

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

EFEITO DO CILOSTAZOL NA HIPERPLASIA NEOINTIMAL EM
ARTÉRIAS ILÍACAS DE SUÍNOS SUBMETIDAS A
ANGIOPLASTIA TRANSLUMINAL

Autor: Joel Alex Longhi

Orientador: Professor Doutor Adamastor Humberto Pereira

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

2012

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

EFEITO DO CILOSTAZOL NA HIPERPLASIA NEOINTIMAL EM
ARTÉRIAS ILÍACAS DE SUÍNOS SUBMETIDAS A
ANGIOPLASTIA TRANSLUMINAL

Autor: Joel Alex Longhi

Orientador: Professor Doutor Adamastor Humberto Pereira

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

2012

CIP - Catalogação na Publicação

Longhi, Joel Alex

EFEITO DO CILOSTAZOL NA HIPERPLASIA NEOINTIMAL EM
ARTÉRIAS ILÍACAS DE SUÍNOS SUBMETIDAS A ANGIOPLASTIA
TRANSLUMINAL / Joel Alex Longhi. -- 2012.
68 f.

Orientador: Adamastor Humberto Pereira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas,
Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Hiperplasia neointimal. 2. Cilostazol. 3.
Angioplastia transluminal. 4. Artéria ilíaca. I.
Pereira, Adamastor Humberto, orient. II. Título.

*A minha amada Letícia, pelo apoio incondicional
em todas as etapas deste projeto.*

*Ao meu Pai e minha Mãe, pelo amor e
dedicação que me permitiram chegar até aqui.*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Adamastor Humberto Pereira, pela orientação e incentivo.

A todos os colegas do Serviço de Cirurgia Vasculardo HCPA, que de alguma forma contribuíram para a realização deste estudo.

Aos funcionários da Unidade de Experimentação Animal e da Unidade de Patologia Experimental do HCPA, pela dedicação com o trabalho.

Aos funcionários da Unidade de Hemodinâmica do HCPA, pela disponibilização de materiais utilizados nos procedimentos.

Ao colega e amigo Ricardo Bocchese Paganella e a amiga Lydia Kedine Leite Chicar pelo empenho na realização do experimento.

Ao pesquisador Ismael Weber, pelo auxílio na preparação dos dados da histologia.

Ao laboratório Eurofarma pela doação do cilostazol utilizado no experimento.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	6
REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....	19
OBJETIVO.....	24
ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS.....	25
ANEXOS DO ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	41
ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS.....	46
ANEXOS DO ARTIGO EM INGLÊS.....	62

INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

A doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) apresenta prevalência de 3 a 10%, aumentando para 20% nos pacientes com mais de 70 anos. Pode ser assintomática ou importante causa de morbidade nos pacientes com claudicação intermitente e isquemia crítica (1). Quando indicado o tratamento com intervenção, a técnica endovascular representa o tratamento inicial na maioria das classificações anatômicas nos diferentes sítios arteriais (1, 2) e em várias condições clínicas, como pacientes com diabetes e insuficiência renal crônica (3, 4). No segmento aorto-ilíaco, mesmo lesões anatômicas TASC C e D (classificadas segundo o Transatlantic Inter-Society Consensus – TASC) podem ser tratadas com angioplastia com cateter balão com sucesso técnico inicial superior a 70%, porém com perviedade primária de 60% devido à reestenose ao longo do tempo, sendo necessários procedimentos adicionais para manter a perviedade (5-8).

1 Reestenose pós-angioplastia

A dilatação com balão da parede arterial provoca desendotelização da parede arterial e a deposição de plaquetas e fibrina no local (9). A formação de complexos locais entre plaquetas/plaquetas, plaquetas/leucócitos e leucócitos/células endoteliais é mediada por moléculas de adesão como a P-selectina (10-12). Esta é a base fisiopatológica para a inflamação e trombose que ocorrem após a lesão arterial. A liberação de citocinas aumenta a migração de leucócitos para o interior da parede arterial, cruzando a camada de plaquetas e fibrina. Fatores de crescimento também são liberados pelas plaquetas, leucócitos e células musculares lisas vasculares (CMLV). Assim, a reestenose é causada primariamente pelos efeitos da migração e proliferação das CMLV (13).

A proliferação celular após o implante do stent ocorre precocemente como parte da resposta à lesão vascular e tardiamente em torno das hastes do stent. A formação de neoíntima

é necessária para a cicatrização adequada dos vasos, prevenindo a exposição das hastes do stent ao fluxo sanguíneo, mas o excesso de neointima pode provocar estreitamento do lúmen vascular (14, 15). A proliferação das CMLV na íntima é o único determinante da reestenose após o implante de stent, mas na angioplastia isolada com cateter balão a reestenose é causada pelo recuo elástico da artéria, associado a migração e proliferação da CMLV e produção excessiva de matriz extracelular (15-17) (Figura 1).

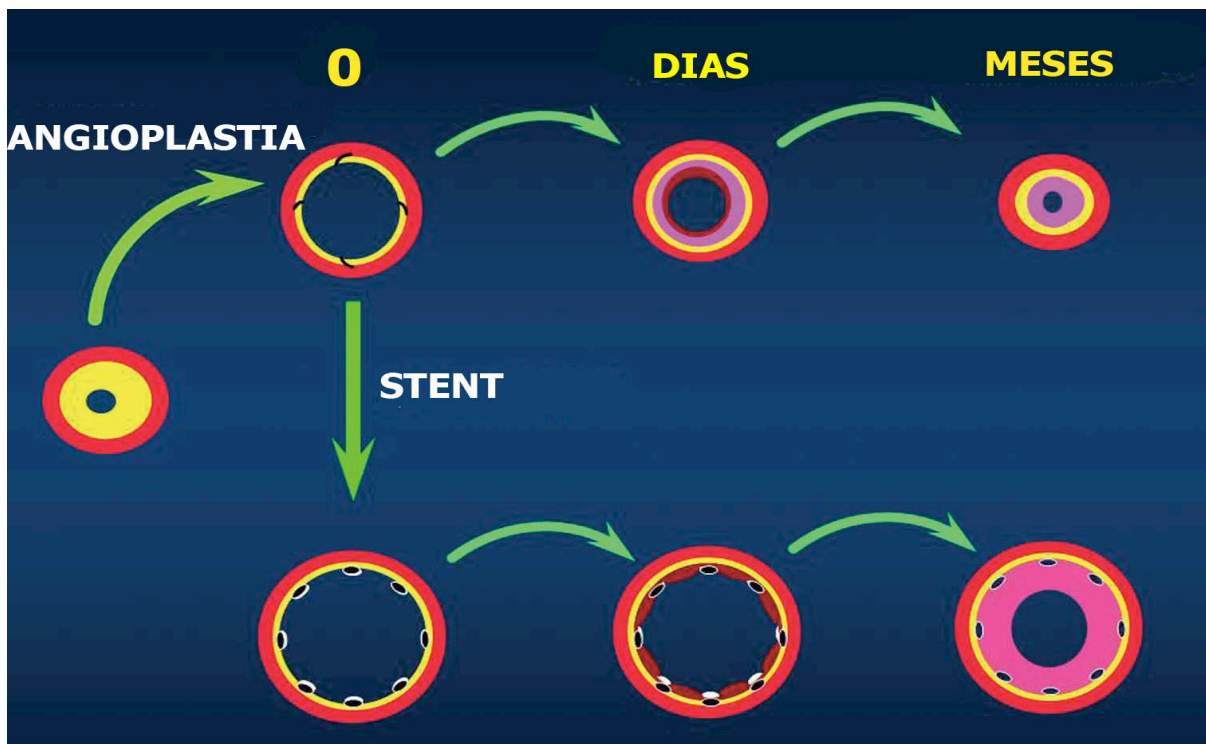


Figura 1 - Remodelamento negativo induzido pela angioplastia com cateter balão e implante de stent.

*Adaptado de Curcio, *Circulation Journal*, 2011.

O endotélio representa papel central na manutenção do equilíbrio vascular, através dos efeitos anti-inflamatório e anticoagulante das células endoteliais (18). Foi demonstrado, em modelo da angioplastia de carótida em ratos com cateter balão, que o primeiro evento que permite a migração e proliferação das CMLV da camada média para a íntima é a ruptura da lâmina elástica interna (LEI) (17, 19). Neste estudo, a proliferação da CMLV teve grande correlação com a ruptura da LEI, que ocorreu em 40% dos animais submetidos a angioplastia (Figura 2). Por outro lado, quando a LEI permaneceu intacta, a formação de neointima foi

mínima (17). Outro dado importante foi a demonstração do remodelamento negativo da artéria carótida de ratos após a angioplastia com cateter.

A proliferação das CMLV é proporcional ao grau de lesão vascular. Modelo de angioplastia com balão de Fogarty em carótida de ratos demonstrou proliferação de CMLV em 100% dos casos. Foi realizada três passagens do balão no vaso com diferentes níveis de pressão de insuflação: 0, 0,5, 1,0, 1,5 e 2 atm (20). Análises histológica e molecular através da medida do RNA do proto-oncogene c-Fos (ativado durante a proliferação das CMLV) demonstraram que o grau de proliferação neointimal é proporcional à pressão de insuflação do balão (20).

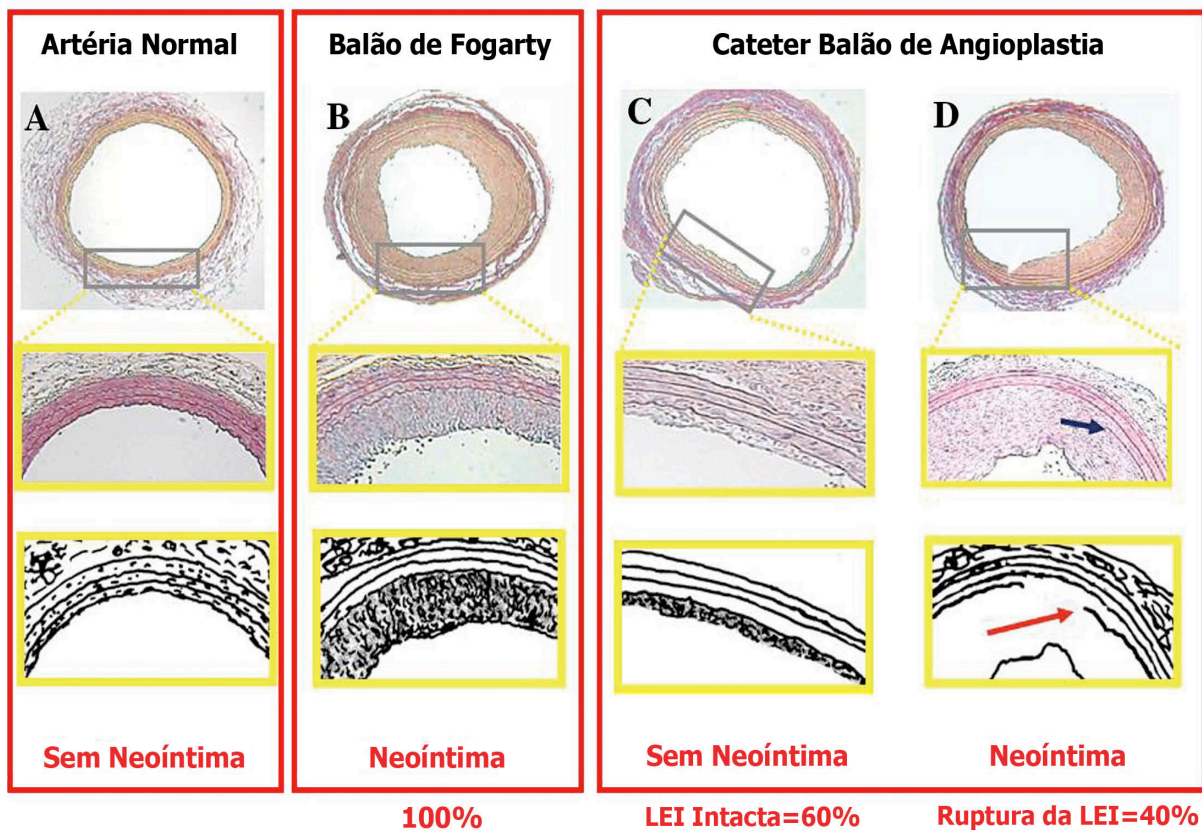


Figura 2 - Fisiopatologia da reestenose após lesão vascular com balão. Cortes histológicos representativos: primeiro, com coloração de Van Gieson x100; no meio, hematoxilina-eosina x400; por último, com desenhos esquemáticos x400. Artéria carótida comum de rato sem lesão por balão (A), após lesão com balão de Fogarty 2 Fr (B), após lesão com cateter balão (C) e após 28 dias de lesão com cateter balão (D). A lesão do balão de Fogarty 2 Fr provocou a formação de neointima homogênea sem a ruptura da lâmina elástica interna (LEI) (B). O cateter balão provocou formação insignificante de neointima quando a LEI permaneceu intacta (C). Lesão neointimal excêntrica foi observada quando houve ruptura da LEI (setas) (D).

*Adaptado de Curcio, *Circulation Journal*, 2011.

1.1 Mecanismos moleculares da reestenose

As principais vias comuns intracelulares que utilizam múltiplos receptores para transmitir os sinais mitogênicos da membrana para o núcleo na CMLV após lesão arterial induzida por cateter balão ou stent estão sumarizadas na figura 3 (15, 21). A inibição da proliferação da CMLV pode ser atingida bloqueando a via Ras-Raf-MAPKK (22, 23) ou ativando a sinalização da proteína quinase A dependente de adenosina monofosfato cíclica (cAMP) (24, 25).

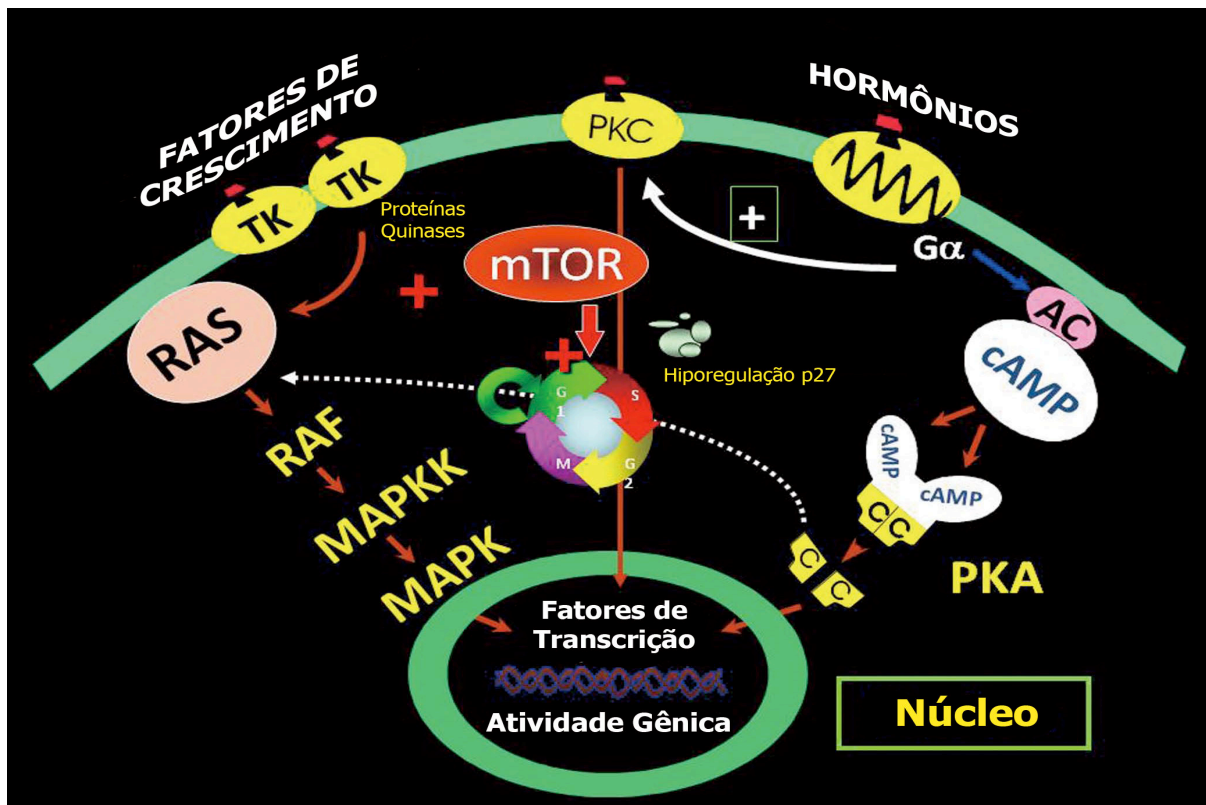


Figura 3 - Mecanismos moleculares de proliferação das células musculares lisas vasculares. Uma vez ativado, o receptor de tirosina-quinase desencadeia uma cascata de fosforilações de tirosina, que levam à formação de um complexo ternário de ligação ao receptor da proteína RAS. A RAS ativa liga a serina da proteína quinase RAF [também chamada MEKK ou MAPKKK (proteína quinase quinase ativada por mitógeno)], que ativa a MAPKK/MEK (proteína quinase quinase ativada por mitógeno). Essa cascata culmina na ativação dos fatores de transcrição nucleares. No outro lado da figura, o receptor de sete segmentos transmembrana, após ligação do hormônio, ativa a cascata de proteína G heterotrimérica. A $G\alpha$ (ligação ao GTP) ativa a adenilato ciclase (AC), o que aumenta a produção da adenosina monofosfato cíclica (cAMP). A cAMP liga a enzima tetramérica da proteína quinase A (PKA) e dissocia a enzima, liberando a subunidade catalítica ativada (C), que fosforila vários substratos no citoplasma, incluindo a RAF. Uma fração de C migra para o núcleo, onde estimula a transcrição de vários genes responsivos à cAMP, levando à supressão ou à estimulação do crescimento celular.

*Adaptado de Curcio, *Circulation Journal*, 2011.

2 Efeitos biológicos do cilostazol

Fármacos têm sido utilizados na tentativa de reduzir o risco de reestenose após procedimentos vasculares percutâneos. O cilostazol é um inibidor da fosfodiesterase III e foi aprovado nos Estados Unidos da América desde 1999 para o tratamento de claudicação intermitente em pacientes com DAOP. A inibição da fosfodiesterase III aumenta os níveis de cAMP, e como as plaquetas e as CMLV têm expressão dessa enzima, isso explica os efeitos do cilostazol no sistema cardiovascular (Figura 4) (26).

2.1.1 Efeitos antitrombóticos e antiplaquetários

Estudos em animais revelam que o cilostazol inibe a agregação plaquetária (27, 28). Esse efeito é dose-dependente e ocorre com ou sem a presença de células endoteliais (29). O cilostazol é um efetivo agente antitrombótico, como demonstrado em estudo experimental de lesão endotelial na carótida (30). O cilostazol apresentou resultados semelhante à ticlopidina, quando associado ao ácido acetilsalicílico (AAS), na inibição da agregação plaquetária induzida pelo estresse de cisalhamento, após intervenção coronária em paciente com infarto agudo do miocárdio (31). Estudo com 689 pacientes comparou o uso de cilostazol e clopidogrel associados ao AAS na prevenção de complicações trombóticas após o implante de stent coronariano, não demonstrando diferença (32).

2.1.2 Efeitos vasodilatadores

O cilostazol possui amplo, mas não uniforme, efeito vasodilatador. Promove dilatação mais acentuada das artérias vertebrais e femorais do que das artérias renais. Em cães anestesiados, a administração intra-arterial de cilostazol produziu maior aumento do fluxo sanguíneo nas artérias vertebrais e femorais (33, 34). O tratamento com cilostazol aumentou o cAMP intracelular nas CMLV de artérias mesentéricas e coronárias em coelhos (35).

Em seres humanos, foi demonstrado o aumento do fluxo sanguíneo nas extremidades aferido por pletismografia em pacientes com DAOP tratados com cilostazol (36).

2.1.3 Efeitos na redução dos lipídios

Estudos em ratos demonstraram que o cilostazol diminui os triglicerídeos e aumenta o colesterol HDL plasmático, efeito que parece ser mediado pelo aumento plasmático da lipase lipoproteica (37).

Estudo em 189 pacientes com DAOP avaliou o efeito do cilostazol nos lipídios plasmáticos (38). Após 12 semanas de uso de cilostazol 100 mg duas vezes ao dia, os triglicerídeos diminuíram 15% ($p < 0,001$), o colesterol HDL aumentou 10% ($p < 0,001$), e a apolipoproteína A1 aumentou 5,7% ($p < 0,01$). Houve tendência de diminuição da apolipoproteína B. O colesterol LDL não apresentou alteração. O cilostazol também aumentou o tempo de distância caminhada em 35% ($p = 0,0015$) e o índice tornozelo-braço em 9% ($p < 0,001$).

2.1.4 Efeitos antiproliferativos

Para estudar os efeitos do cilostazol no número de CMLV, os pesquisadores realizam cultura destas células oriundas de órgãos humanos e adicionam o cilostazol em uma cultura com fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF). Com o PDGF, há aumento significativo do número de CMLV ($p < 0,01$), e a adição de cilostazol inibe a proliferação de maneira dose-dependente ($p < 0,05$) (39).

O primeiro possível mecanismo do efeito antiproliferativo do cilostazol nas CMLV é a inibição da via proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), proteína que tem função importante na regulação das CMLV (40).

O aumento do cAMP causado pela diminuição da atividade de inibição da fosfodiesterase III inicia uma cascata de eventos que inclui a regulação de antioncogenes p53 e p21 e do fator de crescimento do hepatócito (HGF). O HGF estimula a rápida regeneração de células endoteliais que inibe a formação neointimal (34, 41).

Indução da apoptose pode ser outro mecanismo antiproliferativo do cilostazol. Apoptose pode ser induzido diretamente pela proteína p53 ativando o gene *bax*, mediado pelo antioncogene p21. Isso é muito importante, pois a acumulação de células no espaço intimal é essencial para a progressão da lesão vascular. A lesão neointimal é a consequência das alterações do balanço de morte e multiplicação celular (41). Experimentos com culturas de CMLV demonstraram que a proteína p53 foi sub-regulada pelo PDGF, efeito este atenuado pela adição de cilostazol. As CMLV estimuladas por PDGF aumentaram a taxa de apoptose com a adição de cilostazol (39).

Outro potencial mecanismo do cilostazol é a interferência direta em vários fatores de crescimento. Inclui a inibição do fator de crescimento epidérmico ligado à heparina (HG-EGF) em macrófagos e CMLV (42). Inibe também moléculas de adesão, como a molécula 1 de adesão da célula vascular (VCAM-1) e a proteína-1 quimioatraente de monócito (MCP-1); ambas promovem a interação dos leucócitos circulantes com a superfície endotelial (34).

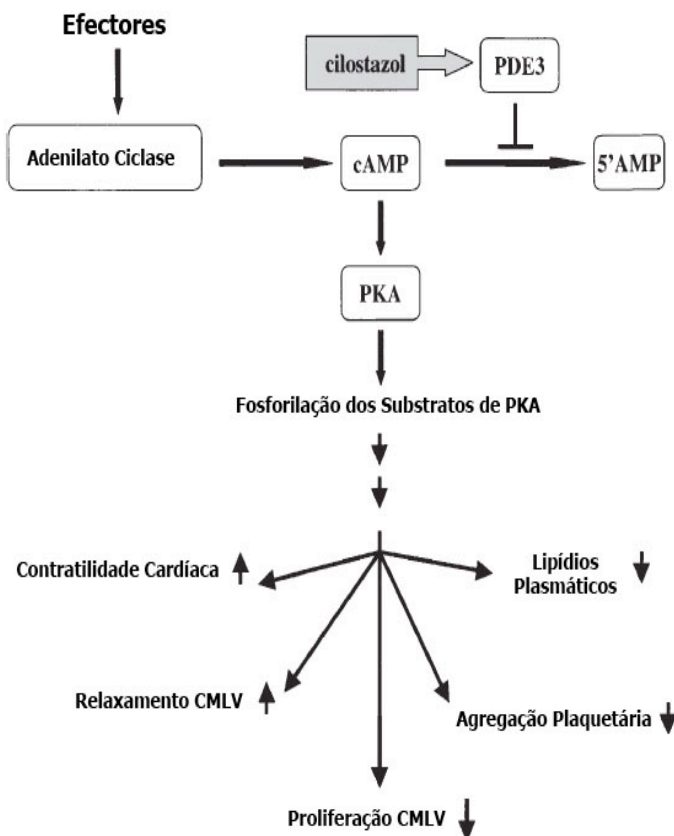


Figura 4 - Efeitos fisiológicos da inibição da fosfodiesterase III (PDE3). Nas células ricas em PDE3, como os miócitos cardíacos, células musculares lisas vasculares (CMLV) e nas plaquetas, a inibição da PDE3 provoca o aumento do monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) resultando na fosforilação dos substratos da proteína quinase A (PKA).

*Adaptado de Liu, *Cardiovascular Drug Reviews*, 2001.

2.2 Efeitos do cilostazol na reestenose – estudos *in vivo*

2.2.1 Estudos em animais

Estudo em 23 cães avaliou o efeito do cilostazol na artéria ilíaca. Foi realizada angioplastia com stent associado a embolização com molas da femoral comum para redução do fluxo no eixo ilíaco. Os resultados demonstraram redução da hiperplasia neointimal e ausência de oclusão trombótica no grupo cilostazol, comparativamente ao grupo controle (43).

Modelo de enxerto livre de aorta de rato avaliou o uso local de gel com cilostazol comparado ao controle. Foi produzida estenose na anastomose distal da aorta infrarrenal do rato receptor. Os resultados histopatológicos demonstraram redução na razão da área da íntima/média em 86% no corpo de enxerto e 75,8% na anastomose distal no grupo tratado (44). Outro modelo do mesmo grupo de pesquisadores utilizou enxerto livre de veia femoral interposta na aorta de ratos, sendo aplicado localmente gel de cilostazol, comparado ao controle. Também foi realizado modelo com estenose na anastomose distal. Houve uma redução na média da área neointimal de 87,1% no corpo do enxerto e de 78,9% na anastomose distal (45).

Trabalho com 12 cães submetidos a interposição da veia jugular na artéria carótida comum estudou o uso de cilostazol via oral comparado com placebo desde 7 dias antes do procedimento até 28 dias após. Os dados demonstram que houve redução na razão da área da íntima/média (46).

Estudo em suínos comparou o uso de stent com eluição de cilostazol *versus* stent convencional em artérias coronárias, com seis suínos em cada grupo. Análise histopatológica após 28 dias mostrou redução de 23% na área intimal do grupo com stent com eluição de cilostazol (1,58 *versus* 2,05 mm²; p = 0,04) (47).

Artérias carótidas de ratos foram submetidas a angioplastia com cateter de Fogarty e avaliadas após administração local de gel com cilostazol (n = 12) ou gel placebo (n = 14). Após 2 semanas, o grupo tratado apresentou menor área intimal (hiperplasia neointimal) na análise histopatológica (0,06 *versus* 0,15 mm²; p < 0,001)(17).

2.2.2 Estudo em humanos

2.2.2.1 Território coronário

Os maiores estudos sobre o uso do cilostazol para prevenção de reestenose foram realizados em artérias coronárias de seres humanos.

O estudo COMPASS avaliou 106 lesões em artérias coronárias pequenas (diâmetro menor que 3 mm). Foram randomizadas 50 lesões para o grupo tratado somente com stent e 56 lesões para angioplastia com cateter balão em associação ao cilostazol na dose de 100 mg duas vezes ao dia. Todos os pacientes receberam aspirina na semana anterior ao procedimento, e seu uso foi suspenso se randomizado para o grupo angioplastia + cilostazol. No grupo tratado com stent, foi utilizado ticlopidina por 30 dias após o procedimento. A taxa de reestenose foi menor no grupo angioplastia + cilostazol, mas não foi estatisticamente significativa (13,2 *versus* 24,5%; p = 0,11). Houve também tendência não significativa a uma taxa maior de nova revascularização da lesão alvo no grupo stent (22,0 *versus* 10,7%; p = 0,10) (48).

O RACTS foi estudo randomizado com 397 pacientes que comparou o uso de cilostazol 100 mg duas vezes ao dia por 6 meses *versus* ticlopidina na dose de 250 mg duas vezes ao dia em submetidos a angioplastia coronariana com stent. Todos pacientes receberam aspirina 100 mg ao dia por 6 meses. Não houve diferença no desfecho combinado de morte, infarto, acidente vascular cerebral e trombose do stent. Houve redução de nova

revascularização na lesão-alvo no acompanhamento de 9 meses (22,9 *versus* 32,7%; $p = 0,03$) (49).

O estudo CREST randomizou 705 pacientes submetidos a implante de stent coronário para receber, além da aspirina, cilostazol 100 mg em duas doses diárias ou placebo. Todos os pacientes receberam clopidogrel por 30 dias. A reestenose foi avaliada com angiografia quantitativa em 6 meses e ocorreu em 22% dos pacientes no grupo cilostazol comparado com 34% no grupo placebo ($p = 0,002$) (50).

O ensaio clínico DECLARE-DIBETES avaliou o uso de terapia antiplaquetária tripla *versus* dupla em paciente diabético após o implante de stent farmacológico. O estudo multicêntrico e randomizado incluiu 200 pacientes no grupo AAS, clopidogrel e cilostazol comparando 200 pacientes no grupo AAS e clopidogrel por 6 meses. Houve menor reestenose no segmento tratado (8 *versus* 15,6%; $p = 0,033$), mas não foi estatisticamente significativa a taxa de óbitos, infarto do miocárdio e nova revascularização da lesão-alvo (51). O DECLARE-LONG II estudou o uso da terapia antiplaquetária tripla *versus* dupla em pacientes com lesões coronárias longas (≥ 25 mm), sendo necessário o uso de stent farmacológico ≥ 30 mm. Novamente, a taxa de reestenose foi menor (10,8 *versus* 19,1%; $p = 0,016$) e não obteve significância estatística em desfechos clínicos como morte e infarto do miocárdio (52).

Metanálise de 23 ensaios clínicos randomizados incluindo 5.428 pacientes avaliou o uso do cilostazol após intervenção coronária com angioplastia isolada, implante de stent, aterectomia ou implante de stent farmacológico. O acompanhamento médio foi de 6 meses. O uso do cilostazol reduziu a reestenose na angiografia binária (risco relativo de 0,6; 0,49-0,73) e necessidade de nova revascularização da lesão-alvo (risco relativo de 0,69; 0,55-0,86) (53).

Outra metanálise incluiu 10 ensaios clínicos randomizados e 2.809 pacientes submetidos a angioplastia coronariana com stent convencional e stent farmacológico. Foram

comparados os grupos com tripla antiagregação (AAS, clopidogrel e cilostazol) com a dupla antiagregação (AAS e clopidogrel). O uso do cilostazol foi associado a redução da reestenose angiográfica (risco relativo de 0,52; 0,41-0,66) e nova revascularização da lesão-alvo (risco relativo de 0,38; 0,25-0,58) (54).

2.2.2.2 Território carotídeo

Foram identificados somente dois trabalhos retrospectivos após angioplastia carotídea com stent. No primeiro, 113 pacientes submetidos a angioplastia carotídea receberam aspirina e outro agente antiplaquetário, que poderia ser cilostazol, ticlopidina ou clopidogrel por 3 meses. Após esse período, o paciente era mantido com somente um agente antiplaquetário. Comparando os pacientes que utilizaram cilostazol com os demais, houve redução na taxa de reestenose intra-stent em 12 meses (0 *versus* 15,7%, $p = 0,03$) (55). No segundo, 553 pacientes submetidos a angioplastias foram avaliados para reestenose intra-stent, definida como maior que 50% pela angiografia ou ultrassonografia com Doppler. Do total, 230 pacientes utilizaram cilostazol (37,4%). No acompanhamento de 30 meses, a incidência de reestenose intra-stent ou necessidade de nova revascularização da lesão-alvo foram menores no grupo tratado com cilostazol (1,4 *versus* 6,4%; $p = 0,006$) (56).

2.2.2.3 Território vascular periférico

No segmento vascular periférico, poucos estudos avaliaram o efeito do cilostazol.

Em estudo retrospectivo com 141 pacientes submetidos a angioplastia do segmento femoropoplíteo, o uso de cilostazol reduziu a necessidade de revascularização da lesão-alvo (tratada previamente) de 32 para 12% ($p < 0,01$) em um período de acompanhamento médio inferior a 24 meses (57). O mesmo autor conduziu posteriormente estudo prospectivo e randomizado com 127 pacientes submetidos a tratamento endovascular de lesões primárias no segmento femoropoplíteo. Foram divididos em dois grupos que receberam cilostazol na dose

de 200 mg ao dia ou ticlopidina também na dose de 200 mg ao dia, acrescidos de AAS na dose de 100 mg ao dia. Perviedade do segmento tratado foi acompanhada por ultrassonografia com Doppler. O grupo cilostazol apresentou redução da necessidade de novo tratamento na lesão-alvo e diminuição na taxa de reestenose, amputação e morte (58).

Uso do cilostazol na claudicação intermitente e DAOP femoropoplíteia foi avaliado em 80 pacientes randomizados para receber cilostazol além do AAS ou somente AAS após o tratamento endovascular. Em acompanhamento de 2 anos, a reestenose foi menor no grupo cilostazol (43,6 *versus* 70,3%, $p = 0,02$), assim como a taxa livre de nova revascularização da lesão-alvo foi maior no grupo cilostazol (84,6 *versus* 62,2%, $p = 0,04$) (59).

Em 618 pacientes com isquemia crítica de DAOP infrainguinal submetidos a tratamento endovascular, o uso do cilostazol foi avaliado retrospectivamente. Cilostazol foi utilizado em 356 pacientes *versus* 262 que formaram o grupo controle. Os desfechos foram avaliados em 5 anos. A taxa livre de amputação e de salvamento de membro foi maior no grupo cilostazol (47,7 *versus* 32,7%, $p < 0,01$; e 86,6 *versus* 75,3%, $p < 0,01$). No entanto, a sobrevida global e a taxa livre de nova revascularização da lesão-alvo não foram diferentes (43,9 *versus* 46%, $p = 0,24$; e 39,9 *versus* 31,8%, $p = 0,21$) (60).

Estudo foi conduzido em 372 pacientes com insuficiência renal crônica dialítica, submetidos a angioplastia de vasos dos membros inferiores, na qual um grupo recebeu cilostazol, além do tratamento clínico padrão. A perviedade foi de 52,4% no grupo cilostazol *versus* 32,9% no grupo controle (intervalo de confiança de 0,39 a 0,77) na análise da curva de Kaplan-Meier em 5 anos (61). Outro estudo retrospectivo avaliando 174 pacientes em hemodiálise foi realizado pelo autor. Neste, os pacientes submetidos a tratamento endovascular somente do segmento femoropoplíteo foram incluídos. A taxa livre de reestenose significativa em 6 anos no grupo cilostazol foi de 59,5 *versus* 50,6% no grupo

controle (intervalo de confiança de 0,45 a 0,88). Houve também menor taxa de amputação e necessidade de novo tratamento na lesão-alvo (62).

Apesar dos estudos acima demonstrarem que o uso do cilostazol após procedimentos endovasculares reduz a taxa de reestenose no eixo arterial periférico (especialmente no segmento femoropoplíteo), não está definido sobre desfechos maiores como amputação e morte. Além disso, também não foi avaliado se sua aplicação pode ser estendida a outros sítios arteriais, como o eixo ilíaco.

REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG, et al. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*. 2007;33 Suppl 1:S1-75.
2. Kudo T, Chandra FA, Ahn SS. The effectiveness of percutaneous transluminal angioplasty for the treatment of critical limb ischemia: a 10-year experience. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. 2005 Mar;41(3):423-35; discussion 35.
3. Faglia E, Dalla Paola L, Clerici G, Clerissi J, Graziani L, Fusaro M, et al. Peripheral angioplasty as the first-choice revascularization procedure in diabetic patients with critical limb ischemia: prospective study of 993 consecutive patients hospitalized and followed between 1999 and 2003. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*. 2005 Jun;29(6):620-7.
4. Graziani L, Silvestro A, Bertone V, Manara E, Alicandri A, Parrinello G, et al. Percutaneous transluminal angioplasty is feasible and effective in patients on chronic dialysis with severe peripheral artery disease. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2007 Apr;22(4):1144-9.
5. Schwartz RS. Pathophysiology of restenosis: interaction of thrombosis, hyperplasia, and/or remodeling. *Am J Cardiol*. 1998 Apr 9;81(7A):14E-7E.
6. Kudo T, Chandra FA, Ahn SS. Long-term outcomes and predictors of iliac angioplasty with selective stenting. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. 2005 Sep;42(3):466-75.
7. Piffaretti G, Tozzi M, Lomazzi C, Rivolta N, Lagana D, Carrafiello G, et al. Mid-term results of endovascular reconstruction for aorto-iliac obstructive disease. *International angiology : a journal of the International Union of Angiology*. 2007 Mar;26(1):18-25.
8. Ye W, Liu CW, Ricco JB, Mani K, Zeng R, Jiang J. Early and late outcomes of percutaneous treatment of TransAtlantic Inter-Society Consensus class C and D aorto-iliac lesions. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. 2011 Jun;53(6):1728-37.
9. Schwartz RS, Holmes DR, Jr., Topol EJ. The restenosis paradigm revisited: an alternative proposal for cellular mechanisms. *Journal of the American College of Cardiology*. United States 1992. p. 1284-93.
10. Hayashi S, Watanabe N, Nakazawa K, Suzuki J, Tsushima K, Tamatani T, et al. Roles of P-selectin in inflammation, neointimal formation, and vascular remodeling in balloon-injured rat carotid arteries. *Circulation*. 2000 Oct 3;102(14):1710-7.
11. Wang K, Zhou Z, Zhou X, Tarakji K, Topol EJ, Lincoff AM. Prevention of intimal hyperplasia with recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand-immunoglobulin in the porcine coronary artery balloon injury model. *Journal of the American College of Cardiology*. 2001 Aug;38(2):577-82.

12. Conde ID, Kleiman NS. Arterial thrombosis for the interventional cardiologist: from adhesion molecules and coagulation factors to clinical therapeutics. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2003 Oct;60(2):236-46.
13. Welt FG, Tso C, Edelman ER, Kjelsberg MA, Paolini JF, Seifert P, et al. Leukocyte recruitment and expression of chemokines following different forms of vascular injury. *Vascular medicine (London, England).* 2003;8(1):1-7.
14. Indolfi C, Esposito G, Stabile E, Cavuto L, Pisani A, Coppola C, et al. A new rat model of small vessel stenting. *Basic research in cardiology.* 2000 Jun;95(3):179-85.
15. Mongiardo A, Curcio A, Spaccarotella C, Parise S, Indolfi C. Molecular mechanisms of restenosis after percutaneous peripheral angioplasty and approach to endovascular therapy. *Current drug targets Cardiovascular & haematological disorders.* 2004 Sep;4(3):275-87.
16. Mintz GS, Popma JJ, Pichard AD, Kent KM, Satler LF, Wong C, et al. Arterial remodeling after coronary angioplasty: a serial intravascular ultrasound study. *Circulation.* 1996 Jul 1;94(1):35-43.
17. Indolfi C, Torella D, Coppola C, Stabile E, Esposito G, Curcio A, et al. Rat carotid artery dilation by PTCA balloon catheter induces neointima formation in presence of IEL rupture. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology.* 2002 Aug;283(2):H760-7.
18. Fuke S, Maekawa K, Kawamoto K, Saito H, Sato T, Hioka T, et al. Impaired endothelial vasomotor function after sirolimus-eluting stent implantation. *Circ J.* 2007 Feb;71(2):220-5.
19. Indolfi C, Curcio A, Chiariello M. Simvastatin reduces neointimal thickening after experimental angioplasty. *Circulation.* 2003 Jan 28;107(3):e25.
20. Indolfi C, Esposito G, Di Lorenzo E, Rapacciuolo A, Feliciello A, Porcellini A, et al. Smooth muscle cell proliferation is proportional to the degree of balloon injury in a rat model of angioplasty. *Circulation.* 1995 Sep 1;92(5):1230-5.
21. Indolfi C, Coppola C, Torella D, Arcucci O, Chiariello M. Gene therapy for restenosis after balloon angioplasty and stenting. *Cardiology in review.* 1999 Nov-Dec;7(6):324-31.
22. Indolfi C, Avvedimento EV, Rapacciuolo A, Di Lorenzo E, Esposito G, Stabile E, et al. Inhibition of cellular ras prevents smooth muscle cell proliferation after vascular injury in vivo. *Nature medicine.* 1995 Jun;1(6):541-5.
23. Indolfi C, Avvedimento EV, Rapacciuolo A, Esposito G, Di Lorenzo E, Leccia A, et al. In vivo gene transfer: prevention of neointima formation by inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase. *Basic research in cardiology.* 1997 Dec;92(6):378-84.
24. Indolfi C, Avvedimento EV, Di Lorenzo E, Esposito G, Rapacciuolo A, Giuliano P, et al. Activation of cAMP-PKA signaling in vivo inhibits smooth muscle cell proliferation induced by vascular injury. *Nature medicine.* 1997 Jul;3(7):775-9.
25. Indolfi C, Stabile E, Coppola C, Gallo A, Perrino C, Allevato G, et al. Membrane-bound protein kinase A inhibits smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo by amplifying cAMP-protein kinase A signals. *Circulation research.* 2001 Feb 16;88(3):319-24.
26. Ikeda Y. Antiplatelet therapy using cilostazol, a specific PDE3 inhibitor. *Thrombosis and haemostasis.* 1999 Aug;82(2):435-8.
27. Kimura Y, Tani T, Kanbe T, Watanabe K. Effect of cilostazol on platelet aggregation and experimental thrombosis. *Arzneimittel-Forschung.* 1985;35(7A):1144-9.

28. Saitoh S, Saito T, Otake A, Owada T, Mitsugi M, Hashimoto H, et al. Cilostazol, a novel cyclic AMP phosphodiesterase inhibitor, prevents reocclusion after coronary arterial thrombolysis with recombinant tissue-type plasminogen activator. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association*. 1993 Apr;13(4):563-70.
29. Igawa T, Tani T, Chijiwa T, Shiragiku T, Shimidzu S, Kawamura K, et al. Potentiation of anti-platelet aggregating activity of cilostazol with vascular endothelial cells. *Thrombosis research*. 1990 Feb 15;57(4):617-23.
30. Kohda N, Tani T, Nakayama S, Adachi T, Marukawa K, Ito R, et al. Effect of cilostazol, a phosphodiesterase III inhibitor, on experimental thrombosis in the porcine carotid artery. *Thrombosis research*. 1999 Nov 15;96(4):261-8.
31. Tanigawa T, Nishikawa M, Kitai T, Ueda Y, Okinaka T, Makino K, et al. Increased platelet aggregability in response to shear stress in acute myocardial infarction and its inhibition by combined therapy with aspirin and cilostazol after coronary intervention. *Am J Cardiol*. 2000 May 1;85(9):1054-9.
32. Lee SW, Park SW, Hong MK, Lee CW, Kim YH, Park JH, et al. Comparison of cilostazol and clopidogrel after successful coronary stenting. *Am J Cardiol*. 2005 Apr 1;95(7):859-62.
33. Weintraub WS. The vascular effects of cilostazol. *The Canadian journal of cardiology*. 2006 Feb;22 Suppl B:56B-60B.
34. da Rosa MP, Baroni GV, Portal VL. Cilostazol, a phosphodiesterase III inhibitor: future perspectives in atherosclerosis. *Arq Bras Cardiol*. Brazil2006. p. e222-6.
35. Tanaka T, Ishikawa T, Hagiwara M, Onoda K, Itoh H, Hidaka H. Effects of cilostazol, a selective cAMP phosphodiesterase inhibitor on the contraction of vascular smooth muscle. *Pharmacology*. 1988;36(5):313-20.
36. Liu Y, Shakur Y, Yoshitake M, Kambayashi Ji J. Cilostazol (pletal): a dual inhibitor of cyclic nucleotide phosphodiesterase type 3 and adenosine uptake. *Cardiovascular drug reviews*. 2001 Winter;19(4):369-86.
37. Tani T, Uehara K, Sudo T, Marukawa K, Yasuda Y, Kimura Y. Cilostazol, a selective type III phosphodiesterase inhibitor, decreases triglyceride and increases HDL cholesterol levels by increasing lipoprotein lipase activity in rats. *Atherosclerosis*. 2000 Oct;152(2):299-305.
38. Elam MB, Heckman J, Crouse JR, Hunninghake DB, Herd JA, Davidson M, et al. Effect of the novel antiplatelet agent cilostazol on plasma lipoproteins in patients with intermittent claudication. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1998 Dec;18(12):1942-7.
39. Hayashi S, Morishita R, Matsushita H, Nakagami H, Taniyama Y, Nakamura T, et al. Cyclic AMP inhibited proliferation of human aortic vascular smooth muscle cells, accompanied by induction of p53 and p21. *Hypertension*. 2000 Jan;35(1 Pt 2):237-43.
40. Ito C, Kusano E, Furukawa Y, Yamamoto H, Takeda S, Akimoto T, et al. Modulation of the erythropoietin-induced proliferative pathway by cAMP in vascular smooth muscle cells. *American journal of physiology Cell physiology*. 2002 Dec;283(6):C1715-21.
41. Morishita R. A scientific rationale for the CREST trial results: evidence for the mechanism of action of cilostazol in restenosis. *Atheroscler Suppl*. Netherlands2005. p. 41-6.

42. Schror K. The pharmacology of cilostazol. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2002 Mar;4 Suppl 2:S14-9.
43. Kubota Y, Kichikawa K, Uchida H, Maeda M, Nishimine K, Makutani S, et al. Pharmacologic treatment of intimal hyperplasia after metallic stent placement in the peripheral arteries. An experimental study. *Investigative radiology*. 1995 Sep;30(9):532-7.
44. Fujinaga K, Onoda K, Yamamoto K, Imanaka-Yoshida K, Takao M, Shimono T, et al. Locally applied cilostazol suppresses neointimal hyperplasia by inhibiting tenascin-C synthesis and smooth muscle cell proliferation in free artery grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg. United States*2004. p. 357-63.
45. Yamamoto K, Onoda K, Sawada Y, Fujinaga K, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, et al. Locally applied cilostazol suppresses neointimal hyperplasia and medial thickening in a vein graft model. *Ann Thorac Cardiovasc Surg. Japan*2007. p. 322-30.
46. Kudo FA, Kondo Y, Muto A, Miyazaki K, Dardik A, Nishibe M, et al. Cilostazol suppresses neointimal hyperplasia in canine vein grafts. *Surgery today*. 2009;39(2):128-32.
47. Tsuchikane E, Suzuki T, Katoh O. Examination of anti-intima hyperplastic effect on cilostazol-eluting stent in a porcine model. *The Journal of invasive cardiology*. 2007 Mar;19(3):109-12.
48. Tsuchikane E, Takeda Y, Nasu K, Awata N, Kobayashi T. Balloon angioplasty plus cilostazol administration versus primary stenting of small coronary artery disease: final results of COMPASS. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2004 Sep;63(1):44-51.
49. Ge J, Han Y, Jiang H, Sun B, Chen J, Zhang S, et al. RACTS: a prospective randomized antiplatelet trial of cilostazol versus ticlopidine in patients undergoing coronary stenting: long-term clinical and angiographic outcome. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2005 Aug;46(2):162-6.
50. Douglas JS, Jr., Holmes DR, Jr., Kereiakes DJ, Grines CL, Block E, Ghazzal ZM, et al. Coronary stent restenosis in patients treated with cilostazol. *Circulation*. 2005 Nov 1;112(18):2826-32.
51. Lee SW, Park SW, Kim YH, Yun SC, Park DW, Lee CW, et al. Drug-eluting stenting followed by cilostazol treatment reduces late restenosis in patients with diabetes mellitus the DECLARE-DIABETES Trial (A Randomized Comparison of Triple Antiplatelet Therapy with Dual Antiplatelet Therapy After Drug-Eluting Stent Implantation in Diabetic Patients). *Journal of the American College of Cardiology. United States*2008. p. 1181-7.
52. Lee SW, Park SW, Kim YH, Yun SC, Park DW, Lee CW, et al. A randomized, double-blind, multicenter comparison study of triple antiplatelet therapy with dual antiplatelet therapy to reduce restenosis after drug-eluting stent implantation in long coronary lesions: results from the DECLARE-LONG II (Drug-Eluting Stenting Followed by Cilostazol Treatment Reduces Late Restenosis in Patients with Long Coronary Lesions) trial. *Journal of the American College of Cardiology*. 2011 Mar 15;57(11):1264-70.
53. Biondi-Zoccai GG, Lotrionte M, Anselmino M, Moretti C, Agostoni P, Testa L, et al. Systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials appraising the impact of cilostazol after percutaneous coronary intervention. *American heart journal. United States*2008. p. 1081-9.
54. Tamhane U, Meier P, Chetcuti S, Chen KY, Rha SW, Grossman MP, et al. Efficacy of cilostazol in reducing restenosis in patients undergoing contemporary stent based PCI: a meta-analysis of randomised controlled trials. *EuroIntervention : journal of EuroPCR in*

collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology. 2009 Aug;5(3):384-93.

55. Takigawa T, Matsumaru Y, Hayakawa M, Nemoto S, Matsumura A. Cilostazol reduces restenosis after carotid artery stenting. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. United States: 2010 Society for Vascular Surgery. Published by Mosby, Inc; 2010. p. 51-6.

56. Yamagami H, Sakai N, Matsumaru Y, Sakai C, Kai Y, Sugi K, et al. Periprocedural Cilostazol Treatment and Restenosis after Carotid Artery Stenting: The Retrospective Study of In-Stent Restenosis after Carotid Artery Stenting (ReSISter-CAS). *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association*. 2010 Sep 18.

57. Iida O, Nanto S, Uematsu M, Morozumi T, Kotani J, Awata M, et al. Cilostazol reduces target lesion revascularization after percutaneous transluminal angioplasty in the femoropopliteal artery. *Circ J*. 2005 Oct;69(10):1256-9.

58. Iida O, Nanto S, Uematsu M, Morozumi T, Kitakaze M, Nagata S. Cilostazol reduces restenosis after endovascular therapy in patients with femoropopliteal lesions. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. United States 2008. p. 144-9.

59. Soga Y, Yokoi H, Kawasaki T, Nakashima H, Tsurugida M, Hikichi Y, et al. Efficacy of cilostazol after endovascular therapy for femoropopliteal artery disease in patients with intermittent claudication. *Journal of the American College of Cardiology*. United States 2009. p. 48-53.

60. Soga Y, Iida O, Hirano K, Suzuki K, Kawasaki D, Miyashita Y, et al. Impact of cilostazol after endovascular treatment for infrainguinal disease in patients with critical limb ischemia. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter: Inc*; 2011.

61. Ishii H, Kumada Y, Toriyama T, Aoyama T, Takahashi H, Yamada S, et al. Cilostazol improves long-term patency after percutaneous transluminal angioplasty in hemodialysis patients with peripheral artery disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. United States 2008. p. 1034-40.

62. Ishii H, Kumada Y, Toriyama T, Aoyama T, Takahashi H, Tanaka M, et al. Effects of oral cilostazol 100 mg BID on long-term patency after percutaneous transluminal angioplasty in patients with femoropopliteal disease undergoing hemodialysis: a retrospective chart review in Japanese patients. *Clin Ther*. 2010 Jan;32(1):24-33.

OBJETIVO

O objetivo do trabalho é avaliar se a administração sistêmica de cilostazol reduz a hiperplasia neointimal nas artérias ilíacas de suínos submetidas a angioplastia com cateter balão.

ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS

Efeito do cilostazol na hiperplasia neointimal em artérias ilíacas de suínos submetidas a angioplastia transluminal

Joel Alex Longhi¹; Adamastor Humberto Pereira²

1. Cirurgião vascular, aluno do mestrado acadêmico em Ciências Cirúrgicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.
2. Cirurgião vascular, professor adjunto. Orientador, Departamento de Cirurgia, curso de pós-graduação em Ciências Cirúrgicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

Correspondência:

Joel Alex Longhi

Ramiro Barcelos, 2350/600 – CEP: 90035-903 – Porto Alegre – Brasil

e-mail: joelalexlonghi@yahoo.com.br

RESUMO

Objetivo: Avaliar se a administração sistêmica de cilostazol reduz a hiperplasia neointimal nas artérias ilíacas de suínos submetidas a angioplastia com cateter balão.

Métodos: O trabalho foi desenvolvido na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Vinte suínos foram submetidos a angioplastia com cateter balão 6 x 40 mm na artéria ilíaca comum direita, guiada por ultrassonografia com Doppler. Os animais foram randomizados em dois grupos: grupo 1 (n = 10), no qual foi administrado cilostazol 50 mg em duas doses diárias, e grupo 2 (n = 10), considerado controle. Após 30 dias, os animais foram sacrificados, e as artérias ilíacas preparadas para análise histológica. Os cortes histológicos foram digitalizados e analisados por morfometria digital. A análise estatística foi realizada com o teste *t* de Student e o de Mann-Whitney.

Resultados: Comparando as artérias ilíacas submetidas a angioplastia com as não submetidas a angioplastia, houve hiperplasia neointimal significativa (0,228 *versus* 0,119 mm²; p = 0,0001). Nas artérias submetidas a angioplastia, não houve diferença entre o grupo 1 (cilostazol) e o grupo 2 (controle) na área do lúmen (2,277 *versus* 2,575 mm²; p = 0,08), área da íntima (0,219 *versus* 0,237 mm²; p = 0,64), área da média (2,262 *versus* 2,393 mm²; p = 0,53) e no percentual de obstrução neointimal (8,857 *versus* 9,257 %; p = 0,82).

Conclusão: O uso de cilostazol 50 mg em duas doses diárias não reduziu a hiperplasia neointimal em artérias ilíacas de suínos submetidas a angioplastia com cateter balão.

Palavras-chave: hiperplasia neointimal, cilostazol, angioplastia transluminal, artéria ilíaca

INTRODUÇÃO

A doença arterial obstrutiva periférica apresenta prevalência que pode chegar a 20% nos pacientes com mais de 70 anos e é importante causa de morbidade (1). Quando indicado o tratamento com intervenção, a técnica endovascular representa o tratamento inicial na maioria das classificações anatômicas nos diferentes sítios arteriais (1, 2) e em várias condições clínicas (3, 4). A taxa de sucesso inicial do tratamento endovascular é alta, superando 90% no segmento aorto-ilíaco, porém a perviedade cai ao longo do tempo devido a reestenose (5-8).

Fármacos têm sido utilizados na tentativa de reduzir o risco de reestenose após procedimentos vasculares percutâneos. O cilostazol possui efeito antiplaquetário, vasodilatador e antiproliferativo (33, 34, 42). É um inibidor seletivo da fosfodiesterase III e promove o aumento da adenosina 3',5'-monofosfato cíclico nas plaquetas e nas células musculares lisas. A sequência de eventos estimula a rápida regeneração de células endoteliais, que inibe a formação neointimal por dois mecanismos: bloqueio do crescimento anormal de células musculares lisas vasculares (CMLV) e melhora da função endotelial (34, 36, 42, 63-66). Esses mecanismos podem ser responsáveis pela redução da reestenose após stent coronariano verificada em ensaios clínicos e metanálises (48, 50-54).

Há estudos com pequeno número de pacientes analisando o uso de cilostazol após procedimentos endovasculares periféricos, especialmente no segmento fêmoro-poplíteo, com resultados iniciais favoráveis (57, 58, 60, 61). No entanto, não está definido se sua aplicação pode ser estendida a outros sítios arteriais.

O objetivo do trabalho é avaliar se a administração sistêmica de cilostazol reduz a hiperplasia neointimal nas artérias ilíacas de suínos submetidas a angioplastia com cateter balão.

MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e conduzido conforme protocolo da Unidade de Experimentação Animal do HCPA.

Preparação dos animais

Os procedimentos foram realizados em 20 suínos da raça Large White, originados de diferentes matrizes, com idade média de 8 semanas, na Unidade de Experimentação Animal do HCPA, com acompanhamento de um veterinário e uma enfermeira.

Os critérios de exclusão estabelecidos previamente à execução do experimento foram: trombose ou ruptura do segmento submetido a angioplastia; reintervenção devido a sangramento; óbito do animal antes do prazo estabelecido para a retirada dos segmentos arteriais; falhas técnicas no preparo ou no processamento dos tecidos.

Os suínos foram pré-medicados com cetamina (15 mg/kg) e midazolam (0,8 mg/kg) por via intramuscular. Após 10 minutos, foi realizado o acesso à veia cefálica para administração de solução fisiológica 0,9% (5 ml/kg/h). Durante o procedimento, os animais receberam oxigênio 100% através de máscara facial, que acoplada ao focinho permitia a monitoração da frequência respiratória. Também foi monitorada a frequência cardíaca e o reflexo de retirada da pata anterior. Os animais foram mantidos sob sedação profunda, através de administração em bolo de propofol ao efeito. Foi realizada infiltração com lidocaína (4 mg/kg) no local do acesso à artéria femoral. Antes do início do procedimento, foram administrados o analgésico tramadol (2 mg/kg) e o antimicrobiano cefazolina (20 mg/kg).

Técnica de angioplastia com cateter balão

A artéria femoral comum direita foi exposta cirurgicamente. Através de punção direta da artéria femoral comum com agulha 18 G, foi avançado fio guia hidrofílico 0,035 pol e

inserido introdutor 6 Fr de 11 cm. Sob controle ecográfico, o fio guia foi direcionado até a aorta abdominal. Nesse momento, os animais receberam heparina intravenosa (Heptar, Eurofarma) na dose de 100 UI/kg.

A ultrassonografia com Doppler (equipamento TITAN, SonoSite) foi realizada no transoperatório para aferição dos diâmetros da artéria ilíaca comum direita e da aorta abdominal distal. A seguir, realizou-se o posicionamento do cateter balão 6 x 40 mm (Passeo-35, Biotronik) na artéria ilíaca comum direita, a partir da trifurcação da aorta sob controle ecográfico. A angioplastia foi realizada durante 1 minuto com pressão de 8 atm. O diâmetro do cateter balão selecionado foi para se obter o dimensionamento 10-20% superior ao da artéria ilíaca comum nessa faixa etária, semelhante ao adotado nas intervenções em pacientes. Ao término da angioplastia, a ultrassonografia com Doppler foi novamente realizada para confirmação da perviedade arterial do segmento ilíaco.

Após a retirada do introdutor e do fio guia, a artéria femoral comum foi suturada, e a região inguinal fechada com fio inabsorvível. Não houve complicações transoperatórias.

Administração do cilostazol

Os suínos foram randomizados em dois grupos de 10 animais. No grupo 1, foi administrado cilostazol (Vasativ, Eurofarma) 50 mg em duas doses diárias, e o grupo 2 foi considerado controle. Os animais foram marcados com brincos numerados de cores diferentes para adequada identificação.

No período pós-operatório, os animais foram alojados em baias específicas, com água corrente e ração balanceada para a idade e sem suplementação lipídica adicional.

Análise histológica

Após 30 dias, os animais foram novamente anestesiados e submetidos a laparotomia mediana com exposição da aorta abdominal e das artérias ilíacas. Os espécimes cirúrgicos

contendo a aorta abdominal distal e as artérias ilíacas foram removidos em bloco após uma dose letal de tiopental sódico a 2,5%.

Para avaliação com a microscopia óptica, os espécimes cirúrgicos foram irrigados com solução de NaCl 0,9% e fixados em solução de formalina tamponada neutra a 10%. As artérias ilíacas comuns direitas (submetidas a angioplastia) e esquerdas (não submetidas a angioplastia) foram seccionadas transversalmente em três pontos medidos a partir da trifurcação aórtica: 10 mm, 20 mm e 30 mm. Esses pontos correspondem, respectivamente, às localizações 25%, 50% e 75% do comprimento do balão utilizado (40 mm). Os segmentos foram incluídos em blocos de parafina, seccionados em cortes de 4 µm e corados com as técnicas hematoxilina-eosina, de Verhoeff e orceína.

As imagens dos cortes histológicos foram digitalizadas para a análise morfométrica através dos programas de morfometria e análise de imagem Image-Pro Plus versão 6.0 (Media Cybernetics – Silver Spring, EUA) e Image (Scion Corporation – EUA). As imagens dos cortes histológicos foram digitalizadas a partir da microscopia óptica convencional: microscópio com lentes plano-acromáticas (Zeiss Axiostar – Alemanha) com fototubo ajustado para magnificação de 0,25, câmera de circuito fechado colorida (Sony DXC-151 – Japão) e placa de conversão analógica digital (Image-Pro Plus Capture Kit, Media Cybernetics – Silver Spring, EUA), gerando arquivos de imagem com 2.560 x 1.920 pixels. As imagens foram digitalizadas com aumento microscópico de 40 vezes.

A planimetria das áreas do lúmen arterial, da camada íntima e da camada média foi realizada com técnica automatizada, sem a interferência do observador. A área do lúmen foi obtida por medida direta da área delimitada pelo endotélio; a da íntima, subtraindo-se a área do lúmen da delimitada pela lâmina elástica interna; a área da média, subtraindo-se a área do lúmen e da íntima da delimitada pela lâmina elástica externa. Os resultados das medidas morfométricas das áreas do lúmen, da íntima e da média estão apresentados em números

absolutos (milímetros quadrados), utilizando-se a média das áreas dos três segmentos obtidos de cada artéria conforme descrito previamente. Adicionalmente, foram calculados a soma da área da média e da área da íntima e o percentual de obstrução neointimal dividindo-se a área da íntima pela área delimitada pela lâmina elástica interna.

Análise estatística

A análise dos dados foi realizada através do programa IBM SPSS Statistics 19. Na estatística descritiva, utilizou-se a média e o desvio padrão para as variáveis paramétricas e a mediana e o intervalo interquartis para as variáveis não paramétricas. Na comparação entre os grupos, foram utilizados o teste *t* de Student e o teste de Mann-Whitney. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Todos os 20 animais submetidos a angioplastia concluíram o estudo. A perviedade das artérias ilíacas foi avaliada diretamente durante a retirada dos tecidos para análise histológica.

Não houve diferença no peso dos animais entre os grupos (24,83 *versus* 22,90 kg; $p = 0,34$). O diâmetro da artéria ilíaca comum direita (média de três aferições) também não foi diferente (5,07 *versus* 4,87 mm; $p = 0,39$).

Comparando-se a área da íntima na artéria ilíaca comum direita (submetida a angioplastia) com a área da íntima na artéria ilíaca comum esquerda (não submetida a angioplastia), observa-se hiperplasia neointimal significativa (0,228 *versus* 0,119 mm²; $p = 0,00001$) (Figura 1 e 2). Essa diferença persiste mesmo quando estratificada pelo grupo 1 (cilostazol) e grupo 2 (controle) (Figura 3).

Os dados da morfometria digital das artérias ilíacas comuns direitas submetidas a angioplastia com cateter balão são apresentados na Tabela 1. Comparando os grupos (cilostazol *versus* controle), não há diferença na área do lúmen, área da íntima, área da média, área da média + íntima e no percentual de obstrução neointimal (Tabela 1 e Figura 4).

DISCUSSÃO

A reestenose após angioplastia com cateter balão é causada pelo remodelamento elástico negativo e pela proliferação e migração das CMLV (17). Nesse modelo, a resposta da parede arterial ao dano provocado pela angioplastia é a liberação de fatores de crescimento e outros fatores biologicamente ativos, que mudam a composição da matriz extracelular e promovem a mudança fenotípica das CMLV de contráteis para sintéticas (desdiferenciação), levando à proliferação das células na camada média e migração para a camada íntima, formando a neointima (15).

Modelos animais com suínos refletem melhor a fisiopatologia da reestenose que ocorre nos humanos, com fases da formação neointimal similares (67-70). Além disso, os suínos apresentam semelhanças na anatomia vascular, no sistema de coagulação e na fisiologia; e em animais de médio porte, podem ser utilizados os mesmos materiais utilizados em humanos, sem a necessidade de adaptações (70).

O modelo experimental suíno de angioplastia com cateter balão em artérias coronárias conseguiu provocar hiperplasia neointimal significativa somente quando houve ruptura da lâmina elástica interna (71). Em artérias carótidas de ratos, os resultados são semelhantes (17). Trabalho prévio comparando angioplastia *versus* angioplastia com stent em artérias ilíacas de suínos concluiu que o uso do stent provoca maior hiperplasia neointimal (72). Esses trabalhos prévios também utilizavam a técnica de múltiplas angioplastias com o objetivo de provocar maior lesão à parede arterial. Neste estudo, houve hiperplasia neointimal significativa mesmo utilizando o sobredimensionamento do cateter balão comumente utilizado na prática clínica de até 20% e insuflação única do cateter balão, o que pode ter provocado menor lesão à parede arterial em comparação a estudos que utilizam um maior sobredimensionamento e múltiplas insuflações.

A opção pela utilização da técnica sem stent reside no fato de que, apesar de a maioria dos trabalhos avaliar o uso de cilostazol em procedimentos com uso de stent em artérias coronárias (50-52), carótidas ou periféricas (58, 60), a angioplastia isolada com cateter balão no segmento ilíaco ainda permanece como procedimento importante na terapêutica endovascular (6).

Estudos experimentais demonstraram que em torno de 4 semanas a hiperplasia neointimal está completa, semelhante à identificada nos humanos em 6 a 12 meses (73-75). Um período maior de administração de cilostazol provavelmente não acrescentaria benefício.

Uma das limitações deste estudo é a avaliação da resposta da parede de artérias normais. A extrapolação dos dados é limitada, pois no contexto clínico as artérias tratadas apresentam estenoses ou oclusões ateroscleróticas. O uso de dieta aterogênica parece não aumentar a hiperplasia neointimal em resposta à lesão da parede vascular em modelo suíno (76).

A dose de cilostazol de 50 mg em duas doses diárias utilizada neste estudo é similar à dose máxima utilizada em adultos, e não foram observados efeitos adversos ou alteração no padrão comportamental nos suínos tratados. Outra limitação do estudo é a não administração de outros agentes antiplaquetários, como ácido acetilsalicílico, clopidogrel e ticlopidina, utilizados em estudos clínicos (57, 58). No entanto, a utilização isolada do cilostazol permite avaliar o efeito da droga, já que a associação com outros fármacos pode ter efeito biológico diverso.

Estudos prévios com modelos animais demonstraram que a administração do cilostazol reduziu hiperplasia neointimal em modelos animais que estudaram artérias coronárias (47), carótidas (77) e em enxertos venosos (45, 46). Somente um estudo, em modelo canino, avaliou o efeito do cilostazol na artéria ilíaca. Foi realizada angioplastia com stent associado a embolização com molas da femoral comum para redução do fluxo no eixo

ilíaco. Os resultados demonstraram redução da hiperplasia neointimal e ausência de oclusão trombótica no grupo cilostazol, comparativamente ao grupo controle (43).

Este é o primeiro estudo em suínos que avaliou o uso de cilostazol na hiperplasia neointimal em artérias ilíacas. Além disso, o trabalho utilizou a técnica de angioplastia guiada por ultrassonografia com Doppler, o que permitiu aferir com precisão o diâmetro arterial e a consequente escolha adequada do diâmetro do cateter balão.

O dados deste trabalho permitem concluir que o uso de cilostazol 50 mg em duas doses diárias durante 30 dias não reduziu a hiperplasia neointimal em artérias ilíacas de suínos submetidas a angioplastia.

AGRADECIMENTOS E FONTES DE FINANCIAMENTO

Os autores agradecem a Unidade de Experimentação Animal e a Unidade de Patologia Experimental do HCPA pela realização do experimento; e ao laboratório Eurofarma pela doação do cilostazol utilizado no experimento.

Este projeto foi financiado pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do HCPA.

REFERÊNCIAS

1. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG, et al. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*. 2007;33 Suppl 1:S1-75.
2. Kudo T, Chandra FA, Ahn SS. The effectiveness of percutaneous transluminal angioplasty for the treatment of critical limb ischemia: a 10-year experience. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. 2005 Mar;41(3):423-35; discussion 35.
3. Faglia E, Dalla Paola L, Clerici G, Clerissi J, Graziani L, Fusaro M, et al. Peripheral angioplasty as the first-choice revascularization procedure in diabetic patients with critical limb ischemia: prospective study of 993 consecutive patients hospitalized and followed between 1999 and 2003. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*. 2005 Jun;29(6):620-7.
4. Graziani L, Silvestro A, Bertone V, Manara E, Alicandri A, Parrinello G, et al. Percutaneous transluminal angioplasty is feasible and effective in patients on chronic dialysis with severe peripheral artery disease. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2007 Apr;22(4):1144-9.
5. Schwartz RS. Pathophysiology of restenosis: interaction of thrombosis, hyperplasia, and/or remodeling. *Am J Cardiol*. 1998 Apr 9;81(7A):14E-7E.
6. Kudo T, Chandra FA, Ahn SS. Long-term outcomes and predictors of iliac angioplasty with selective stenting. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. 2005 Sep;42(3):466-75.
7. Piffaretti G, Tozzi M, Lomazzi C, Rivolta N, Lagana D, Carrafiello G, et al. Mid-term results of endovascular reconstruction for aorto-iliac obstructive disease. *International angiology : a journal of the International Union of Angiology*. 2007 Mar;26(1):18-25.
8. Ye W, Liu CW, Ricco JB, Mani K, Zeng R, Jiang J. Early and late outcomes of percutaneous treatment of TransAtlantic Inter-Society Consensus class C and D aorto-iliac lesions. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. 2011 Jun;53(6):1728-37.
9. Schror K. The pharmacology of cilostazol. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2002 Mar;4 Suppl 2:S14-9.
10. da Rosa MP, Baroni GV, Portal VL. Cilostazol, a phosphodiesterase III inhibitor: future perspectives in atherosclerosis. *Arq Bras Cardiol*. Brazil2006. p. e222-6.
11. Weintraub WS. The vascular effects of cilostazol. *The Canadian journal of cardiology*. 2006 Feb;22 Suppl B:56B-60B.
12. Liu Y, Shakur Y, Yoshitake M, Kambayashi Ji J. Cilostazol (pletal): a dual inhibitor of cyclic nucleotide phosphodiesterase type 3 and adenosine uptake. *Cardiovascular drug reviews*. 2001 Winter;19(4):369-86.

13. Otsuki M, Saito H, Xu X, Sumitani S, Kouhara H, Kurabayashi M, et al. Cilostazol represses vascular cell adhesion molecule-1 gene transcription via inhibiting NF-kappaB binding to its recognition sequence. *Atherosclerosis*. Ireland2001. p. 121-8.
14. Lee KM, Lee HJ, Kim MK, Kim HS, Jung GS, Hur SH, et al. Cilostazol inhibits high glucose- and angiotensin II-induced type 1 plasminogen activator inhibitor expression in artery wall and neointimal region after vascular injury. *Atherosclerosis*. Ireland2009. p. 391-8.
15. Jung WK, Lee DY, Park C, Choi YH, Choi I, Park SG, et al. Cilostazol is anti-inflammatory in BV2 microglial cells by inactivating nuclear factor-kappaB and inhibiting mitogen-activated protein kinases. *Br J Pharmacol*. England2010. p. 1274-85.
16. Chen WJ, Chen YH, Lin KH, Hsuan Ting C, Yeh YH. Cilostazol promotes vascular smooth muscles cell differentiation through the cAMP response element-binding protein-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. United States2011. p. 2106-13.
17. Tsuchikane E, Takeda Y, Nasu K, Awata N, Kobayashi T. Balloon angioplasty plus cilostazol administration versus primary stenting of small coronary artery disease: final results of COMPASS. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2004 Sep;63(1):44-51.
18. Douglas JS, Jr., Holmes DR, Jr., Kereiakes DJ, Grines CL, Block E, Ghazzal ZM, et al. Coronary stent restenosis in patients treated with cilostazol. *Circulation*. 2005 Nov 1;112(18):2826-32.
19. Biondi-Zoccai GG, Lotrionte M, Anselmino M, Moretti C, Agostoni P, Testa L, et al. Systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials appraising the impact of cilostazol after percutaneous coronary intervention. *American heart journal*. United States2008. p. 1081-9.
20. Lee SW, Park SW, Kim YH, Yun SC, Park DW, Lee CW, et al. Drug-eluting stenting followed by cilostazol treatment reduces late restenosis in patients with diabetes mellitus the DECLARE-DIABETES Trial (A Randomized Comparison of Triple Antiplatelet Therapy with Dual Antiplatelet Therapy After Drug-Eluting Stent Implantation in Diabetic Patients). *Journal of the American College of Cardiology*. United States2008. p. 1181-7.
21. Tamhane U, Meier P, Chetcuti S, Chen KY, Rha SW, Grossman MP, et al. Efficacy of cilostazol in reducing restenosis in patients undergoing contemporary stent based PCI: a meta-analysis of randomised controlled trials. *EuroIntervention : journal of EuroPCR in collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology*. 2009 Aug;5(3):384-93.
22. Lee SW, Park SW, Kim YH, Yun SC, Park DW, Lee CW, et al. A randomized, double-blind, multicenter comparison study of triple antiplatelet therapy with dual antiplatelet therapy to reduce restenosis after drug-eluting stent implantation in long coronary lesions: results from the DECLARE-LONG II (Drug-Eluting Stenting Followed by Cilostazol Treatment Reduces Late Restenosis in Patients with Long Coronary Lesions) trial. *Journal of the American College of Cardiology*. 2011 Mar 15;57(11):1264-70.
23. Iida O, Nanto S, Uematsu M, Morozumi T, Kotani J, Awata M, et al. Cilostazol reduces target lesion revascularization after percutaneous transluminal angioplasty in the femoropopliteal artery. *Circ J*. 2005 Oct;69(10):1256-9.
24. Iida O, Nanto S, Uematsu M, Morozumi T, Kitakaze M, Nagata S. Cilostazol reduces restenosis after endovascular therapy in patients with femoropopliteal lesions. *Journal of*

vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter. United States 2008. p. 144-9.

25. Ishii H, Kumada Y, Toriyama T, Aoyama T, Takahashi H, Yamada S, et al. Cilostazol improves long-term patency after percutaneous transluminal angioplasty in hemodialysis patients with peripheral artery disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. United States 2008. p. 1034-40.

26. Soga Y, Iida O, Hirano K, Suzuki K, Kawasaki D, Miyashita Y, et al. Impact of cilostazol after endovascular treatment for infrainguinal disease in patients with critical limb ischemia. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter: Inc*; 2011.

27. Indolfi C, Torella D, Coppola C, Stabile E, Esposito G, Curcio A, et al. Rat carotid artery dilation by PTCA balloon catheter induces neointima formation in presence of IEL rupture. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2002 Aug;283(2):H760-7.

28. Mongiardo A, Curcio A, Spaccarotella C, Parise S, Indolfi C. Molecular mechanisms of restenosis after percutaneous peripheral angioplasty and approach to endovascular therapy. *Current drug targets Cardiovascular & haematological disorders*. 2004 Sep;4(3):275-87.

29. Schwartz RS, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vliestra RE, Holmes DR. Restenosis after balloon angioplasty. A practical proliferative model in porcine coronary arteries. *Circulation*. 1990 Dec;82(6):2190-200.

30. Schwartz RS. Neointima and arterial injury: dogs, rats, pigs, and more. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1994 Dec;71(6):789-91.

31. Johnson GJ, Griggs TR, Badimon L. The utility of animal models in the preclinical study of interventions to prevent human coronary artery restenosis: analysis and recommendations. On behalf of the Subcommittee on Animal, Cellular and Molecular Models of Thrombosis and Haemostasis of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thrombosis and haemostasis*. 1999 May;81(5):835-43.

32. Bayes-Genis A, Kantor B, Keelan PC, Altman JD, Lubbe DF, Kang JH, et al. Restenosis and Hyperplasia: Animal Models. *Current interventional cardiology reports*. 2000 Nov;2(4):303-8.

33. Humphrey WR, Simmons CA, Toombs CF, Shebuski RJ. Induction of neointimal hyperplasia by coronary angioplasty balloon overinflation: comparison of feeder pigs to Yucatan minipigs. *American heart journal*. 1994 Jan;127(1):20-31.

34. Castro Junior C, Pereira AH, Pasa MB. Morphometric analysis of the intimal reaction after stent implantation in iliac arteries submitted to angioplasty in pigs. *Acta cirurgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia*. 2006 May-Jun;21(3):139-43.

35. De Meyer GR, Bult H. Mechanisms of neointima formation--lessons from experimental models. *Vascular medicine (London, England)*. 1997;2(3):179-89.

36. Verheye S, Salame MY, Robinson KA, Post MJ, Carrozza JP, Jr., Baim DS, et al. Short- and long-term histopathologic evaluation of stenting using a self-expanding nitinol stent in pig carotid and iliac arteries. *Catheter Cardiovasc Interv*. 1999 Nov;48(3):316-23.

37. Virmani R, Kolodgie FD, Farb A, Lafont A. Drug eluting stents: are human and animal studies comparable? *Heart (British Cardiac Society)*. 2003 Feb;89(2):133-8.

38. Franca LH, Pereira AH, Perini SC. Self-expandable nitinol stent placement in homocysteinemic porcine aorta. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*. 2008 Apr;63(2):229-36.
39. Tsuchikane E, Suzuki T, Katoh O. Examination of anti-intima hyperplastic effect on cilostazol-eluting stent in a porcine model. *The Journal of invasive cardiology*. 2007 Mar;19(3):109-12.
40. Ishizaka N, Taguchi J, Kimura Y, Ikari Y, Aizawa T, Togo M, et al. Effects of a single local administration of cilostazol on neointimal formation in balloon-injured rat carotid artery. *Atherosclerosis*. Ireland1999. p. 41-6.
41. Kudo FA, Kondo Y, Muto A, Miyazaki K, Dardik A, Nishibe M, et al. Cilostazol suppresses neointimal hyperplasia in canine vein grafts. *Surgery today*. 2009;39(2):128-32.
42. Yamamoto K, Onoda K, Sawada Y, Fujinaga K, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, et al. Locally applied cilostazol suppresses neointimal hyperplasia and medial thickening in a vein graft model. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. Japan2007. p. 322-30.
43. Kubota Y, Kichikawa K, Uchida H, Maeda M, Nishimine K, Makutani S, et al. Pharmacologic treatment of intimal hyperplasia after metallic stent placement in the peripheral arteries. An experimental study. *Investigative radiology*. 1995 Sep;30(9):532-7.

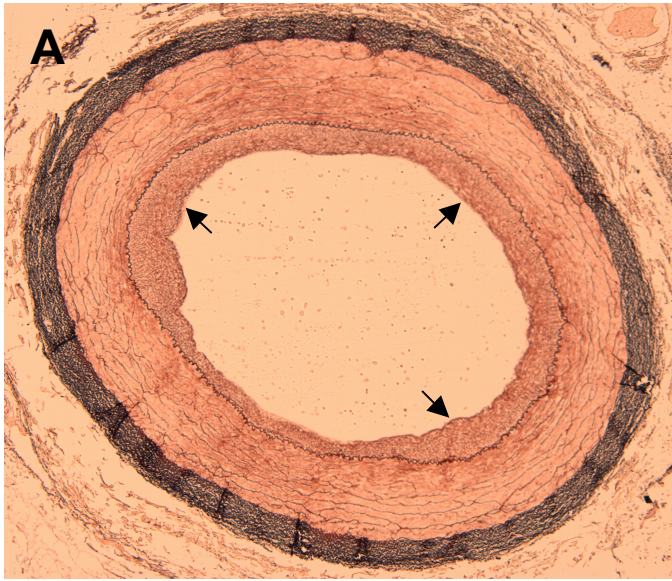


Figura 1 - Fotomicrografia das artérias ilíacas comuns de um mesmo suíno (coloração pelo método orceína, aumento original de 40 vezes). Em A, artéria ilíaca comum direita submetida a angioplastia demonstrando a hiperplasia neointimal (setas). Em B, artéria ilíaca comum esquerda não submetida a angioplastia (artéria normal).

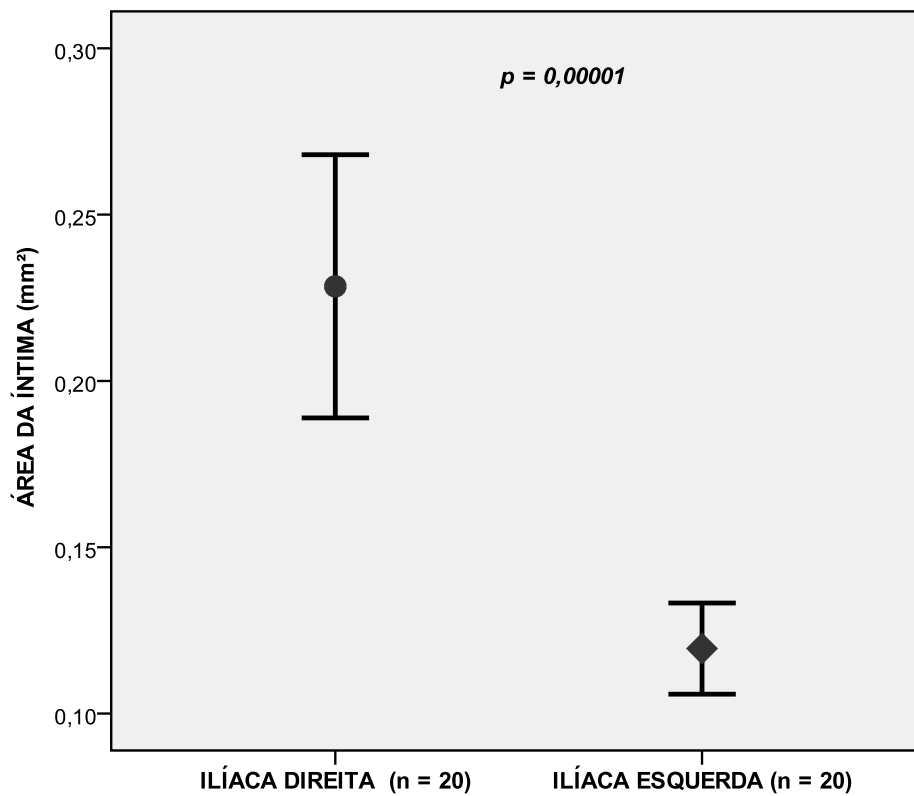


Figura 2 - Gráfico comparando a área da íntima na artéria ilíaca direita (submetida a angioplastia) e na ilíaca esquerda (não submetida a angioplastia). O valor do p demonstra que houve hiperplasia neointimal estatisticamente significativa nas artérias submetidas a angioplastia.

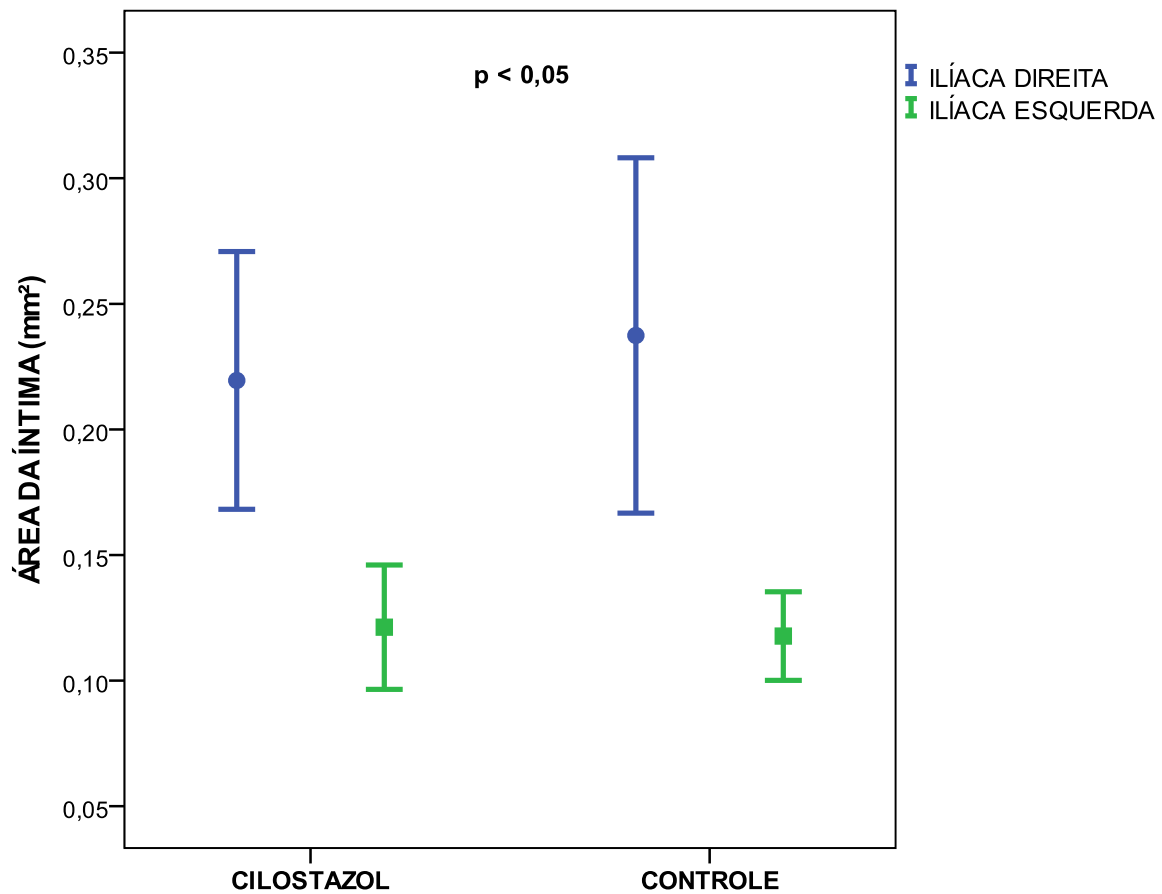


Figura 3 - Gráfico comparando a área da íntima na artéria ilíaca direita (submetida a angioplastia) e na ilíaca esquerda (não submetida a angioplastia). O valor do p demonstra que houve hiperplasia neointimal estatisticamente significativa nas artérias submetidas a angioplastia, mesmo quando estratificado pelos grupos cilostazol e controle.

Tabela 1 - Dados da morfometria digital

	Cilostazol (n = 10)	Controle (n = 10)	p
Área do lúmen (mm ²)	2,277±0,654	2,575±0,594	0,08
Área da íntima (mm ²)	0,219±0,071	0,237±0,098	0,64
Área da média (mm ²)	2,262±0,449	2,393±0,492	0,53
Área da média + íntima (mm ²)	2,481±0,478	2,631±0,508	0,50
Obstrução neointimal (%)	8,857±3,464	9,257±4,417	0,82

Grupo 1 = Cilostazol 50 mg duas vezes ao dia
Grupo 2 = Controle

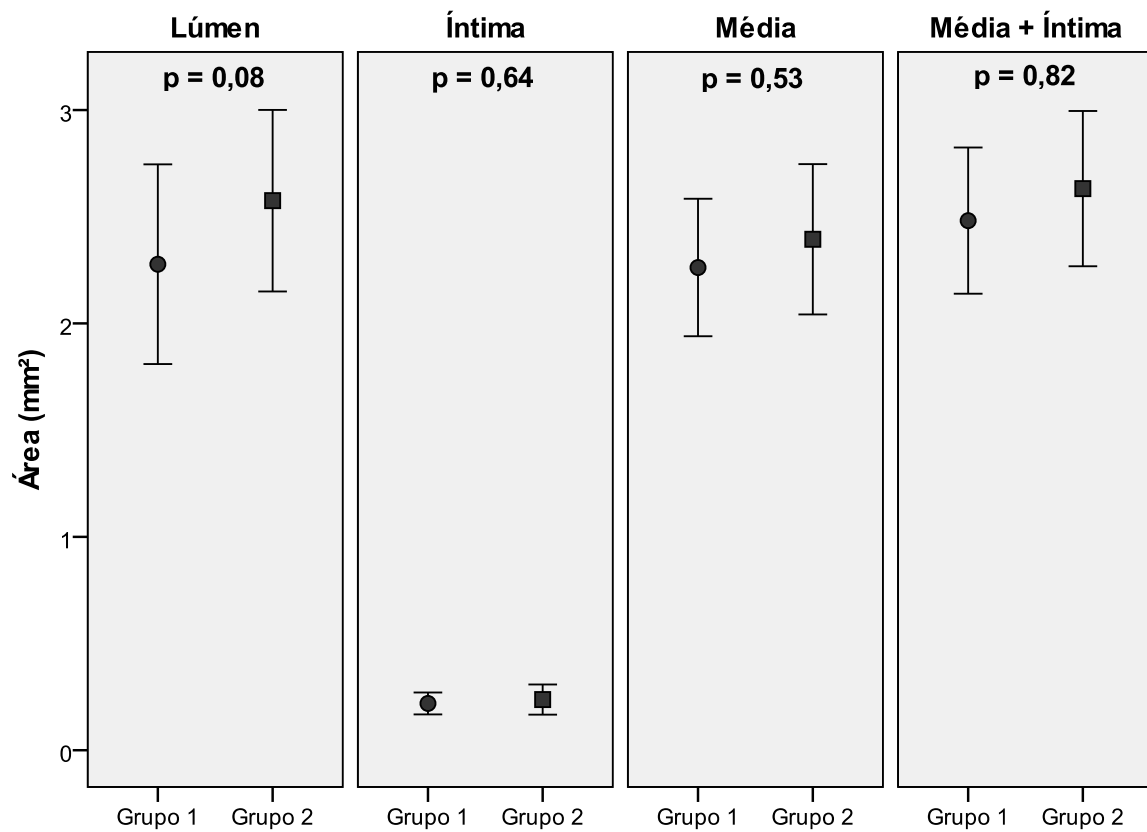


Figura 4 - Gráfico comparando área do lúmen, área da íntima, área da média e área da média + íntima entre os grupos. O valor do p demonstra que não houve diferença entre os grupos cilostazol e controle.

ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

Effect of cilostazol on neointimal hyperplasia in iliac arteries of pigs after transluminal angioplasty

Joel Alex Longhi¹; Adamastor Humberto Pereira²

1. Vascular surgeon, graduate student, Master's Program in Surgical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

2. Vascular surgeon, Associate Professor, Master's Program Advisor, Department of Surgery, Graduate Program in Surgical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Address correspondence to:

Joel Alex Longhi

Ramiro Barcelos 2350/600 CEP 90035-903 Porto Alegre, Brazil

e-mail: joelalexlonghi@yahoo.com.br

ABSTRACT

Objective: To evaluate whether systemic administration of cilostazol reduces neointimal hyperplasia in the iliac arteries of pigs after balloon angioplasty.

Methods: This study was conducted in the Experimental Animal Unit of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. Twenty pigs underwent angioplasty of the right common iliac artery under Doppler ultrasound guidance using 6x40-mm balloon catheters. The animals were randomized to one of two groups: group 1 (n = 10) received 50 mg cilostazol in two doses a day; and group 2 (n = 10) was the control group. After 30 days, the animals were killed and their iliac arteries were prepared for histological analysis. Histological images were digitalized and analyzed using digital morphometry. The Student *t* and the Mann-Whitney tests were used for statistical analyses.

Results: Iliac arteries that underwent angioplasty had significantly more neointimal hyperplasia than those with no angioplasty (0.228 versus 0.119 mm²; p = 0.0001) Group 1 (cilostazol) and 2 (control) had no significant differences in lumen (2.277 versus 2.575 mm²; p = 0.08), intima (0.219 versus 0.237 mm²; p = 0.64) or media (2.262 versus 2.393 mm²; p = 0.53) area, or in percentage of neointimal obstruction (8.857 versus 9.257 %; p = 0.82).

Conclusion: The use of 50 mg cilostazol in two doses a day did not reduce neointimal hyperplasia in iliac arteries of pigs that underwent balloon angioplasty.

Key words: neointimal hyperplasia, cilostazol, transluminal angioplasty, iliac artery

INTRODUCTION

The prevalence of occlusive peripheral arterial disease, an important cause of morbidity, may reach 20% in patients older than 70 years (1). When an intervention is indicated, the endovascular technique is commonly selected for the initial treatment of most classifications of lesion morphology in different artery sites (1, 2) and in various clinical conditions (3,4). The success rate of initial endovascular treatment is high and greater than 90% in the aortoiliac segment, but patency decreases along time due to restenosis (5-8).

Several pharmacological agents have been studied in the attempt to reduce the risk of restenosis after percutaneous vascular procedures. Cilostazol, which has an antiplatelet, vasodilatory and antiproliferative effect (9-11), is a selective phosphodiesterase III inhibitor that promotes the increase of adenosine 3',5'-monophosphate concentrations in platelets and smooth muscle cells. Two mechanisms in this sequence of events stimulate the rapid regeneration of endothelial cells that inhibit neointimal formation: suppression of the abnormal growth of vascular smooth muscle cells (VSMC) and improvement of the endothelial function (34, 36, 42, 63-66). These mechanisms may be responsible for the reduction of restenosis after coronary stenting, as reported in clinical trials and meta-analyses (48, 50-54).

Studies with small numbers of patients evaluated the use of cilostazol after peripheral endovascular procedures, particularly in the femoropopliteal segment, and initial results were positive (57, 58, 60, 61). However, no study has defined whether the use of cilostazol may be extended to other arterial sites.

This study evaluated the effect of the systemic administration of cilostazol on the reduction of neointimal hyperplasia in the iliac arteries of pigs that underwent balloon angioplasty.

METHODS

This study was approved by the Ethics Committee of the Graduate Studies and Research Group of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil, and was conducted in agreement with the protocols of the HCPA Animal Experimentation Unit.

Animal Preparation

Twenty Large White pigs from different dams and mean age of 8 weeks were used in the study. Procedures were conducted in the HCPA Animal Experimentation Unit and were followed by a veterinary and a nurse.

Exclusion criteria, defined before the experiment was conducted, were: thrombosis or rupture of the segment that underwent angioplasty; repeat intervention due to bleeding; and animal death before the time defined for the removal of arterial segments; or technical errors in tissue preparation or processing.

The pigs were premedicated with IM ketamine (15 mg/kg) and midazolam (0.8 mg/kg). After 10 minutes, access to the cephalic vein was obtained for the administration of 0.9% saline solution (5 ml/kg/h). During the procedure, the animals received 100% oxygen using a face mask that was fitted to the snout of the animals and was used to monitor respiratory rate. Heart rate and pedal reflex were also monitored. Propofol was administered as a bolus to maintain profound animal sedation. Lidocaine (4 mg/kg) was infiltrated at the site of access to the femoral artery. Before the beginning of the procedure, the analgesic drug tramadol (2 mg/kg) and the antimicrobial cefazolin (20 mg/kg) were administered.

Balloon angioplasty

The right common femoral artery was surgically exposed. The common femoral artery was directly punctured using an 18-G needle, after which a hydrophilic 0.035” guidewire was advanced and an 11-cm 6 Fr sheath was inserted. Under ultrasound control, the guidewire was

inserted up to the abdominal aorta. At that moment, the animals received 100 IU/kg heparin (Heptar, Eurofarma, São Paulo, Brazil) intravenously.

Intraoperative Doppler ultrasound (TITAN scanner, SonoSite, Bothell, WA) was used to measure the diameters of the right common iliac artery and the distal abdominal aorta. After that, a 6x40-mm balloon catheter (Passeo-35, Biotronik, Lake Oswego, OR) was placed, under ultrasound guidance, in the right common iliac artery starting at the aortic trifurcation. Angioplasty was performed at 8-atm pressure for 1 minute. The balloon catheter diameter was programmed to achieve a 10-20% greater size than that of the common iliac artery in this age group, similar to that adopted in human procedures. At the end of angioplasty, Doppler ultrasound was again used to confirm arterial patency in the iliac segment.

After the removal of the sheath and guidewire, the common femoral artery was sutured, and the inguinal incision was closed with nonabsorbable suture. There were no intraoperative complications.

Cilostazol administration

Twenty animals were randomized to one of two groups. In group 1, the animals received cilostazol 50 mg twice a day; group 2 was the control group. The animals received numbered ear tags of different colors for identification.

After the operation, the animals were housed in individual pens with running water and were fed a balanced diet for their age, with no addition of lipid supplements.

Histological analysis

After 30 days, the animals were again anesthetized for midline laparotomy, which exposed the abdominal aorta and the iliac arteries. Surgical specimens containing the distal abdominal aorta and the iliac arteries were removed en bloc after the administration of a lethal dose of 2.5% sodium thiopental.

For analysis under light microscopy, surgical specimens were irrigated with 0.9% NaCl and fixed in 10% neutral buffered formalin. The right common iliac arteries (which underwent angioplasty) and the left ones (which did not) were sectioned transversely at three points defined according to their distance from the aortic trifurcation: 10 mm, 20 mm and 30 mm. These points corresponded to 20%, 50% and 75% of the length of the balloon used (40 mm). The segments were embedded in paraffin blocks, and 4- μ m sections were obtained and stained using the hematoxylin-eosin, Verhoeff and orcein techniques.

The images of the histological sections were digitalized for morphometric analysis using Image-Pro Plus 6.0 software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) and Image (Scion Corporation, Frederick, MD). Digitalized images were first captured using a conventional light microscope with plan achromatic lenses (Zeiss Axiostar, Göttingen, Germany) and phototube adjusted to 0.25 magnification, color closed circuit camera (DXC 151, Sony, Tokyo, Japan) and analog-digital converter board (Image-Pro Plus Capture Kit, Media Cybernetics, Silver Spring, MD), which generated 2560 x 1920-pixel image files. Images were digitalized at a microscopic magnification of 40x.

Planimetry of areas of the arterial lumen and intima and media layers was performed automatically without the interference of the examiner. Lumen area was calculated by direct measurement of the area delineated by the endothelium; of the intima, by subtracting the lumen area from the area delineated by the internal elastic lamina; of the media, by subtracting the lumen and intima area from the area delineated by the external elastic lamina. The results of morphometric measurements of the lumen, intima and media areas were expressed in absolute numbers (mm^2) using the mean area of the three segments for each artery, as described above. In addition, the sum of the media and the intima areas and the percentage of neointimal obstruction were calculated by dividing the intima area by the area delineated by the internal elastic lamina.

Statistical analysis

The IBM SPSS 19 was used for statistical analyses. The results of descriptive statistics were expressed as means and the standard deviations for parametric variables and medians and interquartile ranges for nonparametric variables. The Student *t* and the Mann-Whitney tests were used for comparisons between groups. The level of significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

All 20 animals that underwent angioplasty completed the study. Iliac artery patency was directly evaluated during removal of specimens for histological analysis.

There were no differences in animal weight between groups (24.83 versus 22.90 kg; $p = 0.34$). The diameter of the right common iliac artery (mean of 3 measurements) was also not statistically different (5.07 versus 4.87 mm; $p = 0.39$).

The comparison of the intima area in the right common iliac artery (which underwent angioplasty) and in the left common iliac artery (which did not undergo angioplasty) revealed that neointimal hyperplasia was significantly different (0.228 versus 0.119 mm²; $p = 0.00001$) (Figures 1 and 2). This difference remained important even after stratification into group 1 (cilostazol) and group 2 (control) (Figure 3).

The results of digital morphometry of the right common iliac arteries that underwent balloon angioplasty are shown in Table 1. The comparison of groups (cilostazol versus control) did not reveal any differences in lumen area, intima area, media area, media+intima area or percentage of neointimal obstruction (Table 1 and Figure 4).

DISCUSSION

Restenosis after balloon angioplasty results from negative remodeling and proliferation and migration of vascular smooth muscle cells (VSMC) (27). The artery wall responds to the damage resulting from angioplasty by releasing growth factors and other biologically active factors that change the composition of the extracellular matrix and promote the phenotypic change of VSMC from contractile to synthetic (dedifferentiation), which leads to cell proliferation in the media and migration to the intima and, thus, neointima formation (28).

Porcine models provide better reproductions of the physiopathology of restenosis in human beings and have similar neointima formation phases (29-32). In addition, pigs have a similar vascular anatomy, coagulation system and physiology. In mid-sized pigs, the same materials used in human beings may be tested, without having to adapt them to animal size (32).

In experimental porcine models of balloon angioplasty in coronary arteries, significant neointimal hyperplasia was found only in the case of rupture of the internal elastic lamina (33). In carotid arteries of rats, results were similar (27). Studies that compared angioplasty and stent angioplasty in pig iliac arteries concluded that the use of stents result in greater neointimal hyperplasia (34). Those previous studies also used the multiple angioplasty technique to produce greater damage to the artery wall. In our study, there was significant neointimal hyperplasia even when the balloon catheter commonly used in clinical practice was oversized in up to 20% and was inflated only once, which might have produced a smaller lesion on the artery wall than that found in studies that used greater oversizing and multiple inflations.

We chose a technique without stents because, although most studies evaluated the use of cilostazol in stent procedures in coronary arteries (18, 20, 22), carotids or peripheral

arteries (24, 26), independent balloon angioplasty in the iliac segment remains an important procedure in vascular treatments (6).

Experimental studies showed that neointimal hyperplasia in animals is complete after about 4 weeks and similar to that found in human beings at 6 to 12 months (35, 37). A longer cilostazol administration time might not bring any benefits.

One of the limitations of this study was the evaluation of the response on the wall of normal arteries. Data extrapolation should be limited because, in clinical contexts, arteries usually have stenosis or atherosclerotic occlusions. The use of an atherogenic diet does not seem to increase neointimal hyperplasia in response to lesions on the vessel wall in a porcine model (38).

The 50 mg cilostazol administered in two doses a day in our study is similar to the maximum dose used in adults, and no adverse effects or changes in the behavioral pattern of the pigs under study were noted. Another limitation of this study was the fact that there was no administration of other antiplatelet agents, such as acetylsalicylic acid (ASA), clopidogrel and ticlopidine, used in clinical studies (23, 14). However, the independent use of cilostazol made it possible to evaluate its effect, and the association with other drugs might have had a diverse biological effect.

Previous studies using animal models showed that the administration of cilostazol reduced neointimal hyperplasia in coronary arteries (39), carotid arteries (40) and vein grafts (41, 42). Only one study, which used a canine model, evaluated the effect of cilostazol on the iliac artery. Angioplasty of the common femoral artery associated with the use of embolization coils was performed to reduce blood flow in the iliac artery. There was a reduction in neointimal hyperplasia and no thrombotic occlusion in the cilostazol group when compared with the control group (43).

This is the first study with pigs that evaluated the effect of cilostazol on neointimal hyperplasia in iliac arteries. In addition, it used an angioplasty technique that incorporated Doppler ultrasound guidance, which enabled the accurate measurement of arterial diameters and, consequently, the selection of the appropriate balloon catheter diameter.

Data in this study suggest that the use of 50 mg cilostazol in two doses a day for 30 days did not reduce neointimal hyperplasia in iliac arteries of pigs that underwent balloon angioplasty.

ACKNOWLEDGEMENTS AND FINANCIAL SUPPORT

The authors thank the Animal Experimentation Unit and the Experimental Pathology Unit of Hospital de Clínicas de Porto Alegre for their support in conducting this study, and Eurofarma for the donation of the cilostazol used in the experiments.

This study received a grant from the Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) of HCPA.

REFERENCES

1. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG, et al. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*. 2007;33 Suppl 1:S1-75.
2. Kudo T, Chandra FA, Ahn SS. The effectiveness of percutaneous transluminal angioplasty for the treatment of critical limb ischemia: a 10-year experience. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. 2005 Mar;41(3):423-35; discussion 35.
3. Faglia E, Dalla Paola L, Clerici G, Clerissi J, Graziani L, Fusaro M, et al. Peripheral angioplasty as the first-choice revascularization procedure in diabetic patients with critical limb ischemia: prospective study of 993 consecutive patients hospitalized and followed between 1999 and 2003. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*. 2005 Jun;29(6):620-7.
4. Graziani L, Silvestro A, Bertone V, Manara E, Alicandri A, Parrinello G, et al. Percutaneous transluminal angioplasty is feasible and effective in patients on chronic dialysis with severe peripheral artery disease. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2007 Apr;22(4):1144-9.
5. Schwartz RS. Pathophysiology of restenosis: interaction of thrombosis, hyperplasia, and/or remodeling. *Am J Cardiol*. 1998 Apr 9;81(7A):14E-7E.
6. Kudo T, Chandra FA, Ahn SS. Long-term outcomes and predictors of iliac angioplasty with selective stenting. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. 2005 Sep;42(3):466-75.
7. Piffaretti G, Tozzi M, Lomazzi C, Rivolta N, Lagana D, Carrafiello G, et al. Mid-term results of endovascular reconstruction for aorto-iliac obstructive disease. *International angiology : a journal of the International Union of Angiology*. 2007 Mar;26(1):18-25.
8. Ye W, Liu CW, Ricco JB, Mani K, Zeng R, Jiang J. Early and late outcomes of percutaneous treatment of TransAtlantic Inter-Society Consensus class C and D aorto-iliac lesions. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. 2011 Jun;53(6):1728-37.
9. Schwartz RS, Holmes DR, Jr., Topol EJ. The restenosis paradigm revisited: an alternative proposal for cellular mechanisms. *Journal of the American College of Cardiology. United States*1992. p. 1284-93.
10. Hayashi S, Watanabe N, Nakazawa K, Suzuki J, Tsushima K, Tamatani T, et al. Roles of P-selectin in inflammation, neointimal formation, and vascular remodeling in balloon-injured rat carotid arteries. *Circulation*. 2000 Oct 3;102(14):1710-7.
11. Wang K, Zhou Z, Zhou X, Tarakji K, Topol EJ, Lincoff AM. Prevention of intimal hyperplasia with recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand-immunoglobulin in the porcine coronary artery balloon injury model. *Journal of the American College of Cardiology*. 2001 Aug;38(2):577-82.
12. Conde ID, Kleiman NS. Arterial thrombosis for the interventional cardiologist: from adhesion molecules and coagulation factors to clinical therapeutics. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2003 Oct;60(2):236-46.

13. Welt FG, Tso C, Edelman ER, Kjelsberg MA, Paolini JF, Seifert P, et al. Leukocyte recruitment and expression of chemokines following different forms of vascular injury. *Vascular medicine* (London, England). 2003;8(1):1-7.
14. Indolfi C, Esposito G, Stabile E, Cavuto L, Pisani A, Coppola C, et al. A new rat model of small vessel stenting. *Basic research in cardiology*. 2000 Jun;95(3):179-85.
15. Mongiardo A, Curcio A, Spaccarotella C, Parise S, Indolfi C. Molecular mechanisms of restenosis after percutaneous peripheral angioplasty and approach to endovascular therapy. *Current drug targets Cardiovascular & haematological disorders*. 2004 Sep;4(3):275-87.
16. Mintz GS, Popma JJ, Pichard AD, Kent KM, Satler LF, Wong C, et al. Arterial remodeling after coronary angioplasty: a serial intravascular ultrasound study. *Circulation*. 1996 Jul 1;94(1):35-43.
17. Indolfi C, Torella D, Coppola C, Stabile E, Esposito G, Curcio A, et al. Rat carotid artery dilation by PTCA balloon catheter induces neointima formation in presence of IEL rupture. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2002 Aug;283(2):H760-7.
18. Fuke S, Maekawa K, Kawamoto K, Saito H, Sato T, Hioka T, et al. Impaired endothelial vasomotor function after sirolimus-eluting stent implantation. *Circ J*. 2007 Feb;71(2):220-5.
19. Indolfi C, Curcio A, Chiariello M. Simvastatin reduces neointimal thickening after experimental angioplasty. *Circulation*. 2003 Jan 28;107(3):e25.
20. Indolfi C, Esposito G, Di Lorenzo E, Rapacciuolo A, Feliciello A, Porcellini A, et al. Smooth muscle cell proliferation is proportional to the degree of balloon injury in a rat model of angioplasty. *Circulation*. 1995 Sep 1;92(5):1230-5.
21. Indolfi C, Coppola C, Torella D, Arcucci O, Chiariello M. Gene therapy for restenosis after balloon angioplasty and stenting. *Cardiology in review*. 1999 Nov-Dec;7(6):324-31.
22. Indolfi C, Avvedimento EV, Rapacciuolo A, Di Lorenzo E, Esposito G, Stabile E, et al. Inhibition of cellular ras prevents smooth muscle cell proliferation after vascular injury in vivo. *Nature medicine*. 1995 Jun;1(6):541-5.
23. Indolfi C, Avvedimento EV, Rapacciuolo A, Esposito G, Di Lorenzo E, Leccia A, et al. In vivo gene transfer: prevention of neointima formation by inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase. *Basic research in cardiology*. 1997 Dec;92(6):378-84.
24. Indolfi C, Avvedimento EV, Di Lorenzo E, Esposito G, Rapacciuolo A, Giuliano P, et al. Activation of cAMP-PKA signaling in vivo inhibits smooth muscle cell proliferation induced by vascular injury. *Nature medicine*. 1997 Jul;3(7):775-9.
25. Indolfi C, Stabile E, Coppola C, Gallo A, Perrino C, Allevato G, et al. Membrane-bound protein kinase A inhibits smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo by amplifying cAMP-protein kinase A signals. *Circulation research*. 2001 Feb 16;88(3):319-24.
26. Ikeda Y. Antiplatelet therapy using cilostazol, a specific PDE3 inhibitor. *Thrombosis and haemostasis*. 1999 Aug;82(2):435-8.
27. Kimura Y, Tani T, Kanbe T, Watanabe K. Effect of cilostazol on platelet aggregation and experimental thrombosis. *Arzneimittel-Forschung*. 1985;35(7A):1144-9.
28. Saitoh S, Saito T, Otake A, Owada T, Mitsugi M, Hashimoto H, et al. Cilostazol, a novel cyclic AMP phosphodiesterase inhibitor, prevents reocclusion after coronary arterial thrombolysis with recombinant tissue-type plasminogen activator. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association*. 1993 Apr;13(4):563-70.
29. Igawa T, Tani T, Chijiwa T, Shiragiku T, Shimidzu S, Kawamura K, et al. Potentiation of anti-platelet aggregating activity of cilostazol with vascular endothelial cells. *Thrombosis research*. 1990 Feb 15;57(4):617-23.

30. Kohda N, Tani T, Nakayama S, Adachi T, Marukawa K, Ito R, et al. Effect of cilostazol, a phosphodiesterase III inhibitor, on experimental thrombosis in the porcine carotid artery. *Thrombosis research*. 1999 Nov 15;96(4):261-8.
31. Tanigawa T, Nishikawa M, Kitai T, Ueda Y, Okinaka T, Makino K, et al. Increased platelet aggregability in response to shear stress in acute myocardial infarction and its inhibition by combined therapy with aspirin and cilostazol after coronary intervention. *Am J Cardiol*. 2000 May 1;85(9):1054-9.
32. Lee SW, Park SW, Hong MK, Lee CW, Kim YH, Park JH, et al. Comparison of cilostazol and clopidogrel after successful coronary stenting. *Am J Cardiol*. 2005 Apr 1;95(7):859-62.
33. Weintraub WS. The vascular effects of cilostazol. *The Canadian journal of cardiology*. 2006 Feb;22 Suppl B:56B-60B.
34. da Rosa MP, Baroni GV, Portal VL. Cilostazol, a phosphodiesterase III inhibitor: future perspectives in atherosclerosis. *Arq Bras Cardiol*. Brazil2006. p. e222-6.
35. Tanaka T, Ishikawa T, Hagiwara M, Onoda K, Itoh H, Hidaka H. Effects of cilostazol, a selective cAMP phosphodiesterase inhibitor on the contraction of vascular smooth muscle. *Pharmacology*. 1988;36(5):313-20.
36. Liu Y, Shakur Y, Yoshitake M, Kambayashi Ji J. Cilostazol (pletal): a dual inhibitor of cyclic nucleotide phosphodiesterase type 3 and adenosine uptake. *Cardiovascular drug reviews*. 2001 Winter;19(4):369-86.
37. Tani T, Uehara K, Sudo T, Marukawa K, Yasuda Y, Kimura Y. Cilostazol, a selective type III phosphodiesterase inhibitor, decreases triglyceride and increases HDL cholesterol levels by increasing lipoprotein lipase activity in rats. *Atherosclerosis*. 2000 Oct;152(2):299-305.
38. Elam MB, Heckman J, Crouse JR, Hunninghake DB, Herd JA, Davidson M, et al. Effect of the novel antiplatelet agent cilostazol on plasma lipoproteins in patients with intermittent claudication. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1998 Dec;18(12):1942-7.
39. Hayashi S, Morishita R, Matsushita H, Nakagami H, Taniyama Y, Nakamura T, et al. Cyclic AMP inhibited proliferation of human aortic vascular smooth muscle cells, accompanied by induction of p53 and p21. *Hypertension*. 2000 Jan;35(1 Pt 2):237-43.
40. Ito C, Kusano E, Furukawa Y, Yamamoto H, Takeda S, Akimoto T, et al. Modulation of the erythropoietin-induced proliferative pathway by cAMP in vascular smooth muscle cells. *American journal of physiology Cell physiology*. 2002 Dec;283(6):C1715-21.
41. Morishita R. A scientific rationale for the CREST trial results: evidence for the mechanism of action of cilostazol in restenosis. *Atheroscler Suppl*. Netherlands2005. p. 41-6.
42. Schror K. The pharmacology of cilostazol. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2002 Mar;4 Suppl 2:S14-9.
43. Kubota Y, Kichikawa K, Uchida H, Maeda M, Nishimine K, Makutani S, et al. Pharmacologic treatment of intimal hyperplasia after metallic stent placement in the peripheral arteries. An experimental study. *Investigative radiology*. 1995 Sep;30(9):532-7.
44. Fujinaga K, Onoda K, Yamamoto K, Imanaka-Yoshida K, Takao M, Shimono T, et al. Locally applied cilostazol suppresses neointimal hyperplasia by inhibiting tenascin-C synthesis and smooth muscle cell proliferation in free artery grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg*. United States2004. p. 357-63.
45. Yamamoto K, Onoda K, Sawada Y, Fujinaga K, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, et al. Locally applied cilostazol suppresses neointimal hyperplasia and medial thickening in a vein graft model. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. Japan2007. p. 322-30.
46. Kudo FA, Kondo Y, Muto A, Miyazaki K, Dardik A, Nishibe M, et al. Cilostazol suppresses neointimal hyperplasia in canine vein grafts. *Surgery today*. 2009;39(2):128-32.

47. Tsuchikane E, Suzuki T, Katoh O. Examination of anti-intima hyperplastic effect on cilostazol-eluting stent in a porcine model. *The Journal of invasive cardiology*. 2007 Mar;19(3):109-12.
48. Tsuchikane E, Takeda Y, Nasu K, Awata N, Kobayashi T. Balloon angioplasty plus cilostazol administration versus primary stenting of small coronary artery disease: final results of COMPASS. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2004 Sep;63(1):44-51.
49. Ge J, Han Y, Jiang H, Sun B, Chen J, Zhang S, et al. RACTS: a prospective randomized antiplatelet trial of cilostazol versus ticlopidine in patients undergoing coronary stenting: long-term clinical and angiographic outcome. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2005 Aug;46(2):162-6.
50. Douglas JS, Jr., Holmes DR, Jr., Kereiakes DJ, Grines CL, Block E, Ghazzal ZM, et al. Coronary stent restenosis in patients treated with cilostazol. *Circulation*. 2005 Nov 1;112(18):2826-32.
51. Lee SW, Park SW, Kim YH, Yun SC, Park DW, Lee CW, et al. Drug-eluting stenting followed by cilostazol treatment reduces late restenosis in patients with diabetes mellitus the DECLARE-DIABETES Trial (A Randomized Comparison of Triple Antiplatelet Therapy with Dual Antiplatelet Therapy After Drug-Eluting Stent Implantation in Diabetic Patients). *Journal of the American College of Cardiology*. United States2008. p. 1181-7.
52. Lee SW, Park SW, Kim YH, Yun SC, Park DW, Lee CW, et al. A randomized, double-blind, multicenter comparison study of triple antiplatelet therapy with dual antiplatelet therapy to reduce restenosis after drug-eluting stent implantation in long coronary lesions: results from the DECLARE-LONG II (Drug-Eluting Stenting Followed by Cilostazol Treatment Reduces Late Restenosis in Patients with Long Coronary Lesions) trial. *Journal of the American College of Cardiology*. 2011 Mar 15;57(11):1264-70.
53. Biondi-Zoccai GG, Lotrionte M, Anselmino M, Moretti C, Agostoni P, Testa L, et al. Systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials appraising the impact of cilostazol after percutaneous coronary intervention. *American heart journal*. United States2008. p. 1081-9.
54. Tamhane U, Meier P, Chetcuti S, Chen KY, Rha SW, Grossman MP, et al. Efficacy of cilostazol in reducing restenosis in patients undergoing contemporary stent based PCI: a meta-analysis of randomised controlled trials. *EuroIntervention : journal of EuroPCR in collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology*. 2009 Aug;5(3):384-93.
55. Takigawa T, Matsumaru Y, Hayakawa M, Nemoto S, Matsumura A. Cilostazol reduces restenosis after carotid artery stenting. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. United States: 2010 Society for Vascular Surgery. Published by Mosby, Inc; 2010. p. 51-6.
56. Yamagami H, Sakai N, Matsumaru Y, Sakai C, Kai Y, Sugiu K, et al. Periprocedural Cilostazol Treatment and Restenosis after Carotid Artery Stenting: The Retrospective Study of In-Stent Restenosis after Carotid Artery Stenting (ReSISter-CAS). *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association*. 2010 Sep 18.
57. Iida O, Nanto S, Uematsu M, Morozumi T, Kotani J, Awata M, et al. Cilostazol reduces target lesion revascularization after percutaneous transluminal angioplasty in the femoropopliteal artery. *Circ J*. 2005 Oct;69(10):1256-9.
58. Iida O, Nanto S, Uematsu M, Morozumi T, Kitakaze M, Nagata S. Cilostazol reduces restenosis after endovascular therapy in patients with femoropopliteal lesions. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. United States2008. p. 144-9.

59. Soga Y, Yokoi H, Kawasaki T, Nakashima H, Tsurugida M, Hikichi Y, et al. Efficacy of cilostazol after endovascular therapy for femoropopliteal artery disease in patients with intermittent claudication. *Journal of the American College of Cardiology*. United States 2009. p. 48-53.
60. Soga Y, Iida O, Hirano K, Suzuki K, Kawasaki D, Miyashita Y, et al. Impact of cilostazol after endovascular treatment for infrainguinal disease in patients with critical limb ischemia. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter: Inc*; 2011.
61. Ishii H, Kumada Y, Toriyama T, Aoyama T, Takahashi H, Yamada S, et al. Cilostazol improves long-term patency after percutaneous transluminal angioplasty in hemodialysis patients with peripheral artery disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. United States 2008. p. 1034-40.
62. Ishii H, Kumada Y, Toriyama T, Aoyama T, Takahashi H, Tanaka M, et al. Effects of oral cilostazol 100 mg BID on long-term patency after percutaneous transluminal angioplasty in patients with femoropopliteal disease undergoing hemodialysis: a retrospective chart review in Japanese patients. *Clin Ther*. 2010 Jan;32(1):24-33.
63. Otsuki M, Saito H, Xu X, Sumitani S, Kouhara H, Kurabayashi M, et al. Cilostazol represses vascular cell adhesion molecule-1 gene transcription via inhibiting NF-kappaB binding to its recognition sequence. *Atherosclerosis*. Ireland 2001. p. 121-8.
64. Lee KM, Lee HJ, Kim MK, Kim HS, Jung GS, Hur SH, et al. Cilostazol inhibits high glucose- and angiotensin II-induced type 1 plasminogen activator inhibitor expression in artery wall and neointimal region after vascular injury. *Atherosclerosis*. Ireland 2009. p. 391-8.
65. Jung WK, Lee DY, Park C, Choi YH, Choi I, Park SG, et al. Cilostazol is anti-inflammatory in BV2 microglial cells by inactivating nuclear factor-kappaB and inhibiting mitogen-activated protein kinases. *Br J Pharmacol*. England 2010. p. 1274-85.
66. Chen WJ, Chen YH, Lin KH, Hsuan Ting C, Yeh YH. Cilostazol promotes vascular smooth muscles cell differentiation through the cAMP response element-binding protein-dependent pathway. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. United States 2011. p. 2106-13.
67. Schwartz RS, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vliestra RE, Holmes DR. Restenosis after balloon angioplasty. A practical proliferative model in porcine coronary arteries. *Circulation*. 1990 Dec;82(6):2190-200.
68. Schwartz RS. Neointima and arterial injury: dogs, rats, pigs, and more. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1994 Dec;71(6):789-91.
69. Johnson GJ, Griggs TR, Badimon L. The utility of animal models in the preclinical study of interventions to prevent human coronary artery restenosis: analysis and recommendations. On behalf of the Subcommittee on Animal, Cellular and Molecular Models of Thrombosis and Haemostasis of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thrombosis and haemostasis*. 1999 May;81(5):835-43.
70. Bayes-Genis A, Kantor B, Keelan PC, Altman JD, Lubbe DF, Kang JH, et al. Restenosis and Hyperplasia: Animal Models. *Current interventional cardiology reports*. 2000 Nov;2(4):303-8.
71. Humphrey WR, Simmons CA, Toombs CF, Shebuski RJ. Induction of neointimal hyperplasia by coronary angioplasty balloon overinflation: comparison of feeder pigs to Yucatan minipigs. *American heart journal*. 1994 Jan;127(1):20-31.
72. Castro Junior C, Pereira AH, Pasa MB. Morphometric analysis of the intimal reaction after stent implantation in iliac arteries submitted to angioplasty in pigs. *Acta cirurgica*

brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia. 2006 May-Jun;21(3):139-43.

73. De Meyer GR, Bult H. Mechanisms of neointima formation--lessons from experimental models. *Vascular medicine (London, England)*. 1997;2(3):179-89.

74. Verheye S, Salame MY, Robinson KA, Post MJ, Carrozza JP, Jr., Baim DS, et al. Short- and long-term histopathologic evaluation of stenting using a self-expanding nitinol stent in pig carotid and iliac arteries. *Catheter Cardiovasc Interv*. 1999 Nov;48(3):316-23.

75. Virmani R, Kolodgie FD, Farb A, Lafont A. Drug eluting stents: are human and animal studies comparable? *Heart (British Cardiac Society)*. 2003 Feb;89(2):133-8.

76. Franca LH, Pereira AH, Perini SC. Self-expandable nitinol stent placement in homocysteinemic porcine aorta. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*. 2008 Apr;63(2):229-36.

77. Ishizaka N, Taguchi J, Kimura Y, Ikari Y, Aizawa T, Togo M, et al. Effects of a single local administration of cilostazol on neointimal formation in balloon-injured rat carotid artery. *Atherosclerosis. Ireland*1999. p. 41-6.

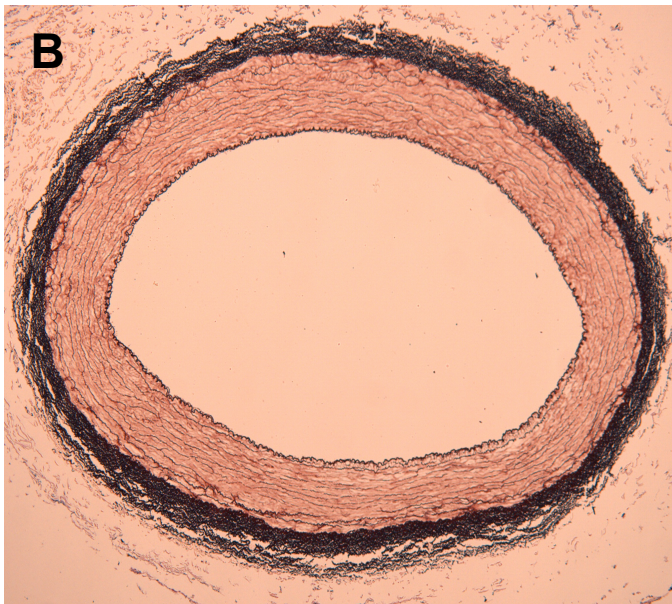
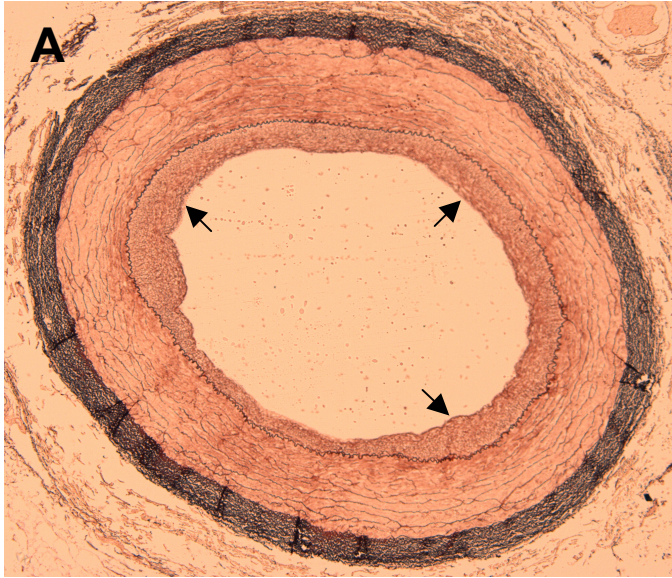


Figure 1 – Photomicrograph of common iliac artery in one pig (orcein staining, 40x original magnification). In A, neointimal hyperplasia (arrows) in right common iliac artery that underwent angioplasty. In B, left common iliac artery that did not undergo angioplasty (normal artery).

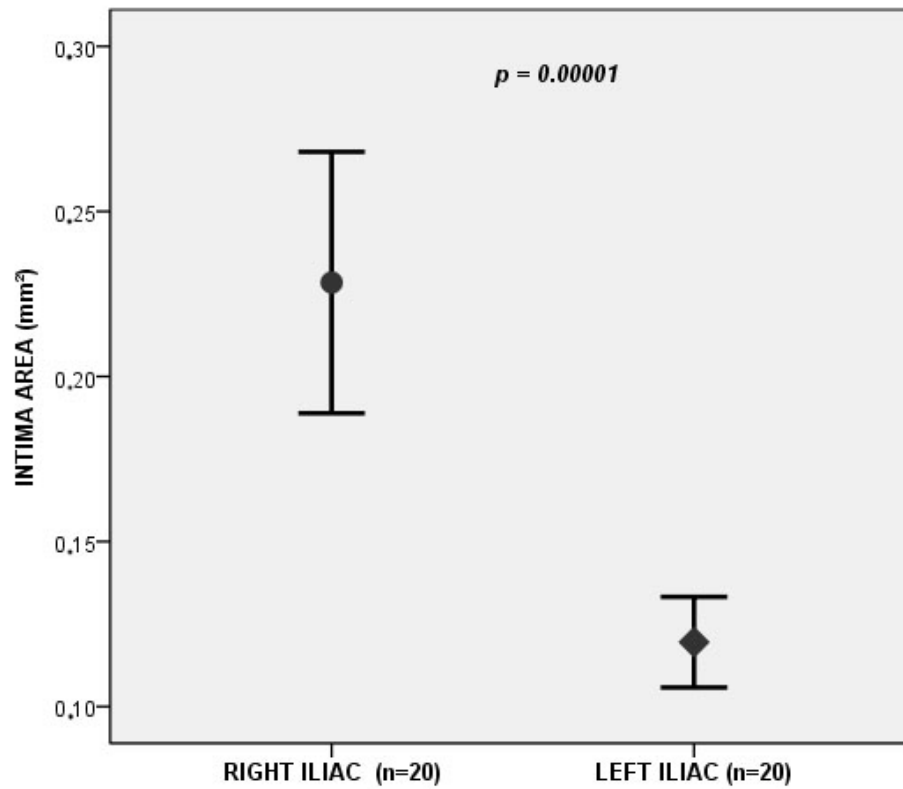


Figure 2 - Intima area in right common iliac artery (angioplasty) and in left common iliac artery (no angioplasty); p-value indicates statistically significant neointimal hyperplasia in arteries that underwent angioplasty.

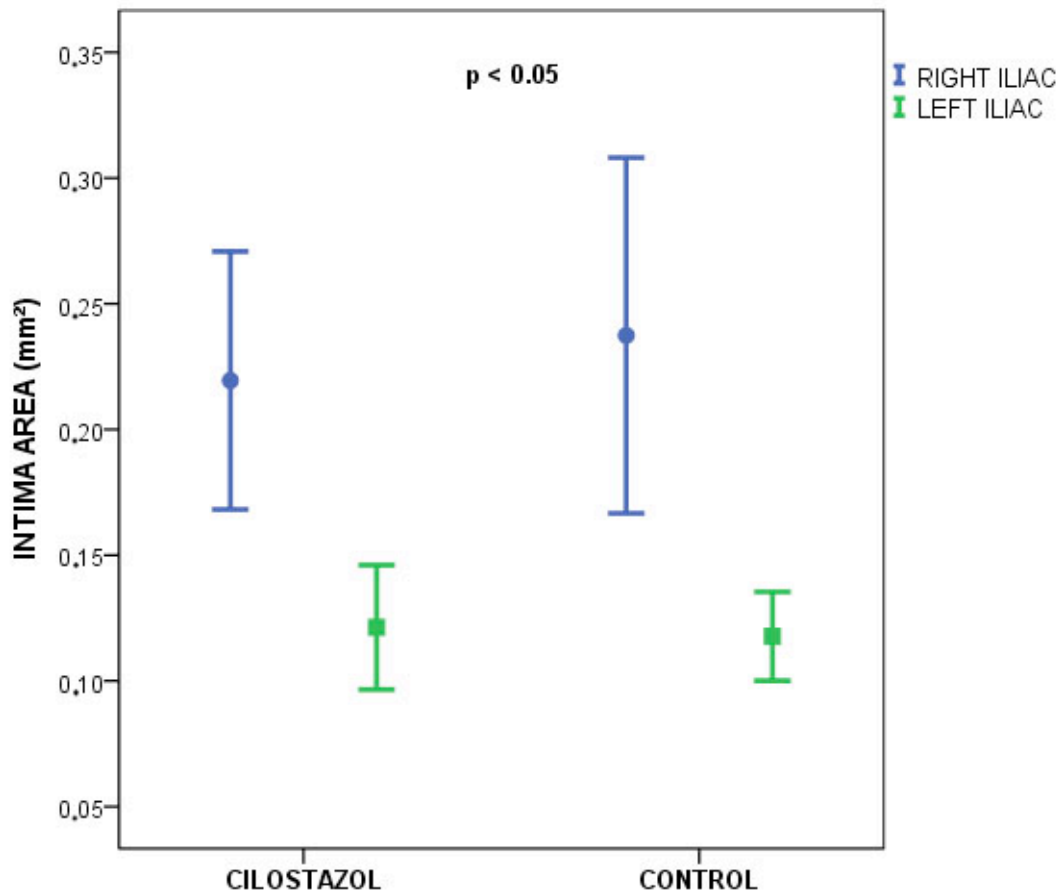


Figure 3 - Comparison of intima area in right common iliac artery (angioplasty) and in left common iliac artery (no angioplasty); p-value indicates statistically significant neointimal hyperplasia in arteries that underwent angioplasty even after stratification into cilostazol and control groups.

Table 1 – Digital morphometry data

	Cilostazol (n=10)	Control (n=10)	p
Lumen area (mm ²)	2.277±0.654	2.575±0.594	0.08
Intima area (mm ²)	0.219±0.071	0.237±0.098	0.64
Media area (mm ²)	2.262±0.449	2.393±0.492	0.53
Media+intima area (mm ²)	2.481±0.478	2.631±0.508	0.50
Neointimal obstruction (%)	8.857±3.464	9.257±4.417	0.82

Group 1 = Cilostazol 50 mg twice daily
Grupo 2 = Control

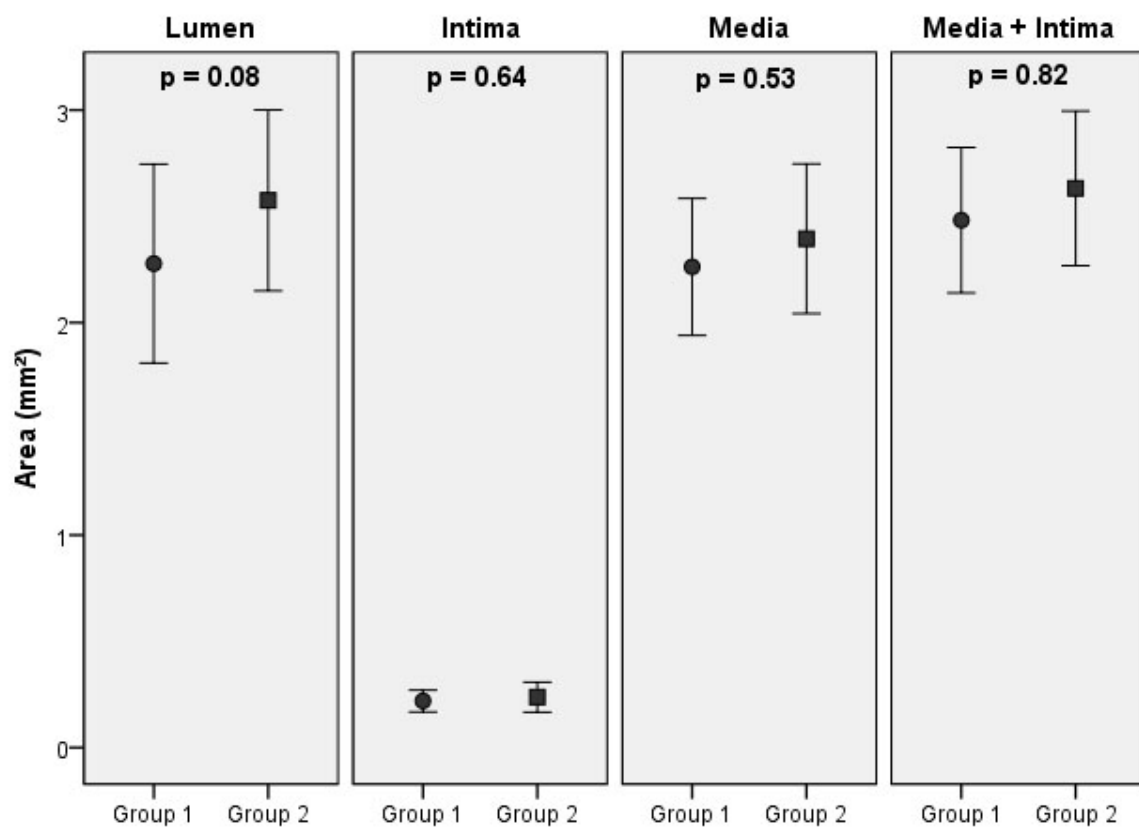


Figure 4 - Comparison of lumen area, intima area, media area and media+intima area between groups; p-value indicates no significant difference between cilostazol and control group.