratamento (CC Flex x CC Flex Proactive)	70
<b>Gráfico 2</b>	Distribuição dos Graus de Angiogênese e Deposição de Fibrina nos grupos CC Flex e CC Flex Proactive	71
<b>Gráfico 3</b>	Distribuição dos Graus de Inflamação nos grupos CC Flex e CC Flex Proactive pelos métodos de Lowe et al e Kornowskiet al.	71
<b>Gráfico 4</b>	Distribuição dos Graus de Injúria nos grupos CC Flex e CC Flex Proactive pelos métodos de Schwartz et al e Gunn et al.	72
<b>Gráfico 5</b>	Lista de todas as medidas histomorfométricas realizadas	73

**LISTA DE ABREVIATURAS**

Atm	Atmosferas
cm	Centímetros
Et	E
et al.	E outros
Fig.	Figura
F	French
G	Gauge
g	gramas
H	hora
kg	quilogramas
mcg	microgramas
µm	Micrômetros
min	minuto
mg	miligramas
ml	mililitros
mm	milímetros
mm <sup>2</sup>	milímetros quadrados
nm	nanômetros
N	número
p.	página
S	segundo
suppl.	Suplemento
UI	Unidades Internacionais

**SUMÁRIO**

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	52
<b>1.1</b>	<b>A resposta vascular à injúria</b> .....	53
<b>1.2</b>	<b>Hiperplasia intimal e reestenose intra-stent</b> .....	54
<b>1.3</b>	<b>Stents vasculares</b> .....	55
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	58
<b>3</b>	<b>MÉTODOS</b> .....	59
<b>3.1</b>	<b>Design dos stents</b> .....	68
<b>3.2</b>	<b>Análise Estatística</b> .....	69
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	70
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	74
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	82
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	83

## 1 INTRODUÇÃO

Impulsionados pelo crescente desenvolvimento tecnológico, o número de procedimentos endovasculares periféricos vem aumentando progressivamente, seguindo a tendência das intervenções coronárias percutâneas<sup>1,2,3,4</sup>. Os novos sistemas de baixo perfil, as técnicas de recanalização subintimal, os agentes de contraste com menor nefrotoxicidade e a maior experiência com os dispositivos endovasculares vêm elevando os índices de sucesso desses procedimentos com menor morbi-mortalidade<sup>3,5</sup>.

A melhora nos desfechos clínicos com as intervenções percutâneas periféricas tem sido tão marcante que importantes consensos terapêuticos internacionais envolvendo múltiplas especialidades (cirurgiões vasculares, cardiologistas e radiologistas intervencionistas) vem sendo amplamente revisados, aumentando-se os critérios de tratamento endovascular para lesões arteriais periféricas anteriormente consideradas eminentemente de tratamento cirúrgico<sup>6,7</sup>.

Certamente o sucesso dos procedimentos endovasculares atuais deve-se também às melhorias técnicas incorporadas no desenvolvimento dos stents. Os stents coronarianos representam atualmente a forma de intervenção mais comum para a revascularização miocárdica, após vários estudos controlados comprovarem sua superioridade em relação à angioplastia primária, em diversas apresentações clínicas e angiográficas da doença coronariana<sup>4,8</sup>. No sistema arterial periférico o número de estudos experimentais e clínicos é muito inferior, mas o benefício do implante de stent em comparação com os procedimentos cirúrgicos ou a angioplastia, em determinados segmentos arteriais e em certos tipos de lesões também vem sendo demonstrado<sup>9,10,11,12,13,14,15</sup>.

Apesar das nítidas vantagens das intervenções endovasculares percutâneas com implante de stents, como a mínima invasibilidade e morbidade, é importante ressaltar que a perviidade a médio e longo prazo é inferior aos procedimentos cirúrgicos devido a uma complicação relativamente frequente que

causa a reobstrução do segmento tratado, um processo conhecido como reestenose intra-stent<sup>13,14,15</sup>.

### **1.1 A resposta vascular à injúria**

Independentemente da localização arterial, sabe-se que todas as formas de intervenção vascular mecânica conferem algum grau de injúria vascular<sup>16</sup>. O implante de stent reduz ou impede a retração elástica aguda, que ocorre no vaso tratado até 24 horas após os procedimentos de angioplastia, evita a oclusão precoce associada à dissecação intimal pós-angioplastia e opõe-se ao remodelamento negativo crônico<sup>17</sup>. Entretanto, apesar de todos os avanços até agora obtidos na concepção dos stents, a reestenose intra-stent permanece como o principal problema a médio e longo prazo, limitando a eficácia do procedimento tanto no leito coronariano quanto no leito periférico, principalmente em vasos de menor calibre. A re-estenose intra-stent ocorre como resultado do trauma na parede vascular secundário à angioplastia e ao implante do stent, que resulta numa resposta cicatricial agressiva e consequentemente numa redução do lúmen e no estreitamento vascular<sup>18,19,20</sup>.

A incidência relatada de reestenose clinicamente significativa no primeiro ano é variada, mas situa-se em torno de 10-40%, dependendo do leito arterial, da gravidade das lesões e do procedimento realizado<sup>17,21,22</sup>. Vários estudos experimentais têm sido conduzidos no sentido de se entender melhor o processo da reestenose após os procedimentos de intervenção percutânea, sendo que atualmente os mecanismos principais considerados na gênese da reestenose são: a hiperplasia intimal e o remodelamento arterial geométrico<sup>19,23,24,25</sup>.

A hiperplasia intimal é um processo multifatorial que envolve a ação de citocinas e fatores de crescimento responsáveis pela ativação, migração e

proliferação de células musculares lisas na camada íntima arterial, com deposição de matriz extra-celular. Por outro lado, o mecanismo do remodelamento arterial que ocorre posteriormente é menos compreendido, mas parece envolver o controle do turnover de matriz extracelular, sob a ação de metaloproteinases<sup>19</sup>.

## **1.2 Hiperplasia intimal e reestenose intra-stent**

A reestenose após o implante de stent deve-se fundamentalmente ao desenvolvimento da hiperplasia intimal, um processo universal bem definido de resposta vascular à injúria, uma vez que o stent resiste ao remodelamento geométrico negativo. Na realidade, a lesão arterial mecânica induzida pelo stent causa uma resposta inflamatória aguda e crônica na parede do vaso, em consequência da presença do corpo estranho e da lesão na parede vascular, com a indução da hiperplasia intimal e, posteriormente, em alguns casos, da reestenose intra-stent. Este é um processo dinâmico de interação stent-artéria, sendo influenciado pela composição da superfície, tamanho e configuração do stent. Fundamentalmente, a lesão vascular profunda, o desnudamento do endotélio e a interação do stent com a parede arterial são os determinantes da extensão da hiperplasia intimal e da reestenose intra-stent<sup>26</sup>.

O endotélio é uma monocamada de células associada a uma matriz de membrana basal que possui uma situação privilegiada na parede vascular, uma vez que está localizado na interface entre as células sanguíneas e os órgãos, recebendo informações dos constituintes celulares e da matriz extracelular e interpretando alterações na composição e nas forças mecânicas sanguíneas<sup>27</sup>.

O glicocálix endotelial é uma rede de glicoproteínas (selectinas, moléculas de adesão), proteoglicanas e glicosaminoglicanas ligadas à membrana celular e que formam uma delicada camada de revestimento, com carga negativa, no lúmen endotelial. O glicocálix endotelial tem um importante papel na fisiologia vascular, atuando na hemostasia e nas interações da parede vascular

com as células sanguíneas, em situações normais e em resposta à injúria<sup>28</sup>. A desnudação endotelial e a exposição dos componentes sub-endoteliais causam aderência leucocitária e agregação plaquetária, ativação do fibrinogênio e formação de trombo. As plaquetas ativadas liberam alguns mitógenos e fatores quimiotáticos que estimulam a migração e proliferação de células musculares lisas no sítio de injúria. Os mediadores inflamatórios e os elementos celulares contribuem para estimular uma complexa série de eventos que modulam a proliferação celular e a produção de matriz extracelular<sup>29</sup>. O grande volume da reestenose intra-stent consiste em matriz extracelular, proteoglicanas e colágeno, com as células representando apenas 11%<sup>30,31</sup>. Infere-se que, a longo prazo, pelo menos quatro fatores conduzem à hiperplasia intimal intra-stent: a lesão vascular durante o implante, a presença contínua de um corpo estranho, a tensão crônica na parede vascular e a reendotelização retardada<sup>32</sup>.

Estudos animais estabeleceram uma correlação significativa entre o grau de lesão causado pelas hastes dos stents, a espessura intimal e a reestenose intra-stent, bem como demonstraram o papel da resposta inflamatória neste processo, contrariando a idéia inicial de que nas intervenções percutâneas um maior lúmen atingido pela angioplastia diminuiria a taxa de reestenose<sup>33,34</sup>. Sendo assim, muitos trabalhos passaram a investigar o papel de terapias sistêmicas anti-inflamatórias e antiproliferativas na redução da reestenose intra-stent, atuando particularmente sobre a hiperplasia intimal, e utilizando diferentes agentes, como antitrombóticos e glicocorticóides; entretanto, nenhum efeito clínico significativo foi comprovado e alguns efeitos adversos foram observados. A falta de eficácia destes estudos clínicos pode ser em parte devido à insuficiente concentração da droga no sítio de lesão ou a falta de uma dose crônica de manutenção<sup>31</sup>.

### **1.3 Stents vasculares**

Stents vasculares são dispositivos cilíndricos que são inseridos no interior de um vaso em estado colapsado e que são liberados através de um mecanismo autoexpansível ou pela insuflação de um balão de angioplastia<sup>35</sup>.

A maioria dos stents em uso atualmente são confeccionados com ligas metálicas de aço inoxidável da série 316L ou de nitinol 605L (associação de níquel e titânio), com variadas configurações. A escolha do stent depende de vários fatores, tais como a localização anatômica e comprimento da lesão, o diâmetro do vaso, a flexibilidade do stent, a força radial, a radiopacidade, o sistema de liberação do stent, a característica da placa de ateroma e, naturalmente, a experiência do intervencionista com determinado dispositivo<sup>35,36</sup>.

Os stents confeccionados com liga de cromo e cobalto da série 605L foram desenvolvidos com o objetivo de manter a radiopacidade e a força radial sem comprometer os resultados a longo prazo observados com os stents de maior espessura como os de aço inoxidável ou nitinol. A liga de cromo e cobalto é considerada mais forte do que o aço inoxidável, permitindo a confecção de hastes mais finas com aumento da flexibilidade e semelhante visibilidade radiológica<sup>37,38</sup>. Além disso, evidências clínicas têm sugerido que as menores hastes estão associadas à menor indução de hiperplasia intimal e, portanto, melhor evolução clínica<sup>39,40</sup>.

O revestimento de stents com drogas ou polímeros surgiu com a finalidade de impedir o desenvolvimento da hiperplasia intimal, a partir da hipótese de que a liberação controlada de uma medicação por um revestimento inerte fosse capaz de evitar a re-estenose local. A tecnologia atual tem focado-se no desenvolvimento de uma plataforma de stent que não exacerbe as respostas trombóticas e inflamatórias locais, bem como na identificação de um fármaco eficiente e seguro que seja liberado desta plataforma e que possua nitidamente propriedades antireestenóticas. As ligas metálicas disponíveis para a construção de plataformas de stents incluem o aço inoxidável da série 316L, cromo-cobalto, nitinol e tantalum. Em relação às plataformas, até o momento, nenhuma demonstrou superioridade sobre outra em relação à segurança<sup>35,38,41</sup>. Servindo como uma interface entre o stent ( na maioria dos casos, uma base metálica) e o



tecido vascular, o revestimento com drogas ou polímeros funciona como um reservatório para um fármaco, oferecendo vantagens teóricas sobre a farmacoterapia sistêmica, tais como maiores concentrações do fármaco no sítio de lesão e mínimos efeitos adversos sistêmicos.

A tecnologia do revestimento baseada em polímeros tem sido utilizada na maioria dos stents revestidos disponíveis. Entretanto, os atuais polímeros não degradáveis também são considerados parcialmente responsáveis pelos eventos adversos tardios, incluindo reações de hipersensibilidade e trombose<sup>38,42</sup>.

Estudos experimentais e clínicos, avaliando stents revestidos com paclitaxel e sirolimus na circulação coronariana, demonstraram efeitos impressionantes, com redução significativa das taxas de reestenose<sup>43,44</sup>. Entretanto, alguns estudos animais têm demonstrado que ambos estão associados a uma persistente deposição de fibrina e uma reendotelização incompleta quando comparados com os stents não revestidos, achados que podem estar associados ao fenômeno da trombose tardia (trombose ocorrendo após 30 dias do implante do stent). A análise de coronárias em autópsias também tem evidenciado que nos stents farmacológicos com trombose há ausência de reendotelização completa<sup>45</sup>. Num interessante e recente trabalho publicado por Lim et al<sup>46</sup>, a sobreposição de stents revestidos com paclitaxel foi responsável por menor hiperplasia intimal do que a sobreposição de stents convencionais num modelo porcino de reestenose coronariana, mas também esteve associada a uma maior resposta inflamatória e menor endotelização local<sup>46</sup>.

Respostas inflamatórias e reações intimais exageradas também já foram demonstradas quando polímeros supostamente biocompatíveis e biodegradáveis foram impregnados em stents e implantados em artérias coronárias de suínos, gerando dúvidas sobre seu efeito a longo prazo na prevenção da reestenose<sup>47,48</sup>. Portanto, a identificação de um revestimento que iniba a proliferação de células musculares lisas mas que não suprima a proliferação e a reendotelização, restaurando a função endotelial, é um objetivo a ser alcançado na nova geração dos stents farmacológicos<sup>49</sup>.

O presente estudo procura avaliar se o revestimento de stents de cromo-cobalto com polímero Camouflage® induz uma resposta arterial diferente daquela causada pelo implante de stents de cromo-cobalto não revestidos, num modelo experimental porcino não aterosclerótico. Os parâmetros histológicos avaliados incluem: grau de endotelização, conteúdo de células musculares lisas, conteúdo de fibrina, grau de angiogênese, grau de injúria e inflamação, além da análise histomorfométrica.

## 2 OBJETIVOS

Avaliar a resposta arterial após o implante de stents balões-expansíveis de cromo-cobalto em carótidas comuns num modelo experimental porcino.

Analisar os seguintes parâmetros histológicos: grau de endotelização, conteúdo de células musculares lisas, conteúdo de fibrina, grau de angiogênese, grau de injúria e inflamação.

Analisar através da histomorfometria as áreas luminal, da lâmina elástica interna, da lâmina elástica externa, da média, da neo-íntima, das hastes dos stents e o grau de obstrução neo-intimal presente na região intra-stent de carótidas comuns.

Comparar as alterações histológicas e histomorfométricas entre os stents sem e com revestimento de polímero Camouflage®.

### 3 MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo Grupo de Pesquisa e Pós-graduação (GPPG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e o experimento foi realizado de acordo com o protocolo de anestesia animal do Centro de Pesquisa Experimental do HCPA.

O experimento foi conduzido com 9 suínos jovens, sem raça definida (Landrace X Large White), em dieta não aterosclerótica, pesando em média 20 Kg e todas as intervenções foram realizadas com o animal sob anestesia geral.

Os suínos foram pré-medicados com Cloridrato de Cetamina (15mg/kg) e Midazolam (0,5mg/kg), por via intramuscular. Após 10 minutos foi realizado o acesso venoso na veia cefálica, para administração de fluidoterapia, SF 0,9% (5ml/kg/h) conforme demonstrado na Fig. 01.

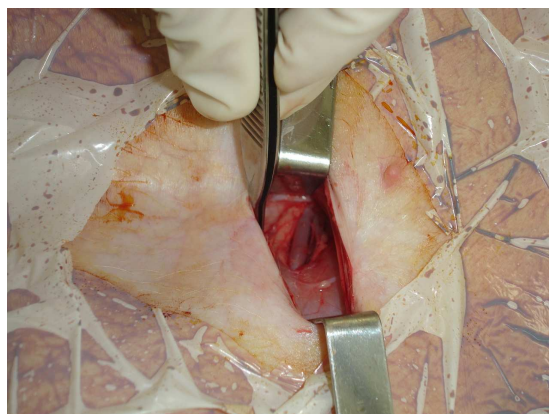


**Figura 01** – Animal sob anestesia geral e com acesso venoso através da veia cefálica esquerda.

Os animais foram pré-oxigenados durante 5 minutos, antes da indução anestésica, realizada com propofol (1mg/kg). A manutenção da anestesia geral foi realizada com infusão de propofol (0,8mg/kg/min). Para analgesia no transoperatório foi utilizado fentanil (50 mcg/kg) e bupivacaína como anestésico local (1mg/kg). No pós-operatório imediato foi aplicado cetoprofeno (2mg/kg)

por via intramuscular. Após a intubação endotraqueal os animais foram mantidos sob ventilação mecânica e propofol, com monitorização eletrocardiográfica e hemodinâmica contínua durante o procedimento.

O acesso vascular para implante do stent foi obtido através de dissecação cirúrgica da artéria femoral (Figura 02), sendo a punção arterial realizada sob visão direta com Abocath 16G.



**Figura 2** – Acesso vascular através de dissecação da artéria femoral.

Após avanço de fio-guia 0.035 hidrofílico (Terumo), 180 cm, regular, ponta angulada, foi introduzida uma bainha 6F, 90 cm, ponta radiopaca (Cordis). A bainha foi avançada sob controle fluoroscópico até a aorta torácica. Foi administrado 5000 UI de heparina (Heptar-Eurofarma) intravenosa e seletivamente canuladas as artérias carótidas direita e esquerda, utilizando-se para tal um cateter vertebral 5F 100 cm.

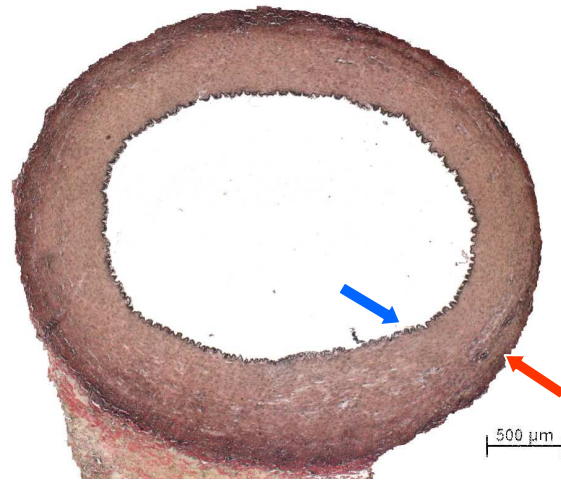
Os procedimentos cirúrgicos foram realizados com acompanhamento de médico-veterinário e enfermeira cirúrgica. Sob fluoroscopia, a artéria carótida comum foi manipulada com um fio-guia 0.035 hidrofílico e a bainha 6F avançada até a origem da mesma. Realizou-se a troca do fio-guia 0.035 por 0.014, 190 cm, e sobre este foi introduzido um stent balão-expansível 4 x 16 mm. O balão foi inflado com pressão nominal de 08 ATM durante cerca de 30 seg. e o stent liberado de forma a manter a relação stent/artéria 1,1-1,2:1,0. Após retirada do sistema de liberação do stent foi realizada angiografia de controle

para documentar a posição do stent e a perviedade da artéria carótida comum. Um total de 15 stents balões-expansíveis foram implantados. Os stents utilizados foram todos da marca Eucatech® e de mesmas dimensões 4 x 16 mm, sendo que 9 stents de cromo-cobalto (CC-Flex) foram liberados nas carótidas comuns à direita e 6 stents de cromo-cobalto com polímero (CC-Flex ProActive) nas carótidas comuns à esquerda. Nenhuma medicação ou anticoagulação pós-operatória foi utilizada; exceto medicação analgésica ao término do procedimento. Após retirada da bainha e do fio-guia, a artéria femoral comum foi suturada e a região inguinal fechada por planos. Os procedimentos cirúrgicos foram bem tolerados pelos animais, com exceção de um animal que desenvolveu hipertermia maligna e evoluiu para óbito no período transoperatório, após o implante com sucesso dos stents. Os animais foram mantidos em observação por 30 dias e posteriormente submetidos à nova reintervenção cirúrgica, com angiografia de controle, seguindo-se de eutanásia para retirada das peças anatômicas.

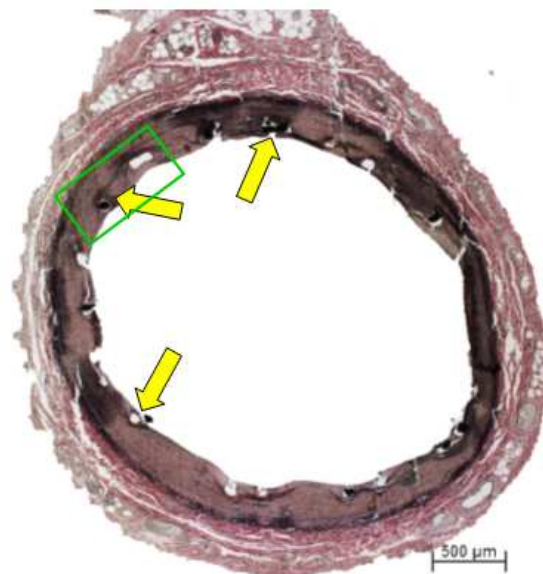
Imediatamente após o sacrifício dos animais, os segmentos de carótida foram dissecados com o mínimo de tecido circunjacente e marcados com um fio de sutura de vicryl 3.0 na extremidade proximal de cada vaso. A seguir foram depositados isoladamente em frascos rotulados e imersos com formalina neutra tamponada a 10% para fixação por > 24hs. Os segmentos arteriais foram posteriormente encaminhados para preparação e emblocamento em resina acrílica de acordo com o protocolo do Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto do Coração (Incor), Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que compreendeu as seguintes etapas: desidratação em soluções progressivas de etanol, ou seja, duas trocas com etanol a 80%, durante 1 hora; duas trocas com etanol a 96%, durante 1 hora; duas trocas com etanol absoluto, durante 1 hora; e uma última troca em etanol absoluto durante cinco horas. Em seguida, os segmentos foram incluídos em resina acrílica, onde: duas trocas com Metilmetacrilato 100% - MMA (C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>), durante 1 hora; uma com MMA 100%, durante 5 horas; 3 dias em solução A (mistura de 25% de Diisobutilftalato - C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub> com 75% de Metilmetacrilato); 3 dias em solução

1% (solução A com 1 grama de peróxido de benzoíla -  $C_{14}H_{10}O_4$ ); e 3 dias em solução 2% (solução A com 2 gramas de peróxido de benzoíla). Após essas etapas as artérias carótidas foram colocadas em “frascos moldes” com solução 2% para obtenção dos blocos. Esses frascos foram colocados a 37°C para polimerização da resina. Após a polimerização, que ocorre de 24 a 48 horas, os blocos foram preparados para microtomia. Os cortes histológicos foram obtidos utilizando-se micrótomo de impacto (Polycut S, Leica, Alemanha) equipado com navalha de tungstênio de 16 cm, tipo D (Leica, Alemanha), com 5  $\mu$ m de espessura. Tal navalha mantém as hastes dos stents intactas nas secções transversas, minimizando os artefatos potenciais causados pela retirada dos stents. Em cada artéria carótida os stents foram divididos em 3 blocos distintos: proximal, médio e distal e de cada bloco foram obtidos 2 cortes seccionais para análise microscópica. Esses cortes foram colocados em lâminas tratadas com 3-aminopropiltriétoxissilano a 2%, para aderência dos cortes. Em seguida, as lâminas foram colocadas em estufa a 37° C por cerca de 12 horas. A partir dessa etapa, os cortes histológicos foram desplastificados e corados para análise histológica com hematoxilina-eosina e para análise morfométrica com a coloração de Verhoeff-Van Gieson.

Para retirada do metacrilato solidificado no qual os cortes estavam envolvidos, esses foram banhados sequencialmente em metacrilato líquido, álcool absoluto, álcool 95° GL e água. A seguir, uma lâmina de cada segmento (proximal, médio e distal) das carótidas foi corada pela Hematoxilina e Eosina e uma pelo método de Verhoeff/ Van Giesson, para destaque do sistema elástico e portanto melhor visualização das três camadas arteriais (Figuras 3 a 5).

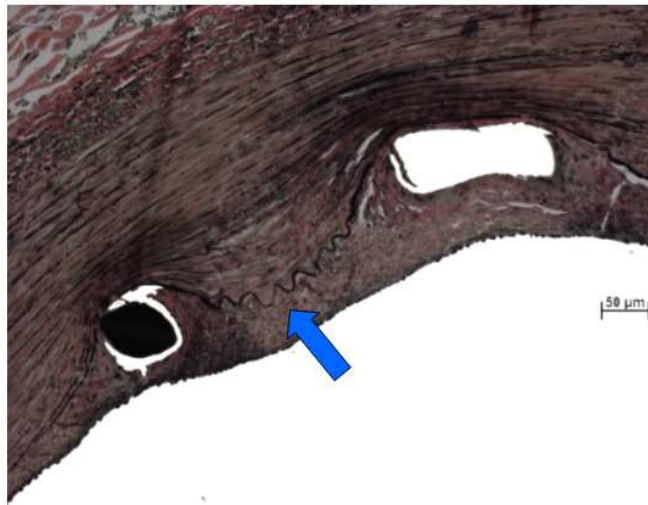


**Figura 3** – Corte histológico de artéria carótida seccionada transversalmente, mostrando em negro as fibras elásticas, que constituem as lâminas elásticas internas (seta azul) e externas (seta vermelha). Coloração pelo método de Verhoeff/ Van Gieson, aumento da objetiva 2,5x.



**Figura 4** – Corte histológico de artéria carótida seccionada transversalmente, apresentando perfis de stent (alguns indicados com setas amarelas). Coloração pelo método de Verhoeff/ Van Gieson, aumento da objetiva 2,5x.





**Figura 5** – Maior aumento da porção indicada em verde na fotografia anterior. Nota-se que o stent comprime a lâmina elástica interna (indicada por seta azul) e há formação de uma neointima (parte situada entre essa lâmina e a luz arterial). Coloração pelo método de Verhoeff/ Van Gieson, aumento da objetiva 20x.

As lâminas coradas pela hematoxilina e eosina foram usadas para avaliação qualitativa dos fragmentos. O grau de endotelização do stent, o conteúdo de células musculares lisas e o conteúdo de fibrina foram graduados de acordo com a descrição de Suzuki et al<sup>50</sup>. O grau de angiogênese foi adaptado de um consenso publicado por Schwartz e Edelman<sup>51</sup>. O grau de injúria do stent na parede vascular foi determinado por dois métodos, descritos por Schwartz e Edelman<sup>51</sup> e Gunn e et al<sup>16</sup>. O grau de inflamação também foi avaliado por dois métodos, descritos por Lowe et al<sup>52</sup> e Kornowski et al<sup>34</sup>.

As lâminas coradas pelo método de Verhoeff/Van Giesson foram utilizadas para as medidas morfométricas, as quais foram feitas através de sistema de análise digital de imagens *Quantimet 500* acoplado a microscópio *Leica*, com objetiva de 2,5x. Para cada segmento analisado, foram medidas a área da luz, a área interna às lâminas elásticas interna (correspondendo à luz que haveria em caso de inexistência de proliferação intimal) e externa (diâmetro externo do vaso) e a área que corresponde aproximadamente à ligação dos pontos mais internos dos perfis de *stent* presentes na lâmina (ou seja, área aproximada delimitada pelo stent, em caso de inexistência de proliferação intimal). Com base nesses resultados, foram calculadas as áreas de neointima (área da lâmina elástica interna menos a área da luz) e da túnica média (área da lâmina elástica externa menos a da interna). Foi também medida a área total ocupada pelos fragmentos de stent presentes no corte, bem como o grau de obstrução neointimal. As médias das espessuras da parede como um todo, da camada íntima e da camada média, nos pontos com stent e nos pontos intermediários entre estes, foram calculadas a partir das medidas de tantos quantos fossem os perfis de stent presentes em cada corte; adicionalmente, calculou-se de maneira semelhante as médias das menores distâncias entre o stent e a luz arterial e entre o stent e o limite externo do vaso (lâmina elástica externa).

A avaliação dos parâmetros histológicos e as medidas morfométricas dos cortes histológicos foram realizadas por um médico patologista com experiência em patologias arteriais, independente e cego para o tipo de stent utilizado.

A análise histológica foi baseada nos seguintes parâmetros de avaliação publicados previamente em estudos experimentais em coronárias:

1. Grau de endotelização do stent<sup>50</sup>

- a) Grau 1: <25% da circunferência da luz arterial recoberta por céls endoteliais.
- b) Grau 2: 25-75% da circunferência da luz arterial recoberta por céls endoteliais.
- c) Grau 3: >75% da circunferência da luz arterial recoberta por céls endoteliais.

2. Conteúdo de células musculares lisas da íntima<sup>50</sup>

- a) Grau 1: Densidade de CML esparsa envolvendo qualquer porção da artéria OU qualquer infiltração de CML moderada menor que a espessura total da neointima envolvendo < 25% da circunferência da artéria.
- b) Grau 2: Infiltração de CML moderada menor que a espessura total da neointimal envolvendo > 25% da circunferência da artéria OU infiltração acentuada de CML em toda a espessura da neointima envolvendo <25% da circunferência da artéria.
- c) Grau 3: Infiltração densa de CML em toda a espessura da neointima envolvendo > 25% da circunferência da artéria.

3. Conteúdo de fibrina da íntima<sup>50</sup>

- a) Grau 0: Ausente.
- b) Grau 1: Focos de fibrina residual envolvendo qualquer porção da artéria OU deposição moderada de fibrina adjacente as hastes envolvendo < 25% da circunferência da artéria.
- c) Grau 2: Deposição moderada de fibrina envolvendo >25% da circunferência da artéria OU deposição acentuada envolvendo < 25% da circunferência da artéria.
- d) Grau 3: Deposição acentuada envolvendo >25% da circunferência da artéria.

4. Angiogênese<sup>51</sup>

- a) Grau 0: Ausente.
- b) Grau 1: Focos de angiogênese envolvendo qualquer porção da artéria OU adjacente as hastes do stent e envolvendo < 25% da circunferência da artéria.
- c) Grau 2: Angiogênese moderada envolvendo 25-50% da circunferência da artéria.

- d) Grau 3: Angiogênese acentuada envolvendo >50% da circunferência da artéria.

5. Grau de injúria (Método de Schwartz et al)<sup>51</sup>

- a) Grau 0: Lâmina elástica interna intacta; endotélio tipicamente desnudado; média comprimida, porém não lacerada.
- b) Grau 1: Lâmina elástica interna lacerada; média tipicamente comprimida, mas não lacerada.
- c) Grau 2: Lâmina elástica interna lacerada; média visivelmente lacerada; lâmina elástica externa intacta, porém comprimida.
- d) Grau 3: Lâmina elástica externa lacerada; tipicamente grandes lacerações da média se estendendo até a lâmina elástica externa; hastes do stent por vezes localizadas na adventícia.

6. Grau de injúria (Método de Gunn et al)<sup>16</sup>

- a) Grau 0: Sem deformação.
- b) Grau 1: Lâmina elástica interna deformada < 45°.
- c) Grau 2: Lâmina elástica interna deformada > 45°.
- d) Grau 3: Lâmina elástica interna rota.
- e) Grau 4: Lâmina elástica externa rota.

7. Grau de inflamação (Método de Lowe et al)<sup>52</sup>

- a) Grau 0: Ausente.
- b) Grau 1: Células inflamatórias esparsas.
- c) Grau 2: Células inflamatórias ao redor de 50% da haste do stent em pelo menos 25% a 50% da circunferência da artéria.
- d) Grau 3: Células inflamatórias envolvendo totalmente a haste do stent em pelo menos 25% a 50% da circunferência da artéria.

8. Grau de inflamação (Método de Kornowski et al)<sup>34</sup>

- a) Grau 0: ausência de células inflamatórias ao redor das hastes.
- b) Grau 1: Infiltrado celular leve, não circunferencial, localizado à haste do stent.
- c) Grau 2: Infiltrado celular moderado, não circunferencial, localizado à haste do stent.
- d) Grau 3: Infiltrado celular denso, circunferencial.

O grau de cada secção histológica corresponde a uma média considerando a análise de todas as hastes individuais.

A análise histomorfométrica<sup>34,51</sup> incluiu a avaliação dos seguintes parâmetros :

1. Área luminal.
2. Área da lâmina elástica interna.
3. Área da lâmina elástica externa.
4. Área total do stent.
5. Área de neointima.
6. Área da média.
7. Espessura de neointima inter-hastes.
8. Espessura de neointima sobre as hastes.
9. Obstrução neointimal.

### **3.1 Design dos stents**

Os stents de cromo-cobalto utilizados no experimento são fabricados pela empresa Eucatech (Alemanha) e confeccionados para uso coronariano, do tipo balão-expansível, sendo compatíveis com cateter-guia 5F.

O stent CC Flex apresenta um design de células abertas conectado com 3 interlink por segmento, com 9 elementos em zig-zag por segmento de anel.

O stent CC Flex Proactive apresenta um design de células abertas conectado com 3 interlink por segmento, com 9 coroas por segmento de anel. O revestimento Camouflage® é uma heparina modificada que simula o glicocálix endotelial formando uma camada permanente de 100 nm de espessura.

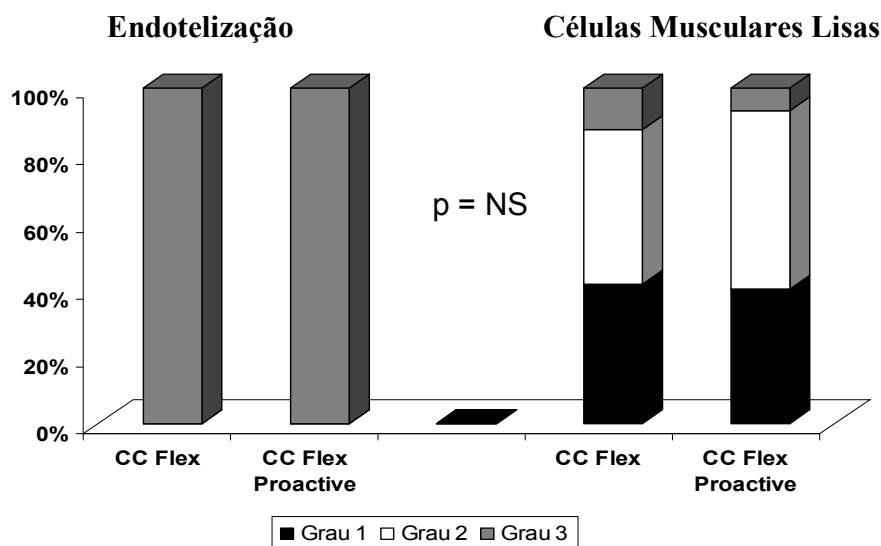
### **3.2 Análise Estatística**

Os dados foram apresentados como média +/- desvio padrão (DP). As comparações entre os grupos foram realizadas através do teste U de Mann-Whitney e do teste T de Student, respectivamente, para os dados histológicos e histomorfométricos. Para medida de intensidade de associação entre os dados histológicos foi utilizado o teste de correlação de Spearman e entre os dados histológicos e histomorfométricos foi realizado o teste de análise de variância (ANOVA). Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa Statistical Package for Social Sciences (SPSS, versão 16.0), com nível de significância de 0,05.

## 4 RESULTADOS

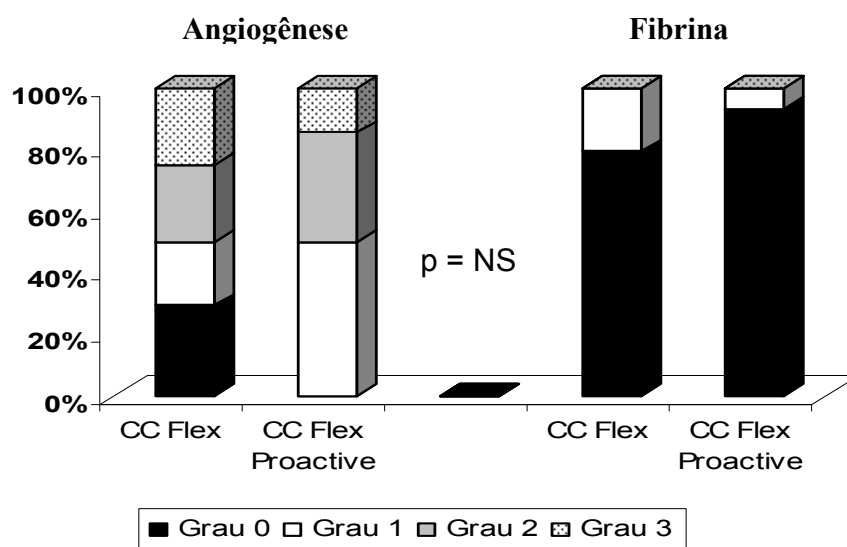
Noves animais foram submetidos ao implante com sucesso dos stents, sem dificuldade técnica, não se observando nenhuma intercorrência como dissecação parietal, migração ou expansão inadequada do stent. Um animal foi excluído da análise devido a óbito transoperatório em decorrência de hipertermia maligna. Após 30 dias, os demais animais (n=8) encontravam-se saudáveis e todos os stents estavam pérvios, sendo avaliados 8 stents CC Flex e 5 stents CC Flex Proactive.

A análise dos cortes histológicos revelou endotelização significativa (Grau 3) em todos os stents, independentemente do segmento do stent avaliado (proximal, médio ou distal) ou do tipo de stent utilizado (CC Flex ou CC Flex Proactive). Observou-se também leve a moderada infiltração de células musculares lisas na íntima, de distribuição semelhante em ambos os grupos (p=0,921).



**Gráfico 1** – Distribuição dos Graus de Endotelização nos grupos de tratamento (CC Flex x CC Flex Proactive).

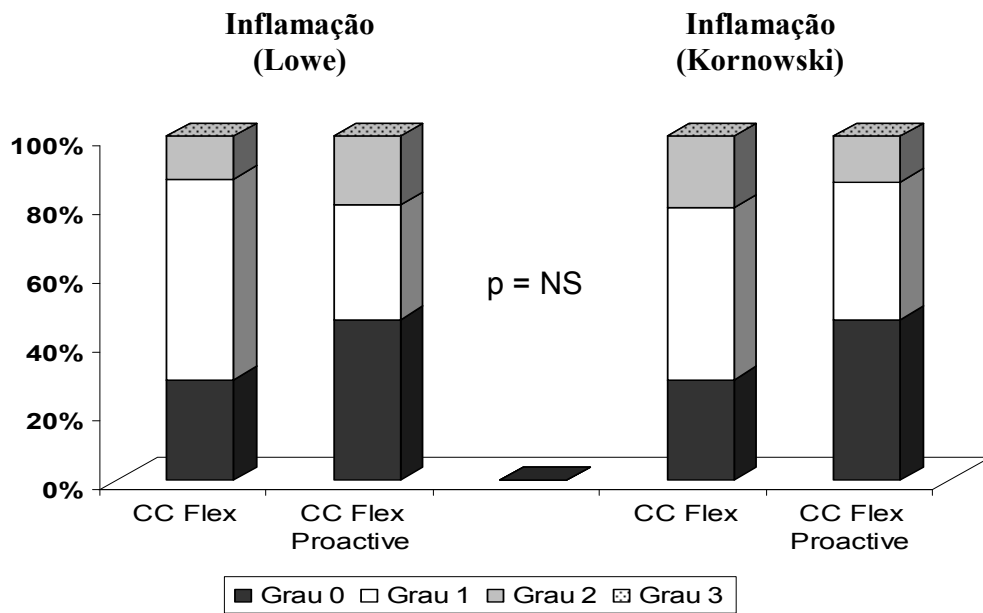
Em relação à angiogênese e deposição de fibrina também se evidenciou uma distribuição semelhante entre os grupos, com baixo grau de angiogênese em cerca de 50% dos segmentos avaliados e ausência completa de deposição de fibrina em pelo menos 80% da amostra, conforme observado no gráfico 2.



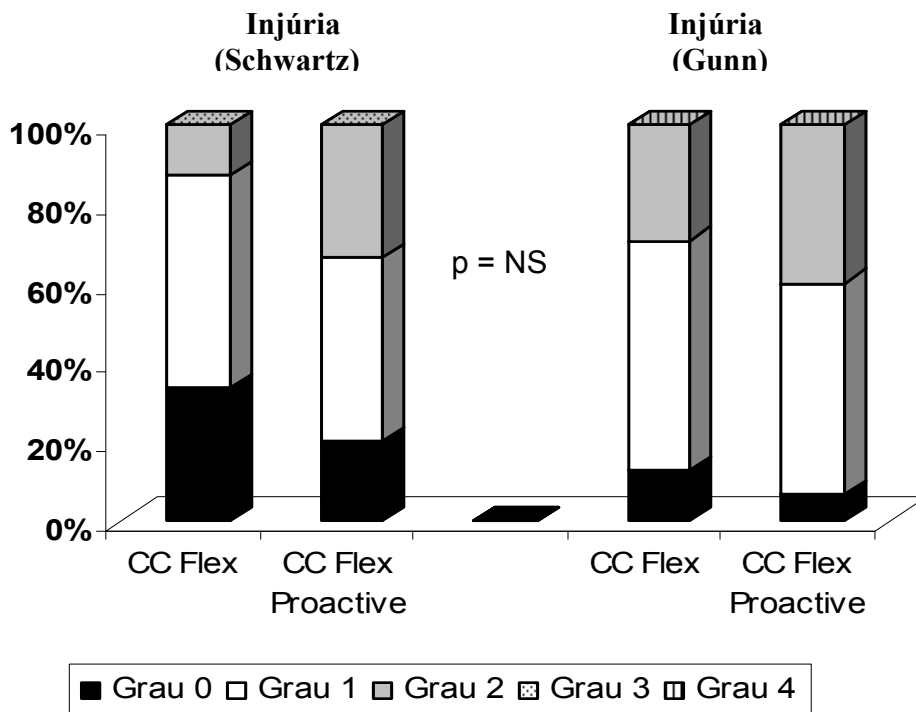
**Gráfico 2** – Distribuição dos Graus de Angiogênese e Deposição de Fibrina nos grupos CC Flex e CC Flex Proactive.

A resposta inflamatória e o grau de injúria relacionado às hastes dos stents foram avaliados, respectivamente, por dois métodos validados em estudos de coronárias. Identificou-se um leve infiltrado inflamatório e um discreto a moderado grau de injúria na parede arterial, semelhante entre os grupos e entre os segmentos avaliados. Não se observou correlação entre resposta inflamatória e injúria, ou entre esses parâmetros e a área neointimal.





**Gráfico 3** - Distribuição dos Graus de Inflamação nos grupos CC Flex e CC Flex Proactive pelos métodos de Lowe et al. e Kornowski et al.



**Gráficos 4** - Distribuição dos Graus de Injúria nos grupos CC Flex e CC Flex Proactive pelos métodos de Schwartz et al. e Gunn et al.

Em relação as medidas histomorfométricas também se observou que as áreas luminiais, neointimais e mediais calculadas não foram estatisticamente diferentes entre os dois grupos de stents. O grau de obstrução neointimal no período de 30 dias foi pequeno (CC Flex: 15,1% +/- 8,38 e CC Flex Proactive: 15,8% +/-5,39) e também não se evidenciou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,785$ ). O gráfico 5 lista todas as medidas histomorfométricas realizadas, não se observando diferenças significativas entre os grupos.

<b>Dados Histomorfométricos após 30 dias</b>	<b>CC Flex</b>	<b>CC Flex Proactive</b>	<b>p</b>
Área luminal (mm <sup>2</sup> )	5,39 ± 2,54	4,12 ± 1,54	,102
Área da LEI (mm <sup>2</sup> )	6,25 ± 2,66	4,93 ± 2,02	,117
Área da LEE (mm <sup>2</sup> )	9,78 ± 3,43	7,87 ± 2,41	,076
Área total do stent (mm <sup>2</sup> )	0,10 ± 0,05	0,09 ± 0,04	,555
Área de neointima (mm <sup>2</sup> )	0,86 ± 0,43	0,80 ± 0,65	,731
Área da média (mm <sup>2</sup> )	3,52 ± 1,29	2,94 ± 0,60	,122
Espessura da neointima inter-hastes (mm)	0,11 ± 0,065	0,09 ± 0,067	,424
Espessura da neointima Sobre a haste (mm)	0,17 ± 0,062	0,14 ± 0,063	,166
Obstrução neo-intimal (%)	15,1 ± 8,38	15,8 ± 5,39	,785

LEI = lâmina elástica interna; LEE = lâmina elástica externa.

Números são médias (desvio padrão). Teste T de amostras independentes

Fonte: Dados da pesquisa.

**Gráfico 5** - Lista de todas as medidas histomorfométricas realizadas.

## 5 DISCUSSÃO

A crescente utilização da terapia endovascular no tratamento da doença arterial periférica, em particular com a difundida utilização de stents, tem sido associada a um maior número de relatos sobre tentativas de prevenção e tratamento da principal complicação dessa tecnologia médica, a reestenose intra-stent.

A reestenose é uma realidade frequente no seguimento dos pacientes submetidos a intervenções percutâneas coronárias ou periféricas. O uso de stents no leito coronariano tem sido acompanhado de uma redução nas taxas de reestenose e necessidade de nova revascularização quando comparado com a angioplastia isoladamente. Entretanto, a longo prazo, a eficácia do uso do stent também tem sido limitada pela necessidade de repetida revascularização devido à reestenose intra-stent<sup>53</sup>. Os stents revestidos com drogas surgiram como alternativa para impedir a re-estenose intra-stent e vem-se mostrando superiores aos stents convencionais<sup>54</sup>, mas os relatos de trombose tardia no leito coronariano levantaram questões sobre a sua eficácia a longo prazo<sup>55</sup>. No sistema arterial periférico, o uso de stents revestidos com drogas ou polímeros ainda é considerado investigacional pela ausência de estudos clínicos comparativos demonstrando sua superioridade em relação aos stents convencionais<sup>56</sup>.

Em nosso estudo, um modelo porcino carotídeo foi utilizado para testar se stents de cromo-cobalto com revestimento de polímero Camouflage® diminuiriam a hiperplasia intimal. Como todos os polímeros atuais induzem algum grau de resposta inflamatória, o teste de stents revestidos em estudos experimentais devem incluir uma avaliação da resposta inflamatória local. Dentre os métodos mais frequentemente utilizados destaca-se o descrito por Kornowski R et al<sup>34</sup> e Lowe et al<sup>52</sup>, ambos utilizados em nosso trabalho.

Estudos histológicos comparativos em modelos pré-clínicos são os métodos mais efetivos para se avaliar as respostas arteriais ao implante de stents,

já que a sequência de eventos biológicos de reparo arterial é considerada muito semelhante com o humano. Com o objetivo de padronizar a avaliação de Stents em estudos pré-clínicos, Schwartz RS et al<sup>51</sup> publicaram em 2002 um consenso com recomendações e critérios para a avaliação de stents recobertos em modelos animais<sup>51</sup>.

O conhecimento atual sobre a reação arterial ao implante de stents ainda é incompleto, principalmente pelas limitações técnicas inerentes à análise histológica dos tecidos arteriais contendo os dispositivos metálicos. Os métodos convencionais de fixação em parafina e secção tecidual são considerados inadequados, uma vez que a maioria deles necessita a completa remoção do stent implantado durante o preparo da peça, o que acarreta na destruição da parede arterial e particularmente da interface stent-artéria. Além disso, a maioria dos laboratórios de patologia não é equipada adequadamente ou não tem experiência suficiente para o manejo de tecidos biológicos contendo próteses metálicas, o que limita significativamente a avaliação desses dispositivos<sup>57</sup>.

Atualmente, para se estudar a resposta vascular ao implante de stent emprega-se para fixação algumas das formulações de resinas de metacrilato. As resinas mais frequentemente utilizadas são glicolmetacrilato, metilmetacrilato e combinações de metilmetacrilato e n-butylmetacrilato, que mantêm a atividade enzimática e a antigenicidade proteica dos tecidos, permitindo a análise histoquímica, imunohistoquímica e por microscopia eletrônica de transmissão<sup>58</sup>.

Neste trabalho a metodologia empregada na preparação e realização dos cortes histológicos das artérias carótidas com stent foi adaptada da metodologia normalmente utilizada para o estudo e diagnóstico de doenças ósseas metabólicas em tecido ósseo calcificado, com algumas modificações. A mesma técnica de preparo das peças tem sido utilizada em nosso meio para a análise de artérias coronárias contendo stents<sup>4</sup>. Nós observamos que, no método de impregnação pela resina acrílica, o bloco obtido para as artérias carótidas é de boa qualidade. A maior dificuldade, como previamente descrito, está na obtenção dos cortes histológicos de segmentos arteriais contendo stent. Os stents mantidos “in situ” nos cortes histológicos minimizam os artefatos potenciais causados pela remoção

das hastes dos stents. A resina acrílica utilizada tanto na obtenção de cortes histológicos de tecido ósseo calcificado quanto das artérias carótidas com stent é utilizada como um “suporte” com um determinado nível de dureza. A dureza da resina acrílica e a robustez oferecida pelo micrótomo de impacto são os fatores determinantes para a obtenção de cortes íntegros para posterior análise. O micrótomo utilizado com navalha de tungstênio permite cortes finos e adequados para a avaliação histológica proposta. Deve-se ressaltar que, sendo um metal, o material do stent em contato com a navalha de tungstênio acaba provocando uma quantidade de “dentes” muito frequente, diminuindo o seu tempo de utilização. Por ser uma navalha com angulação precisa de 40°, e não dispormos dessa tecnologia no Brasil, a navalha é encaminhada periodicamente para a Leica na Alemanha. Entretanto, até o presente momento, foi possível obter-se cortes histológicos de todas as artérias carótidas estudadas, com poucas repetições.

O conhecimento atual sobre a hiperplasia intimal e a reestenose é decorrente de estudos em modelos experimentais e na comparação com materiais humanos, que na imensa maioria são derivados de autópsias. Os modelos experimentais mais frequentemente utilizados para o estudo da reestenose envolvem o implante de stents em artérias coronárias de suínos ou em artérias ilíacas de coelhos, apesar de já terem sido testados modelos com implante de stents em ratos, camundongos, cães e primatas em várias localizações arteriais<sup>31,59</sup>.

Grande número de estudos experimentais sugerem que o tamanho, a via de acesso e a resposta à injúria em artérias coronárias de suínos e em artérias ilíacas de coelhos submetidas ao implante de stents sejam similares às coronárias humanas e, portanto, adequadas para a análise desses dispositivos<sup>51</sup>. Por outro lado, alguns estudos também tem demonstrado que artérias de localizações anatômicas diferentes apresentam resposta vascular à injúria diferentes. Em modelo porcino, um maior grau de hiperplasia intimal foi observado após 5 semanas em artérias coronárias em relação às artérias ilíacas internas após o implante de stent<sup>60</sup>. Entretanto, Dubé et al<sup>61</sup> observaram após 6 meses, maior hiperplasia intimal e reestenose intra-stent em artérias femorais de suínos

submetidas ao implante de stents balões expansíveis revestidos com fosforilcolina em relação às artérias coronárias<sup>61</sup>. As diferenças de tamanho, as bifurcações, a elasticidade e as curvaturas que afetam o fluxo sanguíneo através de determinada artéria, o maior conteúdo de células musculares lisas em artérias periféricas, assim como o ciclo cardíaco que mantém o fluxo sanguíneo na diástole nas coronárias e na sístole nas artérias periféricas são todos implicados nessa diferença de resposta vascular<sup>60,61</sup>. Tais diferenças justificam a realização de estudos em artérias diferentes e sua comparação, para um melhor entendimento do processo de reestenose. Na circulação carotídea extracraniana existem relatos esporádicos de estudos experimentais envolvendo o implante de stents, mesmo sendo o procedimento considerado tecnicamente simples e de baixa morbidade<sup>47,62</sup>. Acreditamos que o modelo desenvolvido em carótida extracraniana de suíno mostrou-se adequado por duas razões. Além de permitir a pesquisa envolvendo stents com medicação no leito periférico, o modelo serve como alternativa para treinamento em técnicas de cateterismo seletivo, angioplastia e implante de stents.

É importante considerarmos que o termo reestenose em estudos animais na verdade se refere ao espessamento intimal resultante da injúria controlada que é induzida em artérias normais<sup>59</sup>. Os modelos atuais utilizam a lesão por cateter-balão ou o implante de stent, já que o modelo aterosclerótico animal não existe. Neste sentido, os modelos animais que envolvem dupla lesão (cateter-balão + stent), apesar de biologicamente interessantes, pois simulam muitas condições reais na prática clínica, oferecem uma variabilidade muito grande de resposta intimal e são desaconselháveis<sup>51</sup>.

A hiperplasia intimal é um processo decorrente tanto da injúria vascular causada pela penetração das hastes do stent na parede vascular quanto de fatores hemodinâmicos locais como a recirculação, áreas de separação de fluxo e gradientes de força de cisalhamento na parede vascular<sup>63</sup>. Em artérias ilíacas de suínos, Sullivan et al<sup>64</sup> observaram que a manutenção de uma lâmina elástica interna intacta é um fator importante na prevenção da hiperplasia intimal e que a geometria ou a espessura das hastes do stent pode estar relacionada a uma

resposta proliferativa local exagerada, se estiver associada à fratura da lâmina elástica interna, questionando o habitual oversizing de 10% realizado nos procedimentos de ATP e implante de stent<sup>64</sup>. Por outro lado, Kirsch et al<sup>17</sup> não observaram correlação entre a maior força radial causada por oversizing de até 40% em stents auto-expansíveis e a hiperplasia intimal em artérias carótidas num modelo canino<sup>62</sup>. Schwartz RS et al<sup>33,65</sup> estabeleceram uma correlação significativa entre o grau de injúria arterial causado pelo stent e a resultante hiperplasia intimal em coronárias de suínos<sup>33,65</sup>, sugerindo um escore de injúria que vem sendo frequentemente utilizado em estudos sobre reestenose. No presente estudo o grau de injúria causado pelas hastes dos stents foi avaliado por dois métodos, e os achados foram semelhantes entre os dois grupos de tratamento, assim como os demais parâmetros como endotelização, conteúdo de fibrina, conteúdo de células musculares lisas e angiogênese.

Kornowski et al<sup>34</sup> demonstraram o importante papel da resposta inflamatória e a sua correlação com a injúria arterial neste processo, validando um escore de inflamação e sugerindo que abordagens anti-inflamatórias poderiam ser de valor na redução da reestenose<sup>34</sup>. Em nosso estudo, os graus de inflamação foram os mesmos utilizados por Kornowski et al<sup>34</sup> e por Lowe et al<sup>52</sup>. Entretanto, não utilizamos o escore exatamente como descrito por esses autores, que consideram uma média após a análise dos graus de cada haste individual. Em nosso trabalho o grau final de cada variável histológica foi baseado numa avaliação global do corte histológico. Com essa avaliação, não observamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos no que se refere a esses parâmetros histológicos.

Tepe et al<sup>47</sup> avaliaram com ultrassom intravascular o espessamento intimal após o implante de stents autoexpansíveis recobertos com sirolimus em carótidas de suínos e observaram quase ausência de neointima no grupo que recebeu stent farmacológico. Esses autores identificaram uma alta incidência de trombose em ambos os grupos avaliados, fato que relacionaram com a inadequada inibição plaquetária pós-intervenção<sup>47</sup>. Em nosso estudo, não observamos nenhuma trombose aguda ou subaguda, o que sugere que nesse

modelo animal a não utilização de antiplaquetário não parece estar associada à trombose. Mesmo na literatura experimental, vários regimes medicamentosos com e sem antiagregantes plaquetários têm sido utilizados com resultados igualmente controversos<sup>47,62,64</sup>.

Inúmeros trabalhos experimentais têm sido conduzidos nos últimos anos com o objetivo de se encontrar o stent farmacológico ideal. Suzuki et al<sup>50</sup> compararam stents revestidos com sirolumis e sirolimus + dexametasona versus stents não farmacológicos em coronárias de suínos e observaram 50% de redução na área neointimal dos stents revestidos com sirolimus em relação aos stents não farmacológicos, sem um efeito significativo de redução nos stents revestidos com dexametasona<sup>50</sup>.

Heldman et al<sup>66</sup> observaram uma significativa inibição da hiperplasia intimal em artérias coronárias em 30 dias após o implante de stents revestidos com paclitaxel, sendo a inibição dose dependente<sup>66</sup>.

Em um modelo experimental de artérias ilíacas de coelhos, Yang et al<sup>67</sup> demonstraram significativa redução da hiperplasia intimal em stents revestidos com trióxido de arsênico, uma potente droga antineoplásica que inibe a proliferação celular e induz a apoptose de células musculares lisas<sup>67</sup>.

Miyauchi et al<sup>49</sup> também demonstraram significativa redução da hiperplasia intimal e da resposta inflamatória inicial em stents revestidos com cerivastatina, sugerindo uma eficácia semelhante aos estudos com sirolimus e paclitaxel em coronárias de suínos<sup>49</sup>.

Por outro lado, Zhang et al<sup>68</sup> em modelo porcino diabético observaram maior grau de reestenose intra-stent em coronárias em 6 meses após o implante de stents revestidos com sirolimus, e consideraram o achado, em parte, relacionado à resposta inflamatória exacerbada e mantida do vaso diabético<sup>68</sup>.

Em nosso trabalho, o uso de stent revestido com polímero Camouflage® não foi associado à redução na hiperplasia intimal, mas, por outro lado, também não resultou em maior retardo na endotelização ou maior resposta inflamatória local, achados esses frequentemente relacionados ao fenômeno da trombose tardia.



Algumas limitações desse estudo devem ser mencionadas. Primeiro, como o experimento foi realizado em animais saudáveis e sob dieta não aterogênica, a extrapolação dos resultados para humanos tem limitações, uma vez que não havia lesão estenótica ou oclusão preexistente relacionada a presença de placa aterosclerótica. Por outro lado, como observado por França et al<sup>69</sup>, a dieta aterogênica parece não estar associada a uma maior hiperplasia intimal, pelo menos a curto prazo, em modelo suíno não coronariano<sup>69</sup>. Está bem definido que o pico de hiperplasia intimal varia entre as espécies, sendo de 28 dias em coronárias de suínos e de 6-12 meses em humanos<sup>70</sup>. Como o objetivo era avaliar a resposta da parede vascular a dois stents, cuja única diferença era o revestimento com polímero, o modelo animal foi considerado adequado. O modelo animal suíno apresenta a vantagem da semelhança com o humano em relação ao perfil lipídico e à resposta vascular à injúria<sup>25</sup>.

Segundo, nesse estudo, as artérias carótidas não foram submetidas a pré-dilatação com cateter-balão, situação que melhor se assemelha à prática clínica, e que, por si só, pode ser um fator adicional de hiperplasia intimal após o implante de stent. Entretanto, a atual metodologia se justifica porque a intenção era estudar a resposta intimal induzida apenas pela presença do stent, excluindo a resposta parietal provocada pelo maior trauma secundário à angioplastia. Terceiro, os animais utilizados estão em fase de rápido crescimento, situação que também pode estar associada a uma maior resposta proliferativa local. Quarto, os stents atualmente utilizados no tratamento tanto da doença carotídea aterosclerótica quanto da doença arterial periférica são preferencialmente do tipo auto-expansíveis, com teoricamente maior flexibilidade e menor força radial e, portanto, provavelmente menos indutores de resposta vascular local. Quinto, o fato de que em 30 dias o processo de resposta vascular tenha sido semelhante em ambos os grupos experimentais pode sinalizar que este período curto de observação não seja adequado para a avaliação de stents revestidos, fato também já sugerido em alguns estudos experimentais mais recentes. A deposição e a organização da matriz extracelular é o maior componente da massa tecidual da hiperplasia intimal. As alterações da matriz extracelular continuam a ocorrer

mesmo após encerrada a fase proliferativa e de migração de células musculares lisas e é uma etapa ainda muito obscura no processo de hiperplasia intimal. Entretanto, considerando-se a inexistência de um modelo animal idêntico à placa aterosclerótica humana, a utilização de modelos alternativos para pesquisa é aceitável. Certamente, estudos experimentais de longo prazo são necessários para se avaliar se os efeitos do polímero são benéficos e duráveis.

Este é o primeiro relato de um estudo experimental comparando stents balões-expansíveis de cromo-cobalto sem e com polímero em artérias carótidas de suínos. É, também, em nosso meio, o primeiro estudo a avaliar a reestenose intra-stent em artérias periféricas utilizando-se micrótomo específico para corte de dispositivos metálicos, minimizando os artefatos decorrentes da retirada dos stents. No presente estudo nós realizamos a avaliação histológica através de uma metodologia mais abrangente que incluiu a análise de variáveis qualitativas e quantitativas.

Apesar de não observarmos efeito de inibição da hiperplasia intimal com os stents revestidos com polímero, estudos de maior seguimento podem contribuir para uma melhor interpretação dos resultados.

## **6 CONCLUSÃO**

Os achados deste estudo experimental sugerem que o uso de stents de cromo-cobalto, balões-expansíveis e revestidos com polímero Camouflage® em artérias carótidas de suínos parece estar associado, pelo menos no curto prazo, a uma resposta histológica semelhante aquela encontrada após o implante de stents de cromo-cobalto não revestidos. Neste período não se observou uma menor hiperplasia intimal em virtude do revestimento de polímero.

## REFERÊNCIAS

1. Andrade JL, Castilho LGSI, Van Bellen B. Impacto da cirurgia endovascular sobre a cirurgia arterial convencional. *Rev. Col. Bras. Cir.* 2005 jan./fev.;32(1):2-5
2. Schanzer A, Steppacher R, Eslami M, Arous E, Messina L, Belkin M. Vascular surgery training trends from 2001-2007: a substantial increase in total procedure volume is driven by escalating endovascular procedure volume and stable open procedure volume. *J Vasc Surg* 2009 May;49(5):1339-44.
3. White CJ, Gray WA. Endovascular therapies for peripheral arterial disease an evidence-based review. *Circulation* 2007;116:2203-2215.
4. Lemos PA, Laurindo FRM, Morato SP, Takimura C, Campos CA, Gutierrez OS, et al. Stent coronário de liga cobalto-cromo concebido no Brasil: achados histológicos preliminares em modelo experimental porcino. *Rev Bras Cardiol Invas* 2007;15(4): 378-385.
5. Rowe VL, Lee W, Weaver FA, Etzioni D. Patterns of treatment for peripheral arterial disease in the United States: 1996-2005. *J Vasc Surg* 2009;49:910-917.
6. Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzner NR, Bakal CW, Creager MA, Halperin JL, et al. ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease): endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation. *Circulation* 2006 Mar;113(11):e463-654.
7. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg* 2007 Jan;45(Suppl S):S5-67.

8. Willians DO, Holubkov R, Yeh W, Bourassa MG, Al-Bassam M, Block PC, et al. Percutaneous coronary interventions in the current era compared with 1985-1986: the National Heart, Lung, and Blood Institute Registries. *Circulation* 2000;102:2945-2951.
9. Dosluoglu HH, Cherr GS, Lall P, Harris LM, Dryjski ML. Stenting vs above knee polytetrafluoroethylene bypass for TransAtlantic Inter-Society Consensus-II C and D superficial femoral artery disease. *J Vasc Surg* 2008 Nov;48(5):1166-74.
10. Kudo T, Chandra FA, Ahn SS. Long-term outcomes and predictors of iliac angioplasty with selective stenting. *J Vasc Surg* 2005 Sep;42(3):466-75.
- 11- Saxon R, Dake M, Volgelzan R, Katzen, B, Becker G. Randomized, multicenter study comparing expanded polytetrafluoroethylene-covered endoprosthesis placement with percutaneous transluminal angioplasty in the treatment of superficial femoral artery occlusive disease. *J Vasc Interv Radiol* 2008 Jun;19(6):823-32.
12. Schillinger M, Sabeti S, Loewe C, Dick P, Amighi J, Mlekusch W, et al. Balloon angioplasty versus implantation of nitinol stents in the superficial femoral artery. *N Engl J Med* 2006;354:1879 –1888.
13. Krankenberg H, Schlüter M, Steinkamp HJ, Burgelin K, Scheinert D, Schulte KL, et al. Nitinol Stent Implantation Versus Percutaneous Transluminal Angioplasty in Superficial Femoral Artery Lesions up to 10 cm in Length The Femoral Artery Stenting Trial (FAST). *Circulation* 2007;116:285-292.
14. Sixt S, Alawied AK, Rastan, Schwarzwald U, Kleim M, Noory E, et al. A Acute and long-term outcome of endovascular therapy for aortoiliac occlusive lesions stratified according to the TASC classification: a single-center experience. *J Endovasc Ther* 2008 Aug;15(4):408-16.
15. McQuade K, Gable D, Hohman S, Pearl G, Theune B. Randomized comparison of ePTFE/nitinol self-expanding stent graft vs prosthetic femoral-popliteal bypass in the treatment of superficial femoral artery occlusive disease. *J Vasc Surg* 2009 Jan;49(1):109-15.
16. Gunn J, Arnold N, Chan KH, Shepherd L, Cumberland DC, Crossman DC. Coronary artery stretch versus deep injury in the development of in-stent neointima. *Heart* 2002;88:401-5.

17. Sigwart U, Puel J, Mirkovitch V, Joffre F, Kappenberger L. Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty. *N Engl J Med* 1987;316:701-6.
18. Golledge J, Campbell JH. Local Therapy for Restenosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005;30:571-572.
19. Mitra AK, Agrawal DK. In stent restenosis: bane of the stent era. *J Clin Pathol* 2006;59:232-239.
20. Lowe HC, Oesterle SN, Khachigian LM. Coronary in-stent restenosis: Current status and future strategies. *J Am Coll Cardiol* 2002;39(2):183-193.
21. Duda SH, Bosiers M, Lammer J, et al. Sirolimus-eluting versus bare nitinol stent for obstructive superficial femoral artery disease: the SIROCCO II trial. *J Vasc Interv Radiol*. 2005 Mar;16(3):331-8.
22. Duda SH, Bosiers M, Lammer J, Scheinert D, Zeller T, Tielbeek A, et al. Drug-eluting and bare nitinol stents for the treatment of atherosclerotic lesions in the superficial femoral artery: long-term results from the SIROCCO trial. *J Endovasc Ther* 2006 Dec;13(6):701-10.
23. Post MJ, de Smet BJ, Van der Helm YJ, Kuntz RE. Arterial remodeling contributes to restenosis after angioplasty, but is Prevented by stenting in the atherosclerotic micropig. *J Am Coll Cardiol*, 1995;25(2):303A.
24. Post MJ, Borst C, Pasterkamp G, Haudenschild CC. Arterial remodeling in atherosclerosis and restenosis: a vague concept of a distinct phenomenon. *Atherosclerosis*,1995 Dec;118(Suppl):S115-123.
25. Narayanaswamy M, Wright KC, Kandarpa K. Animal Models for Atherosclerosis, Restenosis, and Endovascular Graft Research. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 2000;11:5-17.
26. Versaci F, Gasparone A. Prevention of restenosis after stenting: the emerging role of inflammation. *Coron Artery Dis* 2004 Sep;15(6):307-11.
27. Pries AR, Secomb TW, Gaetgens P. The endothelial surface layer. *Pflugers Arch* 2000;440:653-666.

28. Constantinescu AA, Vink H, Spaan JA. Endothelial cell glycocalyx modulates immobilization of leukocytes at the endothelial surface. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1541-7.
29. Mulivor AW, Lipowsky HH. Role of glycocalyx in leukocyte-endothelial cell adhesion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:1282–1291.
30. Htay T, Liu MW. Drug-eluting stent: a review and update. *Vascular Health and Risk Management* 2005;1(4):263–276.
31. Fattori R, Piva T. Drug-eluting stents in vascular intervention. *Lancet* 2003; 361:247-49.
32. Edelman ER, Rogers C. Hoop dreams: stents without restenosis. *Circulation* 1996;(94):1199-202.
33. Schwartz RS, Huber KC, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vlietstra RS, et al. Restenosis and proportional neointimal response to coronary artery injury: Results in a porcine model. *J Am Coll Cardiol* 1992;19:267-274.
34. Kornowski R, Hong MK, Tio FO, Bramwel O, Wu H, Leon MB. In-stent restenosis: Contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:224-230.
35. Burt HM, Hunter WL. Drug-eluting stents: a multidisciplinary success story. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2006;58:350-357.
36. Henry M, Klonaris C, Amor M, Tzvetanovv K. Which Stent for Which Lesion in Peripheral Interventions? *Tex Heart Inst J* 2000;27:119-26.
37. Kereiales DJ, Cox DA, Hermiller JB et al. Usefulness of a cobalt-chromium coronary stent alloy. *Am J Cardiol* 2003;92:463-6.
38. Ako J, Bonneau HN, Honda Y, Fitzgerald PJ. Design Criteria for the Ideal Drug-Eluting Stent. *Am J Cardiol* 2007;100[suppl]: 3M–9M.
39. Kastrati A, Mehilli J, Dirschinger J, Dotzer F, Schühlen H, Neumann FJ, et al. Intracoronary stenting and angiographic results: strut thickness effect on restenosis outcome (ISARSTEREO) trial. *Circulation* 2001;103(23):2816-21.

40. Pache J, Kastrati A, Mehilli J, Schuhlen H, Dotzer F, Hasleiter J, et al. Intracoronary stenting and angiographic results: strut thickness effect on restenosis outcome (ISAR-STEREO-2) trial. *J Am Coll Cardiol* 2003;41(8):1283-8.
41. Butany J, Carmichael K, Leong SW, Collins MJ. Coronary artery stents: identification and evaluation. *J Clin Pathol* 2005;58:795-804.
42. Vaknin-Assa H, Assali A, Ukabi S, Lev E, Kornowski R. Stent thrombosis following drug-eluting stent implantation. A single-center experience. *Cardiovasc Revasc Med*, 2007;8:243-7.
43. Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, Fajadet J, Ban Hayashi E, Perin M, et al. Randomized study with the sirolimus-coated bx velocity balloon-expandable stent in the treatment of patients with de novo native coronary artery lesions: a randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med* 2002;346:1773–1780.
44. Stone GW, Ellis SG, Cox DA. One-year clinical results with the slow-release, polymer-based, paclitaxel-eluting TAXUS Stent: the TAXUS-IV trial. *Circulation* 2004;109:1942-7.
45. Finn AV, Nakazawa G, Joner M. Vascular responses to drug eluting stents-importance of delayed healing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1500-1510.
46. Lim SY, Jeong MH, Hong SJ. Inflammation and delayed endothelialization with overlapping drug-eluting stents in a porcine model of in-stent restenosis. *Circ J* 2008;72:463-468.
47. Tepe G, Muschick P, Laule M, Reddig F, Claussen CD, Dinkelborg LM, et al. Prevention of Carotid Artery Restenosis after Sirolimus-coated stent implantation in pigs. *Stroke* 2006 Feb;37(2):492-4.
48. Van der Giessen WJ, Lincof AM, Schwartz RS, Van Beusekm HM, Serruys PW, Holmes DR, et al. Market inflammatory sequelae to implantation of biodegradable and non-biodegradable polymers in porcine coronary arteries. *Circulation* 1996;9394:1690-7.
49. Miyauchi K, Kasai T, Yokayama T, Aihara K, Kurata T, Kajimoto K, et al. Effectiveness of Statin-Eluting Stent on Early Inflammatory Response and



50. Suzuki T, Kopia G, Hayashi S, Bailey LR, Llanos G, Wilensky, et al. Stent-based delivery of sirolimus reduces neointimal formation in a porcine coronary model. *Circulation* 2001;104:1188-1193.
51. Schwartz RS, Edelman ER. Drug-eluting stents in preclinical studies: recommended evaluation from a consensus group. *Circ* 2002;106:1867-1873.
52. Lowe HC, Schwartz RS, Mac Neill BD, Jang IK, Hayase M, Rogers C, et al. The porcine coronary model of in-stent restenosis: current status in the era of drug-eluting stents. *Catheter Cardiovasc Interv* 2003;60:515-523.
53. Serruys PW, Kutryk MJB, Ong ATL. Coronary artery stents. *N Engl J Med* 2006;354:483-95.
54. Stone GW, Ellis SG, Cannon L, Mann JT, Greenberg JD, Spriggs D, et al. Comparison of a Polymer-Based Paclitaxel-Eluting Stent With a Bare Metal Stent in Patients With Complex Coronary Artery Disease A Randomized Controlled Trial. *JAMA* 2005;294(10):1215-1223.
55. Philpott AC, Southern DA, Clement FM, Galbraith BN, Traboulsi M, Knudtson ML, et al. Long-term outcomes of patients receiving drug-eluting stents. *CMAJ* 2009;180(2):167-74.
56. Bosiers M, Cagiannos C, Deloose K, Verbist J, Peeters P. Drug-eluting stents in the management of peripheral artery disease. *Vasc Health Risk Manag* 2008;4(3):553-559.
57. Froeschl M, Olsen S, Ma X, O'Brien ER. Current understanding of in-stent restenosis and the potential benefit of drug eluting stents. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2004;4:103-117.
58. Rippstein P, Black MK, Boivin M, Veinot JP, Ma X, Chen YX, et al. Comparison of processing and sectioning methodologies for arteries containing metallic stents. *J Histochem Cytochem* 2006 June;54(6):673-681.
59. Schwartz RS, Chronos NA, Virmani R. Preclinical Restenosis Models and Drug-Eluting Stents: still Important, Still Much to Learn. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:1373- 85.

- 60 - Krueger KD, Mitra AK, DelCore MG, Hunter WJ, Agrawal DK. A comparison of stent-induced stenosis in coronary and peripheral arteries. *J Clin Pathol* 2006 June;59(6):575-9.
61. Dubé H, Clifford AG, Barry CM, Schwarten DE, Schwartz LB. Comparison of the vascular responses to balloon-expandable stenting in the coronary and peripheral circulations: long-term results in an animal model using the TriMaxx stent. *J Vasc Surg* 2007;45:821-7.
62. Kirsch EC, Kirsch EC, Khangure MS, Morling P, Terry JY, McAuliffe W. Oversizing of self-expanding stents: influence on the development of neointimal hyperplasia of the carotid artery in a canine model. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2002 Jan;23(1):121-7.
63. Rogers C, Edelman ER. Endovascular stent design dictates experimental restenosis and thrombosis. *Circulation* 1995;91:2995-3001.
64. Sullivan TM, Ainsworth SD, Langan EM, Taylor S, Snyder B, Cull D, et al. Effect of endovascular stent strut geometry on vascular injury, myointimal hyperplasia, and restenosis. *J Vasc Surg* 2002;36(1):143-9.
65. Schwartz RS, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vliestra RE. Restenosis After Balloon Angioplasty A Practical Proliferative Model in Porcine Coronary Arteries. *Circulation* 1990;82:2190-2200.
66. Heldman AW, Cheng L, Jenkins GM, Heller PF, Kim DW, Wre M, et al. Paclitaxel stent coating inhibits neointimal hyperplasia at 4 weeks in a porcine model of coronary restenosis. *Circulation* 2001;103:2289-2295.
67. Yang W, Ge J, Liu H, Zhao K, Liu X, Qu X, et al. Arsenic trioxide eluting stent reduces neointima formation in a rabbit iliac artery injury model. *Cardiovascular Research* 2006;72:483-493.
68. Zhang Q, Lu L, Pu L, Xu XW, Zhang RY, Zhang JS, et al. Neointimal hyperplasia persists at six months after sirolimus-eluting stent implantation in diabetic porcine. *Cardiovascular Diabetology* 2007;6:16.
69. França LH, Pereira AH, Perini SC. Self-expandable nitinol stent placement in homocysteinemic porcine aorta. *Clinics* 2008 Apr; 63(2):229-36.

70. Virmani R, Kolodgie FD, Farb A, Lafont A. Drug eluting stents: are human and animal studies comparable? *Heart* 2003;89:133-8.