

# Importância dos Estudos Pré-clínicos em Animais de Experimentação para a Cardiologia Intervencionista

*The Importance of Pre-clinical Animal Testing in Interventional Cardiology*

Yoriyasu Suzuki, MD, Alan C. Yeung, MD, Fumiaki Ikeno, MD

Departamento de Medicina Cardiovascular, Faculdade de Medicina da Universidade de Stanford, Stanford, Califórnia - EUA.

## Resumo

O tratamento da doença cardiovascular mudou radicalmente nas últimas duas décadas, proporcionando aos pacientes uma sobrevida maior e melhor qualidade de vida. Grande parte desse sucesso deve-se à introdução de novas terapias. Em nenhuma outra área essa mudança foi mais evidente do que na cardiologia intervencionista, pois nos últimos vinte anos as intervenções cardiovasculares percutâneas saíram do terreno experimental para formar a base terapêutica dos portadores de doença cardiovascular sintomática. O desenvolvimento dessas tecnologias, desde os primeiros estágios, requer a realização de estudos pré-clínicos com modelos animais. É possível compreender os mecanismos terapêuticos desses dispositivos, uma vez introduzidos na esfera clínica, comparando-se os achados das pesquisas realizadas com modelos animais com amostras de exames anatomopatológicos. Esta análise apresenta uma visão geral do papel emergente dos estudos pré-clínicos, bem como dos resultados, do desenvolvimento e da avaliação de modelos animais, nas tecnologias de intervenção cardiovascular percutânea para tratamento de pacientes com doença cardiovascular sintomática.

## Introdução

Para que possam contribuir para a melhora da saúde humana, as descobertas científicas e as tecnologias precisam ser colocadas em prática. Em geral, esses avanços começam na “bancada”, com pesquisas básicas em que os cientistas estudam a doença em nível molecular ou celular, e depois passam para o nível clínico, ou seja, para a “a beira do leito”.

Pesquisa “translacional” é um termo intercambiável que ressalta a necessidade premente de se converter em benefícios práticos para os portadores de doença cardiovascular sintomática os grandes investimentos dos setores público e privado em pesquisas biomédicas. A **pesquisa translacional** deve ser encarada com uma via de mão dupla: **da bancada** para a beira do leito e da beira do leito para a bancada. Para tornar mais eficaz o processo de conversão da pesquisa

## Palavras-chave

Estudo pré-clínico; modelo animal; intervenção cardiovascular.

**Correspondência:** Fumiaki Ikeno, M.D. •

Stanford University, Division of Cardiovascular Medicine, 300 Pasteur Drive, Falk CVRB007, Stanford, CA94305a  
E-mail: fikeno@cvmed.stanford.edu

translacional, é preciso implementar uma estratégia de ação inovadora que estimule a interação e cooperação entre pesquisadores básicos, clínicos, profissionais de laboratório e fabricantes de dispositivos.

Em nenhuma outra área isso é mais evidente do que na cardiologia intervencionista, uma vez que a intervenção cardiovascular percutânea deixou de ser um procedimento experimental para formar a base terapêutica dos portadores de doença cardiovascular sintomática. Os estudos pré-clínicos com modelos animais desempenham um papel importante no desenvolvimento dessas tecnologias. Após a introdução dessas tecnologias na esfera clínica (da bancada para a beira do leito), seus mecanismos terapêuticos podem ser ainda mais bem compreendidos através de análises comparativas entre os achados das pesquisas animais com o de amostras de material anatomopatológico (da beira do leito para a bancada).

Esta revisão apresenta um apanhado geral do estágio da aplicação clínica e das limitações das tecnologias usadas atualmente nas intervenções cardiovasculares percutâneas, das tecnologias que ainda estão em fase de desenvolvimento e dos resultados dos estudos pré-clínicos realizados com modelos animais.

## Modelo animal experimental de reestenose e tecnologias para intervenção coronariana

Estamos em uma nova era no campo da intervenção coronariana percutânea: os *stents* farmacológicos (SF)<sup>1,2</sup>. Esses *stents* são revestidos com fármacos antiproliferativos, como o sirolimus, e demonstraram limitar a reestenose intra-*stent* em lesões curtas<sup>3</sup>. Outros fármacos, como os análogos de paclitaxel, demonstraram eficácia semelhante<sup>4</sup>. O êxito desses agentes antiproliferativos se baseia não só em dados dos primeiros estudos clínicos realizados com seres humanos como também em estudos pré-clínicos realizados com modelo suíno de reestenose coronariana<sup>5-8</sup>. Ainda não está claro se alguma espécie animal em particular tem maior valor prognóstico para a resposta humana a esses *stents* revestidos. Assim sendo, achamos que os diversos modelos animais atualmente descritos ainda podem fornecer informações sobre importantes processos biológicos e resposta ao tratamento. Esses modelos animais, portanto, podem ajudar a comprovar hipóteses importantíssimas sobre os supostos mecanismos de ação de uma intervenção, embora não possam ser utilizados para prever eficácia<sup>9</sup>. A próxima seção apresenta um breve apanhado geral das tecnologias atuais de *stents* coronarianos, bem como dos modelos animais usados na avaliação desses dispositivos.

### Breve apanhado sobre cada modelo animal

#### Modelo animal de pequeno porte

O modelo de artéria carótida de rato desenvolvido na década de 1960 estabeleceu as bases da biologia vascular. Embora inicialmente fosse usado para o estudo da aterosclerose humana, mais tarde esse modelo foi adaptado para aumentar a compreensão da reestenose e testar terapias anti-reestenose, tornando-se uma referência no estudo da proliferação das células musculares lisas após o desnudamento endotelial<sup>10-13</sup>. Uma das vantagens é que ele oferece a oportunidade para estudar a biologia molecular<sup>14-16</sup>. Em contrapartida, esse modelo passou a ter menor importância depois da realização de diversos estudos sobre inibidores da enzima conversora de angiotensina<sup>17-21</sup>, pois o fato de não prever resultados negativos nos estudos clínicos fez com que ele fosse preterido pelos pesquisadores. A lesão arterial de camundongo como modelo de reestenose foi desenvolvida a partir do seqüenciamento do genoma do camundongo e da disponibilidade de métodos moleculares que permitem o estudo dos eventos que ocorrem após a lesão arterial<sup>22,23</sup>. Como os vasos desse modelo têm um calibre muito fino, os métodos tradicionais de lesão por balão ou *stent* não são práticos. No lugar desses métodos, a lesão vascular pode ser realizada girando-se um pequeno fio-guia no interior do vaso, ou por corrente elétrica, ou ainda pela colocação de um manguito perivascular não-constritivo ao redor da artéria femoral do camundongo<sup>24,25</sup>. Esses métodos provocam nos locais lesados um espessamento neointimal variável proporcional à magnitude da lesão, com pouca formação de trombo. Depois de três semanas ocorre a formação de uma neointima delgada (aproximadamente 0,03 mm)<sup>2</sup>. O poder da biologia molecular e da genética no modelo de camundongo permitirá avanços substanciais na compreensão das interações entre proliferação celular, migração celular, formação de trombo e remodelamento.

#### Modelo animal de grande porte

O modelo de reestenose de artéria ilíaca de coelho também foi extensamente estudado para testar terapias anti-reestenose e elucidar os mecanismos celulares e moleculares<sup>26-28</sup>. Os níveis séricos de colesterol geralmente são superiores a 1,000 mg/dl e causam lesão arterial bioquímica, que pode ser complementada por lesão mecânica. A lesão inicial nesses modelos pode ser induzida por dessecação a ar, seguida por dieta hipercolesterolêmica e insuflação do balão para lesar ainda mais o vaso. Os estudos histopatológicos desse modelo revelam a presença de células espumosas (macrófagos que ingeriram uma quantidade excessiva de lipídios) e uma matriz extracelular volumosa. Uma crítica a esse modelo é que células espumosas são raras na neointima reestenótica de seres humanos. No entanto, a angioplastia por balão nesse modelo produz uma lesão histopatológica comparável à observada na angioplastia humana, com dissecação medial e ruptura da placa. Nos locais de ruptura de placa induzida por balão ocorre uma rápida deposição de plaquetas. Por esse motivo, o uso de antiagregantes plaquetários como uma possível terapia anti-reestenose<sup>29,30</sup> foi estudado no início do desenvolvimento desse modelo e mostrou ser eficaz na redução da espessura neointimal.

Após uma lesão, as artérias coronárias de porcos domésticos respondem de forma semelhante às artérias coronárias

humanas<sup>31,32</sup>. Quando artérias coronárias suínas são lesadas, uma espessa neointima idêntica à neointima reestenótica humana se forma dentro de 28 dias. Em uma lesão causada exclusivamente por balão, ocorre uma laceração típica da média, que em 28 dias é preenchida por neointima. Além disso, a magnitude do espessamento neointimal é diretamente proporcional à lesão, permitindo, assim, estabelecer uma relação entre lesão e regressão da resposta capaz de quantificar a resposta às possíveis terapias<sup>33,34</sup>.

A experiência indica que as artérias coronárias dos porcos domésticos e as artérias ilíacas dos coelhos são apropriadas para esse tipo de estudo, pois seu calibre e acesso, bem como a resposta à lesão, são semelhantes aos dos seres humanos e, portanto, permitem a avaliação de dispositivos que podem ser usados na avaliação clínica<sup>35</sup>. Apesar do menor número de vasos colaterais, o sistema cardiovascular suíno é semelhante ao humano, inclusive a distribuição de artérias coronárias epicárdicas.

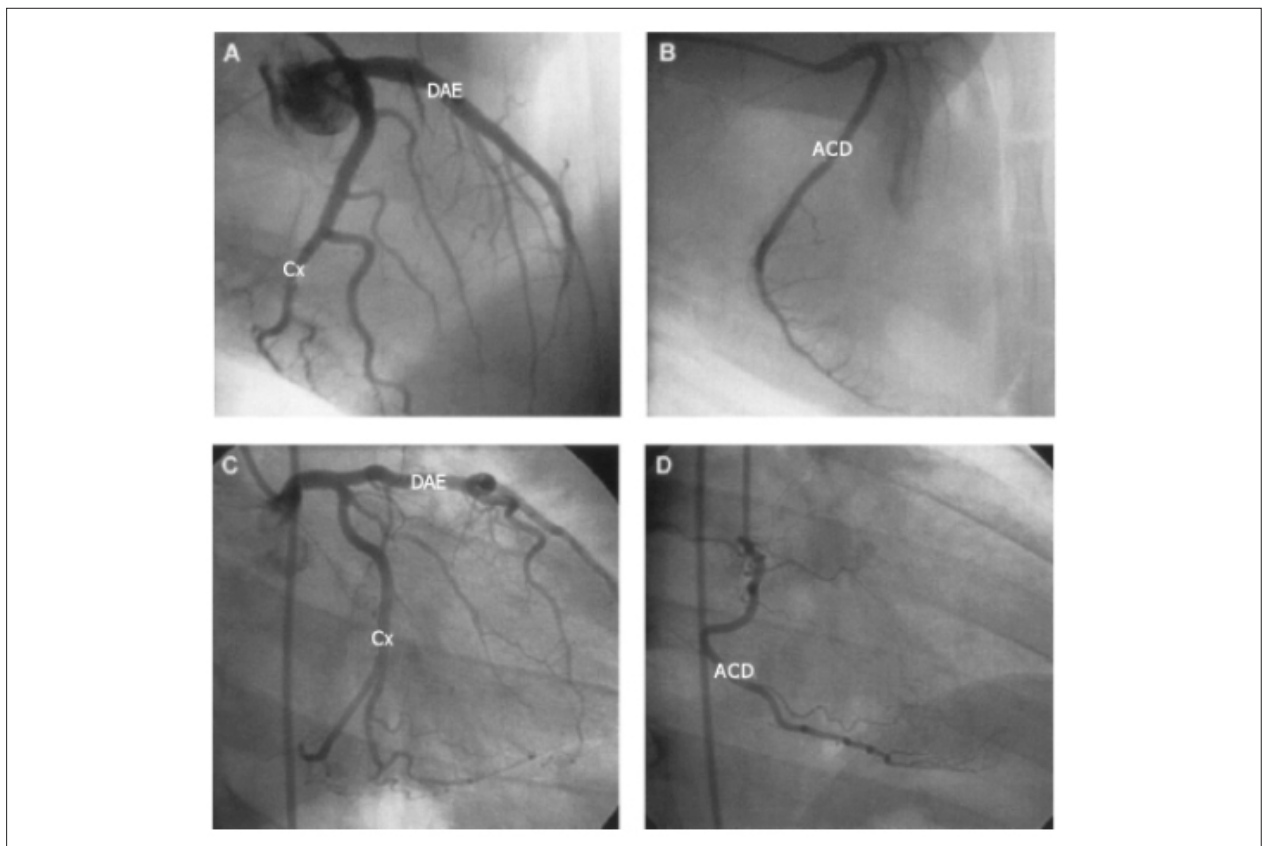
#### Considerações técnicas sobre o modelo coronariano suíno

Os modelos coronarianos suínos que utilizam métodos de lesão vascular são os padrões aceitos atualmente para o estudo de terapias anti-reestenose<sup>35</sup>. No modelo suíno, o tronco da artéria coronária esquerda (TCE) geralmente bifurca-se precocemente originando as artérias descendente anterior esquerda (DA) e circunflexa (Cx) (Fig. 1). O diâmetro desses vasos é semelhante ao dos vasos humanos (2,0 a 4,0 mm). Da mesma forma, a artéria circunflexa tem de um a três ramos marginais, e a artéria DA irriga o septo (Fig. 1). Além disso, o diâmetro da artéria coronária direita (ACD) suína é semelhante ao da humana, embora nos porcos sua dominância seja menos freqüente do que nos seres humanos, cuja dominância é observada em 80% dos casos (Fig. 1).

#### Técnicas de cateterização cardíaca

Em vários aspectos, as técnicas de cateterização cardíaca no porco são semelhantes às usadas no ser humano. Em geral, os procedimentos são realizados sob anestesia geral. A intubação pode ser feita com tubos endotraqueais humanos, embora a faringe mais longa do porco possa tornar essa técnica mais complexa. A via de acesso pode ser a artéria carótida ou femoral, por dissecação ou punção percutânea direta pela técnica modificada de Seldinger, respectivamente. O equipamento diagnóstico e intervencionista pode ser o utilizado em seres humanos, e a escolha do cateter depende da abordagem empregada. Em geral, quando a via de acesso era a carótida, nosso grupo tem utilizado um cateter-guia Judkins de coronária esquerda 3,5 ou 4,0<sup>36-39</sup>. Com a via de acesso femoral, o cateter-guia tipo "Hockey Stick" pode ser usado tanto para o óstio da coronária esquerda como da coronária direita<sup>8</sup>, ou um cateter-guia Judkins direita 4,0 para a coronária direita (Fig. 1).

Recomenda-se o uso de terapia antiplaquetária, com aspirina (300 mg), instituída na véspera do procedimento e mantida até o sacrifício do animal<sup>6, 8</sup>. Clopidogrel (75 mg) também tem sido empregado além da aspirina<sup>36,40</sup>. Heparina (100–300 U/kg) muitas vezes é usada durante o procedimento como agente antitrombótico, embora mesmo com o uso desse esquema terapêutico ainda possa ocorrer trombose intra-*stent*, como no ser humano<sup>41</sup>.



**Fig. 1 - Anatomia coronariana epicárdica suína e humana; Suína (A e B); A - Sistema coronário esquerdo; B - Artéria coronária direita. Humana (C e D); C - Sistema coronário esquerdo; D - Artéria coronária direita; A angiografia coronariana foi realizada via artéria femoral direita tanto em porcos como em seres humanos; As artérias descendente anterior esquerda, circunflexa esquerda e coronária direita exibem anatomia e distribuição semelhantes em suínos e humanos<sup>40</sup>.**

### Implantação do stent

Deve-se implantar apenas um *stent* por artéria, exceto quando questões sobre sobreposição de *stents* ou dosagem do medicamento com o uso de diversos *stents* são levadas em consideração. É possível implantar *stents* em diversas artérias do mesmo animal, inclusive *stents* convencionais para o desenvolvimento de modelo de reestenose, como os de cobre e/ou ouro, ou *stents* somente com veículo carreador, como material polimérico, ou ainda *stents* com veículo carreador e fármaco para a avaliação do *stent* farmacológico (SF). Em relação à avaliação do *stent* farmacológico, as recomendações de um grupo de consenso sobre estudos pré-clínicos são de que o *stent* deve ter um diâmetro apropriado, calculado pela mensuração visual ou quantitativa da artéria coronária com base em uma relação entre *stent* e diâmetro da artéria  $\leq 1:1$ , pois o uso de uma relação *stent*: artéria elevada poderia induzir o desenvolvimento de grave lesão arterial e estenose considerável da artéria coronária<sup>9</sup>.

Na prática clínica, é comum a ocorrência de sobreposição dos *stents* durante o implante, e a sobreposição de *stents* farmacológicos pode acarretar um efeito combinado dos medicamentos liberados pelos dois *stents*.

### Avaliação do desempenho do stent

O dispositivo deve ser também avaliado através da apresentação de uma escala rigorosa, pré-definida, (semi)quantitativa para a descrição de:

**1) Escore da lesão e da inflamação:** a avaliação histopatológica da inflamação pode abranger um escore para a lesão no local de cada haste do *stent* (Fig. 2), uma descrição da inflamação (ausente ou tipos de célula e localização) e um escore de inflamação para o vaso como um todo, bem como para a adventícia, média e neointima, e nos locais onde ficam posicionadas as hastes do *stent*. Quando possível, a densidade celular nos compartimentos teciduais deve ser registrada como o número de células por área<sup>32,42</sup>.

**2) Posição das hastes do stent e tecido adjacente:** Outros dados obtidos por observação incluem a aposição das hastes do *stent* sobre a parede do vaso e hastes cobertas por tecido ou endotélio. É preciso fazer também uma descrição subjetiva do tecido adjacente, inclusive adelgaçamento da média, perda de celularidade e hialinização.

**3) Histomorfometria quantitativa:** a histomorfometria dos cortes histopatológicos é essencial para a avaliação do *stent*. A mensuração de todos os cortes deve incluir a área da média, área da lâmina elástica interna (LEI), área da lâmina elástica externa (LEE), área luminal e área do *stent* (área no interior do próprio *stent*). A mensuração da neointima é importante para a avaliação da eficácia, devendo incluir a espessura no local de cada haste do *stent* e a área neointimal total<sup>9</sup>.

**4) Resposta vascular e cicatrização:** a escolha do fármaco e a cinética de liberação do fármaco são os componentes mais

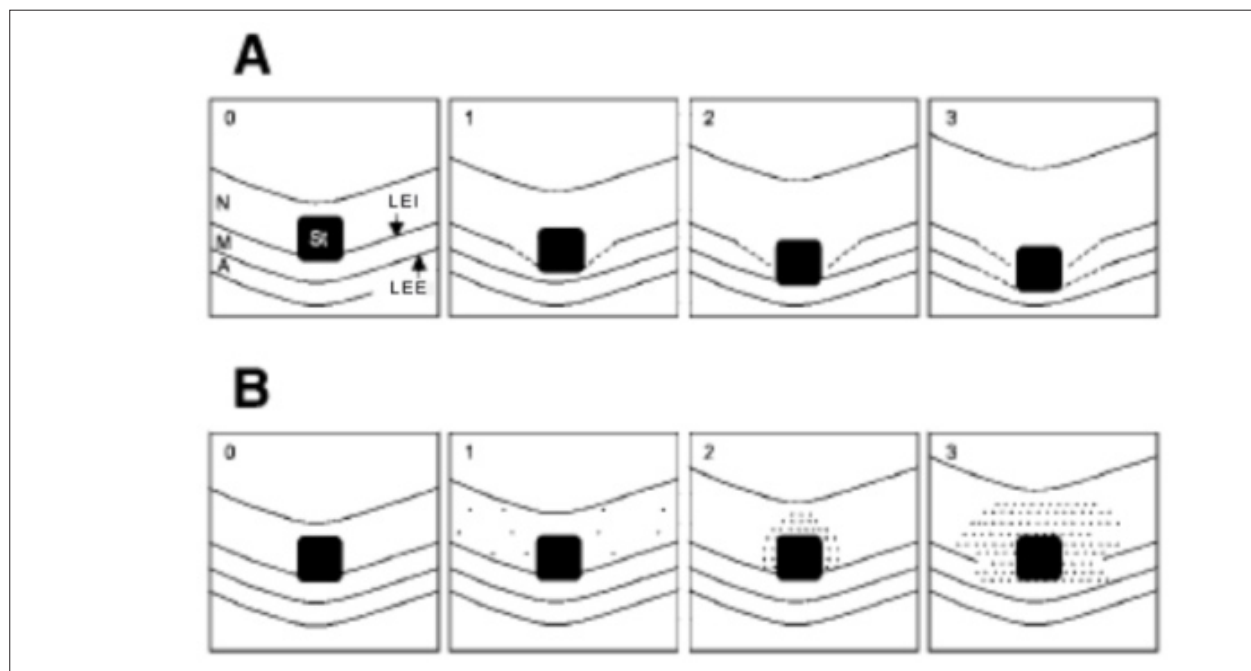
## Artigo de Revisão

importantes na tecnologia do *stent* farmacológico (SF), pois esses são os fatores que determinam o tipo de resposta vascular e o tempo de cicatrização. Existe um volume considerável de dados sobre as diferenças entre o sirolimus e o paclitaxel em termos dos efeitos desses medicamentos sobre a parede arterial<sup>43,46</sup>.

A endotelização após o implante do *stent* deve ser registrada como ausente, parcial ou completa em todos os cortes, e o tempo de reendotelização deve ser estimado. No modelo de *stent* coronariano suíno, uma espessa neointima é induzida em 28 dias (Fig. 3), e vários estudos analisaram a resposta celular fásica que ocorre com o passar do tempo após a implantação do *stent*<sup>47-49</sup>. Estudos pré-clínicos realizados com *stents* com eluição de sirolimus (SES) e *stents* com eluição de paclitaxel (SEP) demonstraram a eficácia desses *stents* farmacológicos em relação ao *stent* metálico convencional (SM)<sup>6,8</sup>. Entretanto, o entusiasmo com essa tecnologia arrefeceu um pouco recentemente em decorrência de preocupações com a ocorrência de trombose tardia do *stent*. Uma importante crítica aos primeiros estudos pré-clínicos, que levaram à aprovação dos dois tipos de *stents* pelo FDA americano, foi o fato de não terem sido detectadas diferenças significativas na resposta de cicatrização da parede arterial depois de 28 dias quando comparados ao *stent* convencional (SM), enquanto dados angioscópicos e necroscópicos humanos demonstravam claramente a existência de diferenças consideráveis na cicatrização<sup>50,51</sup>. A maior parte dos estudos pré-clínicos não demonstrou diferenças significativas entre os *stents* farmacológicos (SF) e os *stents* convencionais (SM) quanto à extensão da cobertura endotelial no caso de uma relação balão:artéria de 1,1:1. Essas diferenças só foram identificadas depois que os resultados de um estudo que utilizou

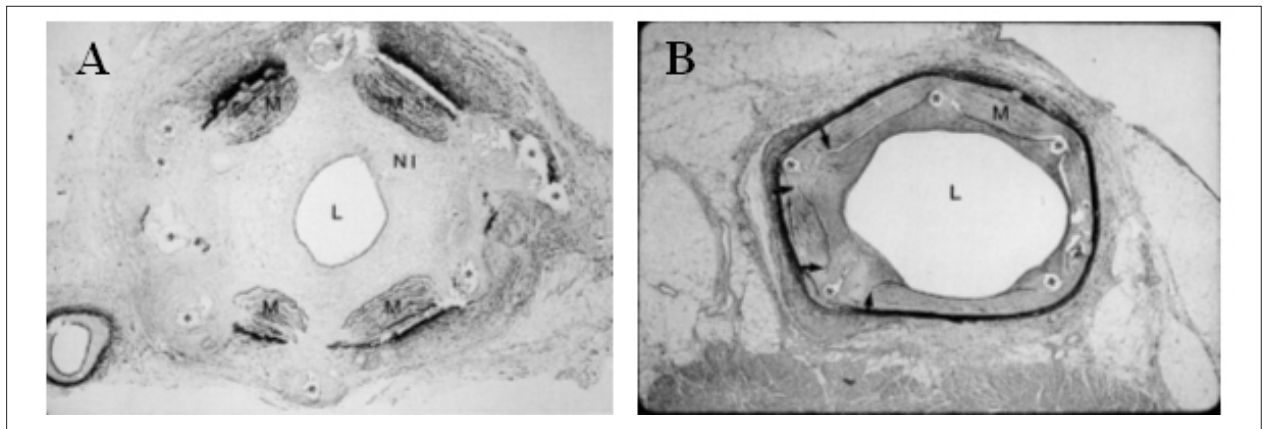
SES e SEP sobrepostos em um modelo de artéria íliaca de coelho mostraram endotelização incompleta em relação aos controles tratados com SM<sup>52</sup>. Recentemente, Nakazawa e cols.<sup>53</sup> e colegas analisaram a comparação dos dados pré-clínicos do SES, SEP e o Endeavor, um *stent* com eluição de zotarolimus revestido com fosforilcolina (Medtronic Vascular, Santa Rosa, CA). Nessa análise, observou-se uma cobertura endotelial incompleta em locais com e sem sobreposição dos *stents*, tanto do SES quanto do SEP, comparado com o SEZ e o SM, embora as diferenças não fossem mais pronunciadas nos segmentos sobrepostos (Fig. 4). Esses achados foram acompanhados de maior aumento de fibrina e células inflamatórias no SES do que no SEP ou no SM, aumento esse que persistiu por 90 dias após a implantação do dispositivo<sup>53</sup>.

Dois estudos que utilizaram amostras de autópsia humana indicaram que a cobertura endotelial incompleta das hastes do *stent* desempenharam um papel importante como preditor morfométrico de trombose tardia do *stent*, embora a causa desse problema provavelmente seja multifatorial, com reendotelização retardada associada a outros fatores de risco clínicos e/ou relacionados ao procedimento<sup>51,52</sup>. O desempenho do *stent* deve ser avaliado em dois momentos: o primeiro depois de 28 dias para observar a ocorrência de hiperplasia neointimal, e pelo menos mais uma vez para analisar os efeitos a longo prazo. A segunda avaliação (depois de 3 a 6 meses) depende da época em que a “cicatrização” e a liberação do fármaco tenham sido concluídas. É importante observar que o FDA recomenda um intervalo de seis meses após a implantação do *stent* para a obtenção dos dados pré-clínicos.

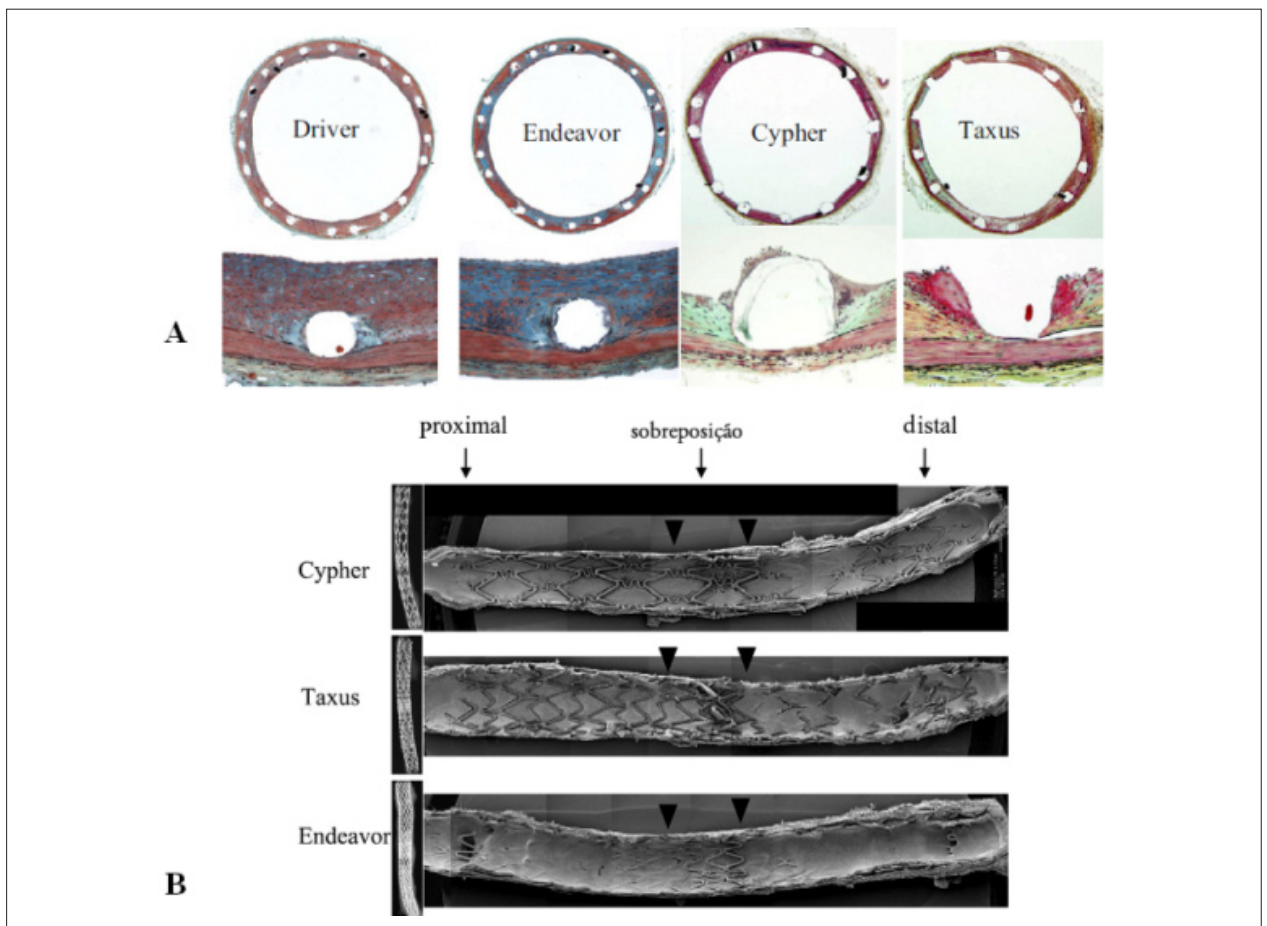


**Fig. 2** - Sistemas de pontuação para a resposta suína à lesão causada pelo *stent*; A - Anatômico (escore de Schwartz); 0 - endotélio desnudado. LEI intacta; Mídia comprimida, mas não lacerada; 1 - LEI lacerada; Mídia comprimida, mas não lacerada; 2 - LEI lacerada. Mídia lacerada; LEE comprimida, mas não lacerada; 3 - Mídia bastante lacerada; LEE lacerada; As hastes do *stent* podem estar situadas na túnica advéncia; B) Inflamatório; 0 - ausência de células inflamatórias ao redor das hastes do *stent*; 1 - leve infiltrado celular não-circunferencial localizado na haste do *stent*; 2 - infiltrado celular moderado não-circunferencial localizado na haste do *stent*; 3 - denso infiltrado celular circunferencial; M - mídia; A - advéncia; Os pontos denotam infiltrado celular inflamatório; Adaptado de Schwartz et al.<sup>52</sup> e Kornowski et al.<sup>52</sup>.





**Fig. 3** - A - O corte de fotomicrografia mostra uma proliferação neointimal grosseira causando estenose significativa (Corante de van Gieson, 30x); A proliferação grosseira e o comprometimento luminal pela neointima são visíveis; B - Corte microscópico em um caso em que, acidentalmente, nem todas as molas penetraram na túnica média do vaso; Neste corte, as duas molas mais afastadas à esquerda penetraram a média (setas) e causaram proliferação substancial; Um curto segmento da túnica média do vaso na parte inferior da figura está inteiramente normal, sem nenhuma proliferação, embora esse segmento tenha sido estirado pelo balão; Foi usado o corante de van Gieson para fibras elásticas (30x); L - lúmen; M - média; NI - neointima; \*, orifícios feitos pelas molas<sup>31</sup>.



**Fig. 4** - A - Estas fotomicrografias mostram a magnitude do espessamento neointimal, a extensão da inflamação e o escore do conteúdo de fibrina 28 dias após a colocação de stents Endeavor, com eluição de zotarolimus (SEZ); Cypher, com eluição de sirolimus (SES); Taxus, com eluição de paclitaxel (SEP); e stents Driver metálicos convencionais (SM) em artérias ilíacas de coelho; A magnitude do espessamento intimal, o grau de inflamação e o escore do conteúdo de fibrina foram mais elevados com o stent SEP; Com o SES, foram observados pontos descobertos nas hastas, que foram associadas com inflamação consistindo de heterófilos e células gigantes; B - radiografias de artérias ilíacas de coelho seccionadas longitudinalmente 21 dias após a colocação de SEZ, SES e SEP sobrepostos; A extensão da cobertura do stent por células endoteliais foi maior com o SEZ, com cobertura quase completa nos segmentos proximal e distal e cobertura significativamente maior no segmento sobreposto, em comparação com o SES e SEP. Adaptado da referência<sup>53</sup>.

## Artigo de Revisão

### Modelo de reestenose por lesão térmica em suínos

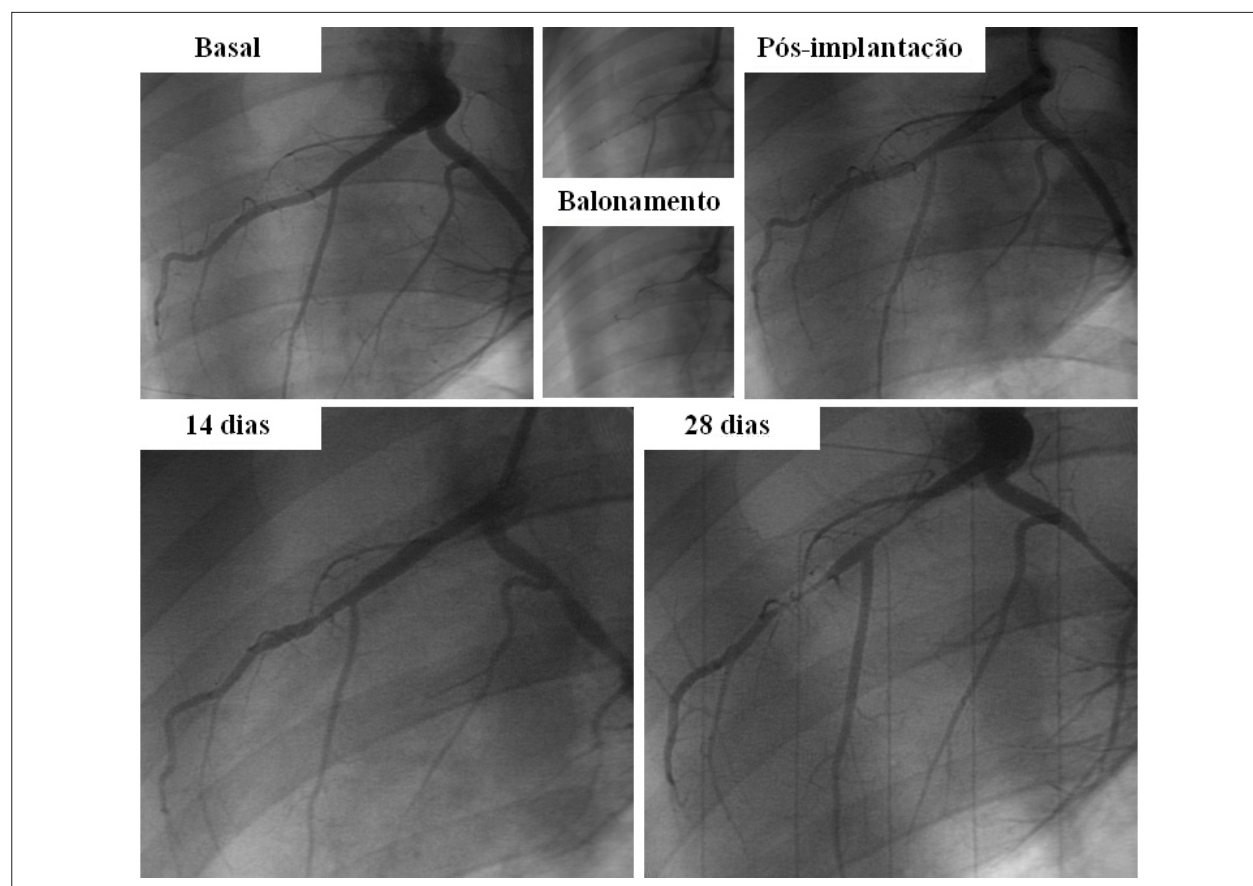
O modelo de reestenose de *stent* coronariano em suínos é um padrão bem aceito. Entretanto, a principal desvantagem desse modelo é que não há lesão estenótica nas artérias coronárias, e o próprio *stent* é um material estranho. Conseqüentemente, ele pode não ser apropriado para avaliar o desempenho de *stents* em bifurcação ou de *stents* bioabsorvíveis, devido à ausência de uma verdadeira lesão estenótica. Além disso, as imagens das artérias coronárias, como tomografia computadorizada (TC), ressonância magnética (RM), ultra-som intravascular (USIV) e tomografia de coerência óptica (TCO), podem ser prejudicadas, uma vez que o *stent* pode produzir artefato.

A angioplastia com balão térmico e radiofrequência foi introduzida na década de 1990 como uma nova técnica de dilatação arterial percutânea<sup>54-56</sup>. No entanto, em virtude do aumento das taxas de reestenose nos pacientes que receberam essa terapia<sup>57</sup>, não demorou muito para que a técnica fosse abandonada como opção de tratamento percutâneo. Usando esse sistema, Staab e col.<sup>58</sup> e o nosso laboratório<sup>39</sup> analisaram um modelo suíno de reestenose por lesão térmica. No nosso estudo, realizado com 22 porcos e um total de 54 artérias coronárias, estenoses coronarianas foram sistematicamente desenvolvidas quatro semanas após a lesão induzida por calor (Fig. 5). Com base nesses resultados, esse modelo suíno de reestenose coronariana

pode ser útil na avaliação de *stents* em bifurcação e *stents* bioabsorvíveis, em estudos de imagens coronarianas, como RM, TC, USIV e TCO, e no treinamento técnico de intervenções coronarianas percutâneas complexas, como a implantação de *stents* em lesões de bifurcação e atrectomia<sup>39</sup>.

### Modelo animal experimental de oclusão total crônica (OTC)

Avanços recentes alcançados na tecnologia dos *stents* farmacológicos (SF) mudaram o enfoque da cardiologia intervencionista de prevenção da reestenose para o tratamento de OTC. A recanalização da oclusão total crônica (OTC) é considerada a “última fronteira” da intervenção coronariana percutânea. Esse interesse estimulou o desenvolvimento de dispositivos especializados, como o Frontrunner (Lumend Inc., Redwood City, CA), que realiza microdissecções rombas<sup>59</sup>, e o Safecross (Intraluminal Therapeutics Inc., Carlsbad, CA), que usa reflectometria de coerência óptica para transpassar a OTC<sup>60</sup>. Embora a ocorrência de oclusão total crônica seja comum, existe pouquíssima informação sobre a sua fisiopatologia, e não se sabe por que algumas podem ser transpassadas e outras não. Nos últimos anos, os pesquisadores desenvolveram modelos de OTC para nortear as investigações terapêuticas, inclusive intervenções guiadas por imagem e o desenvolvimento de novos dispositivos.

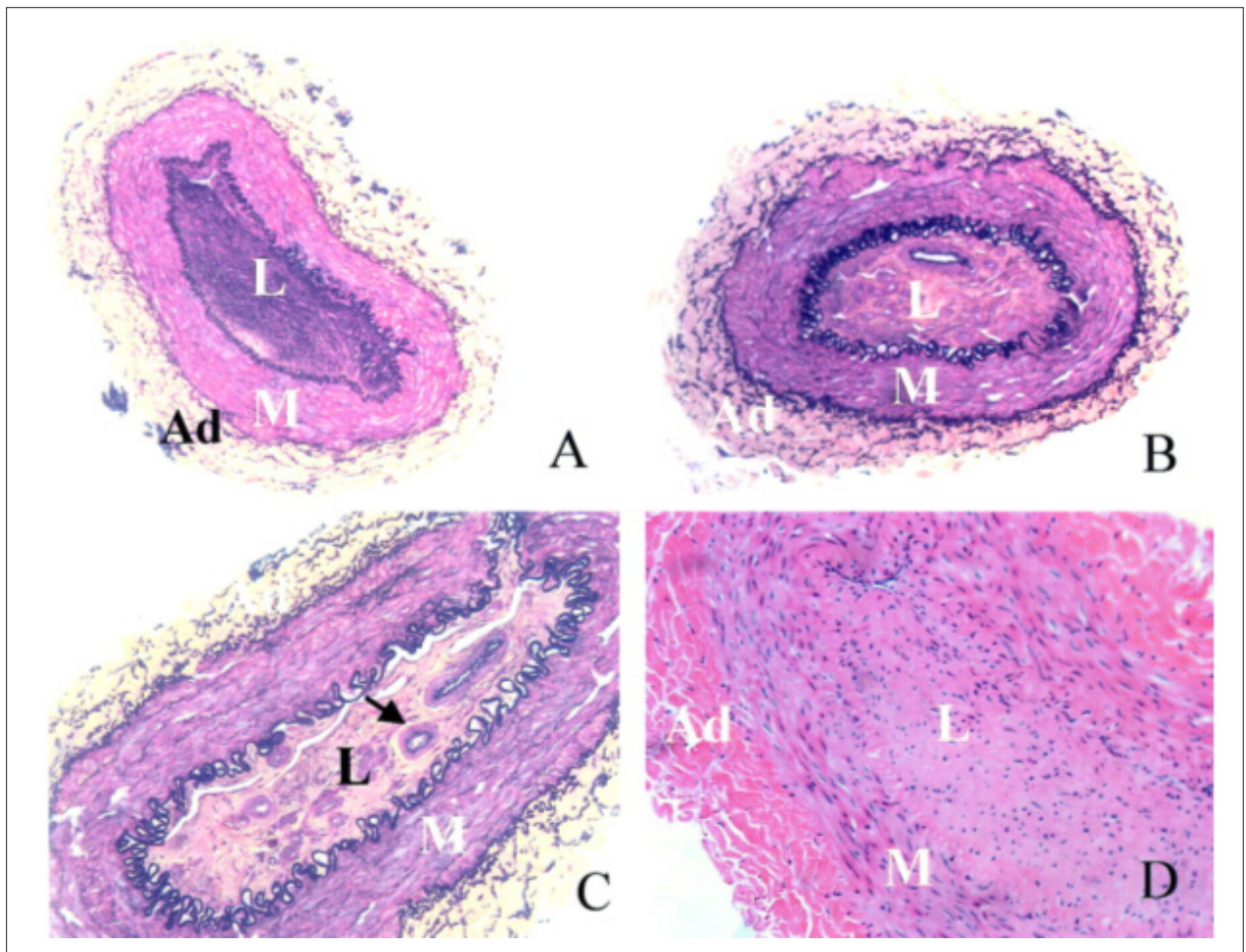


**Fig. 5** - Angiografia coronária do porco tratado com balão térmico; Evolução temporal de artéria coronariana tratada com balão térmico; Uma grave estenose sequencial da artéria coronária é observada na artéria descendente anterior esquerda (DAE) quatro semanas após a lesão por balão térmico, muito embora a artéria permanecesse hiperestendida até duas semanas após o procedimento<sup>39</sup>.

### Apanhado geral sobre modelos animais para OTC

A ruptura espontânea da placa aterosclerótica e a subsequente oclusão arterial não ocorrem naturalmente em nenhum modelo animal, mesmo naqueles que foram geneticamente modificados para apresentar maior formação de ateroma. Nos últimos anos, os pesquisadores têm tentado desenvolver diversos tipos de modelos animais de OTC. O método inicial utilizado para a produção de uma oclusão total usou ligadura externa ou constricção ameróide<sup>61,62</sup>. Entretanto, uma grande desvantagem desse método é a incapacidade de facilitar o desenvolvimento de dispositivos para recanalizar a OTC. As técnicas empregadas subsequentemente para a formação endoluminal de OTC em artérias coronárias e periféricas diferiam em sua abordagem. Murphy e cols.<sup>63</sup> avaliaram quatro métodos em um modelo de artéria íliaca de coelho para o desenvolvimento de trombose obliterante arterial periférica. Desses métodos, o que emprega secagem a gás, injeção de trombina e dieta hipercolesterolêmica foi considerado o mais eficaz. Strauss e colegas posteriormente modificaram o modelo de injeção de trombina infundindo colagenase antes da passagem do fio-guia<sup>64</sup>. Várias características da OTC humana ficaram evidentes nesse modelo, inclusive

a presença de tecido fibroso maduro, múltiplos microcanais vasculares intraluminais, depósitos lipídicos extracelulares e ruptura da lâmina elástica interna (LEI) (Fig.6). Esse estudo indicou que os microcanais podem facilitar a passagem do fio-guia no local da oclusão<sup>65</sup>. Outros modelos de OTC foram *stents* com fluxo obstruído e até mesmo injeção direta de álcool para promover trombose<sup>66</sup>. O desenvolvimento de um modelo preciso e reprodutível de OTC coronária semelhante à humana é uma tarefa complexa, pois 1) os vasos coronários são menos acessíveis a uma abordagem cirúrgica direta; 2) é difícil simular uma patologia luminal e medial, que inclua também a formação de microcalcificações; e 3) para mimetizar uma lesão OTC humana é preciso que haja um componente inflamatório concomitante<sup>67,68</sup>. A angioplastia com balão e a implantação de *stents* em artérias coronárias de animais, ambos métodos padronizados para o desnudamento dos vasos e a consequente proliferação neointimal, raramente resultam no desenvolvimento de OTC. Algumas medidas mais agressivas já testadas são o uso de lesão térmica e a implantação de *stent* de cobre, como descrito anteriormente<sup>39</sup>. Foram utilizados também polímeros para produzir oclusões coronarianas crônicas. Os primeiros implantes



**Fig. 6 -** Oclusão total crônica. (OTC) em modelo de artéria íliaca de coelho; O lúmen (L) está obstruído por lesão intimal fibrótica; Observa-se a presença de estreitos canais vasculares (B, seta em C); M, média; A, adventícia; A e B, coloração pelo método de Movat, 10x; C, coloração pelo método de Movat, 20x; D, coloração com hematoxilina-eosina, 20x; Adaptado da referência 64



## Artigo de Revisão

poliméricos foram abandonados como plataformas de *stents*, pois induziam uma forte resposta inflamatória e oclusão do vaso<sup>69</sup>. Prosser e cols.<sup>70</sup> relataram a colocação do polímero ácido poli-L-láctico microporoso em artérias coronárias de porcos e cães. O polímero é absorvido em cerca de 28 dias, produzindo uma oclusão com microcanais histologicamente semelhante ao do ser humano<sup>70</sup>. Esses modelos animais podem contribuir para uma maior compreensão da biologia da OTC humana, permitindo a realização de pesquisas sobre novos dispositivos e fármacos com o objetivo de aumentar a taxa de sucesso da recanalização dessas lesões complexas.

### Intervenções percutâneas para tratamento de valvopatia

Reparo e substituição de valva são procedimentos cirúrgicos comuns e eficazes na eliminação ou redução significativa da disfunção valvar. Entretanto, o uso desses procedimentos como tratamento único de pacientes com baixa fração de ejeção ainda é objeto de controvérsia. A dificuldade no tratamento de pacientes com insuficiência cardíaca congestiva causada por valvopatia reside na escolha de um único método de reparo para abordar diversos fatores, como alinhamento dos folhetos valvares, o diâmetro do anel e a geometria do aparelho subvalvar. Aliado ao risco de morbimortalidade associado à cirurgia cardíaca a céu aberto, esses procedimentos representam um desafio para o cirurgião e um risco para o paciente. Isso motivou os cientistas a projetar dispositivos capazes de tratar a disfunção valvar de maneira minimamente invasiva. Com base na experiência adquirida com o desenvolvimento de próteses valvares cirúrgicas, o FDA estabeleceu diretrizes detalhadas para a avaliação de fatores como fadiga, dinâmica de fluxo e hidrodinâmica dos implantes valvares, bem como processos para estudos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo* de próteses valvares cardíacas. O objetivo desses estudos pré-clínicos não é apenas o desenvolvimento dos dispositivos e a aplicação de testes de durabilidade, mas também otimizar a avaliação por métodos de imagem e estabelecer protocolos ideais para o implante das próteses. Além disso, os últimos estágios da avaliação pré-clínica devem incluir um treinamento abrangente do usuário<sup>71</sup>.

A próxima seção enfocará o tratamento percutâneo de valvopatia.

### Substituição de valva aórtica

A aortopatia relacionada com a idade contribui para o aumento contínuo da morbidade e mortalidade em todo o mundo e está associada ao aumento do número de procedimentos de substituição da valva aórtica registrado na última década. Estenose aórtica degenerativa, uma anomalia valvar comum do adulto<sup>72</sup>, tem sido tratada por métodos percutâneos desde meados da década de 1980. Até o momento, foram introduzidos dois procedimentos de valvoplastia aórtica percutânea<sup>73,74</sup> (Fig.7). O modelo ovino é o preferido para a avaliação *in vivo* de dispositivos percutâneos de valva aórtica. Atualmente, não existe modelo animal crônico de estenose aórtica. Embora o modelo ovino saudável tenha contribuído para a validação do funcionamento do cateter, ancoramento da prótese, funcionamento do dispositivo após a implantação e fluxo de sangue coronariano normal, esse modelo tem diversas limitações:

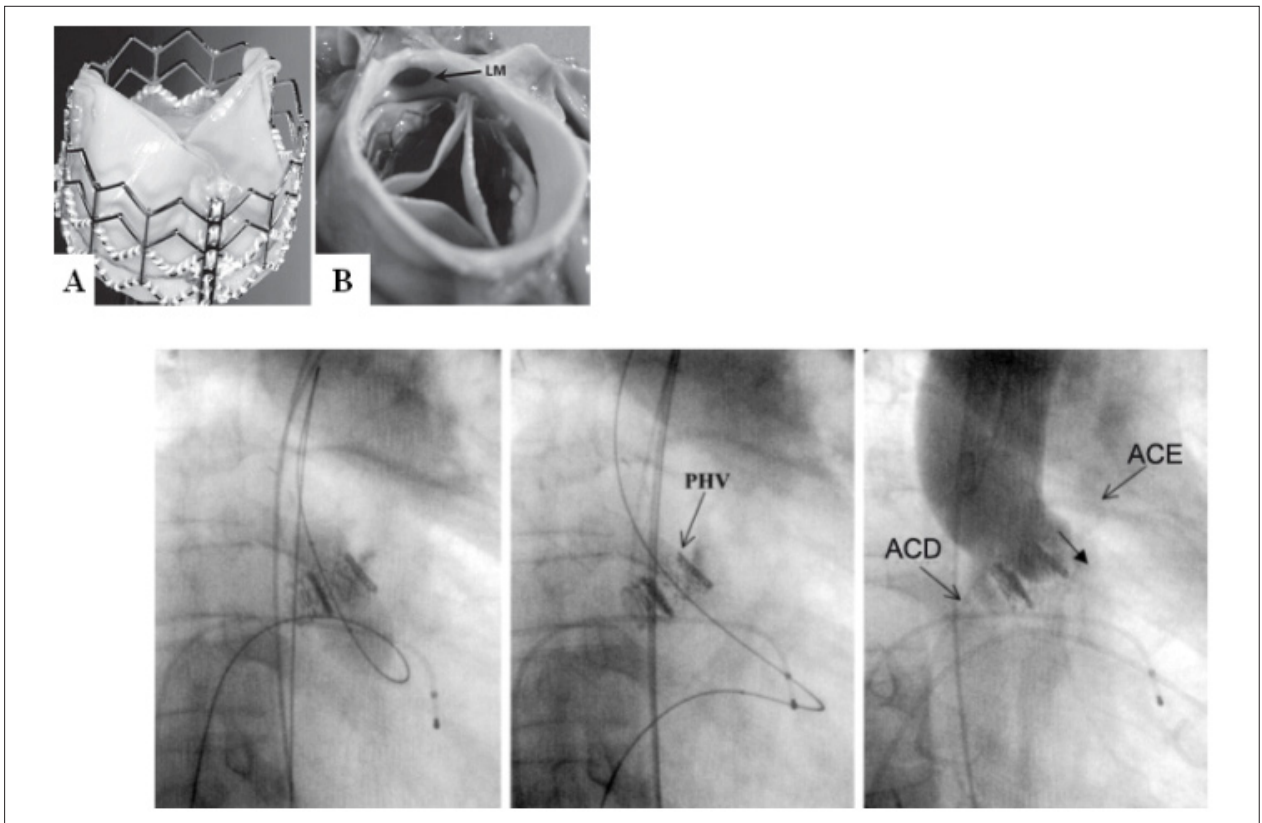
- 1) o diâmetro das artérias femorais (geralmente  $\leq$  5mm);
- 2) a angulação do arco aórtico (a causa de dobra do sistema introdutor);
- 3) o comprimento do arco aórtico (mais curto do que o do ser humano); e
- 4) a localização dos óstios coronários (mais próximos da valva aórtica do que no ser humano)<sup>71</sup>. Novas tecnologias valvares poderão solucionar os problemas de acesso e outras limitações dos dispositivos de primeira geração.

### Reparo da valva mitral

A valva mitral é uma estrutura anatômica e fisiologicamente complexa. Seu funcionamento adequado depende de uma interação coordenada entre o anel mitral, as cúspides, as cordas, os músculos papilares e o ventrículo esquerdo. Uma maior compreensão dos mecanismos da disfunção da valva mitral, associada aos avanços alcançados na tecnologia de cateter, levou ao desenvolvimento de diversas abordagens percutâneas para reparo da valva mitral<sup>75</sup>. As inovações tentam reproduzir as técnicas de reparo mitral cirúrgico. Assim como no caso das próteses de valva aórtica, o modelo ovino é o preferido para avaliação *in vivo* de dispositivos percutâneos de valva mitral. Até hoje, foram publicados os dados de dois tipos de modelos animais<sup>76-79</sup>. Um deles é o modelo de insuficiência cardíaca induzida por estimulação rápida, e o outro é o modelo de insuficiência mitral (IM) isquêmica. Com o emprego de estimulação ventricular rápida progressiva durante 5 a 8 semanas (180 a 240 batimentos por minuto), o aumento na dimensão do ventrículo esquerdo produz insuficiência cardíaca congestiva e insuficiência mitral. Alguns estudos relatam redução de até 24% a 28% da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) e o desenvolvimento de insuficiência mitral moderada a grave após estimulação rápida<sup>77,78,80</sup>. Uma desvantagem desse modelo é que, após a recuperação da estimulação rápida, a função do VE retorna aos níveis observados em animais saudáveis<sup>81</sup>. Os pesquisadores devem atentar para esse fato na hora de avaliar a eficácia do dispositivo. A insuficiência mitral isquêmica é induzida por oclusão da artéria coronária; no entanto, a anatomia variável da árvore coronariana representa uma dificuldade. Gorman e cols.<sup>82</sup> analisaram a relação entre a anatomia da artéria coronária e o desenvolvimento de insuficiência mitral isquêmica e concluíram que só um infarto posterior por oclusão da artéria circunflexa esquerda era capaz de induzir IM isquêmica aguda ou crônica. As principais preocupações em relação a esse modelo são a mortalidade e o desenvolvimento sistemático de insuficiência mitral. A taxa de mortalidade associada ao infarto do miocárdio é de aproximadamente 30% a 40%, e o desenvolvimento de insuficiência mitral gira em torno de 20% a 30%<sup>82</sup>. Talvez não seja necessário um modelo “doente” para o desenvolvimento de dispositivos ou para a elaboração de testes de durabilidade dos protocolos de colocação ideal. Duas abordagens percutâneas – reparo borda a borda e anuloplastia – foram submetidas a extensos estudos pré-clínicos e a uma análise clínica preliminar, como mostra a tabela:

- 1) **Reparo borda a borda:** o primeiro estudo de fase I de viabilidade sobre um dispositivo mitral percutâneo já foi concluído<sup>83</sup>. Um clipe mitral transcater (MitraClip™, Evalve,



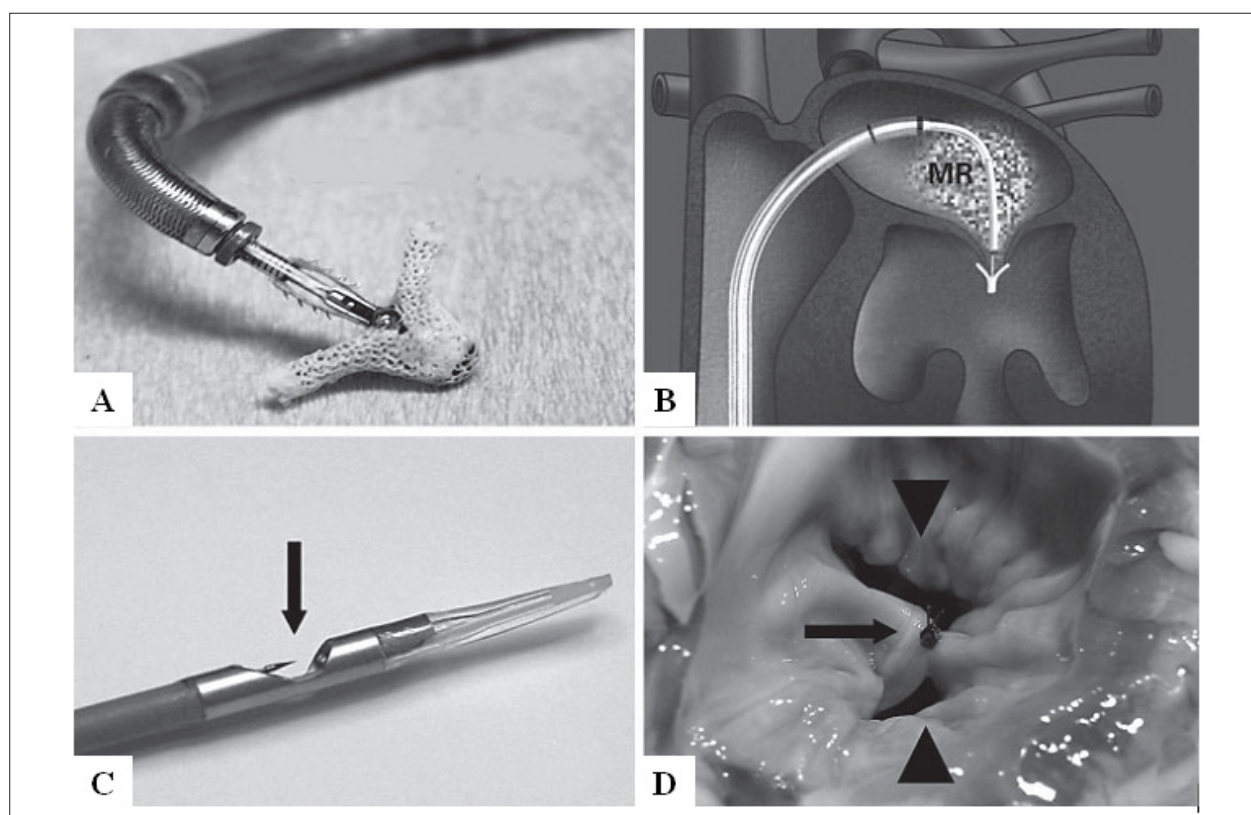


**Fig. 7 -** Implante percutâneo de válvula cardíaca na valva nativa; A - Visão superior da válvula cardíaca percutânea (PHV) feita de folhetos pericárdicos suturados em um stent de aço inoxidável expansível por balão (Edwards Lifesciences); B - Visão superior da válvula expandida no interior da valva aórtica nativa na posição subcoronariana; TCE - tronco da artéria coronária esquerda; Válvula implantada na valva aórtica nativa calcificada; À esquerda, insuflação máxima do balão (23 mm) para a colocação da válvula; No meio, a válvula implantada na parte média da valva aórtica nativa empurra para os lados os folhetos calcificados; À direita, a angiografia supra-aórtica realizada após o implante percutâneo de válvula aórtica mostra ausência de regurgitação aórtica no implante e leve regurgitação paravalvar (seta); Os dois óstios coronários estão desobstruídos e removidos da prótese valvar; ACE - artéria coronária esquerda; ACD - artéria coronária direita. Adaptado da referência 73.

**Tabela 1 –** Tratamento transcater de la válvula mitral

Categoria do reparo/Nome	Descrição	Estágio atual
Reparo borda a borda		
MitraClip (Evalve)	Clipe para reparo borda a borda	Estudo clínico de fase II
MOBIUS (Edwards)	Reparo borda a borda baseado em sutura	Estudo clínico de fase I
Medtronic	Reparo borda a borda	Pré-clínico
St. Jude	Reparo borda a borda	Pré-clínico
Anuloplastia		
MONARCH (Edwards)	Baseado no seio coronário com âncoras e elemento de tensionamento	Estudo clínico de fase I
Carillon (Cardiac Dimensions)	Baseado no seio coronário com âncoras e elemento de constritivo	Estudo clínico de fase I
PTMA (Viacor)	Baseado no seio coronário com efeito do tratamento reversível e ajustável	Estudo clínico de fase I
Implant (Extensia)	Baseado no seio coronário com âncoras e elemento de tensionamento	Pré-clínico
Mitralign	Sistema baseado em sutura transventricular que usa o seio coronário como um guia anatômico	Pré-clínico
Accucinch (Guided Delivery Systems)	Constricção anular transventricular	Pré-clínico
PS3 (Ample)	Abordagem transventricular e transeptal para encurtar as dimensões mitrales septo-laterais	Pré-clínico
Outro		
i-Coapsys (Myocor)	Remodelamento transventricular epicárdico com acesso pericárdico	Pré-clínico

## Artigo de Revisão



**Fig. 8** - A - Dispositivo Mitraclip (Evalve) com as hastes do clipe na posição aberta; B - O átrio esquerdo é acessado com o dispositivo por meio de cateterização transeptal, e o clipe prende os folhetos mitrais da superfície do ventrículo esquerdo; C - uma abertura de sucção (seta) é usada para aproximar os folhetos do cateter (Edwards Lifesciences), para que a porção central também seja suturada (seta, d); D - O resultado é uma valva mitral com dois orifícios (cabeças de seta); Adaptado da referência 87.

Menlo Park, CA) colocado nas bordas livres dos folhetos mitrais através de uma punção transeptal simula o procedimento cirúrgico de Alfieri (Fig.8). Outra tecnologia de reparo borda a borda, o sistema de reparo de folheto valvar MIOBIUS (Edwards Lifesciences, Irvine, CA), usa uma tecnologia baseada em sutura para completar um reparo do tipo de Alfieri. Os resultados dos estudos pré-clínicos confirmaram a viabilidade dessa abordagem para a criação de um reparo borda a borda<sup>84</sup>.

**2) Anuloplastia:** foram desenvolvidas diversas técnicas percutâneas para alterar a geometria do anel mitral, como anuloplastia baseada no seio coronário, anuloplastia intracavitária direta e outros dispositivos constritivos novos<sup>76-79,85</sup>. O encurtamento ou remodelamento do anel por meio da inserção de um dispositivo no seio coronário pode imitar uma anuloplastia cirúrgica. Provas preliminares de conceito foram demonstradas experimentalmente com a publicação de um estudo inicial de viabilidade em seres humanos com o MONARCH™ (Edwards Lifesciences, Irvine, CA), que consiste em um implante de nitinol auto-expansível com âncoras distais e proximais semelhantes a um *stent*<sup>86</sup>.

Existem vários outros dispositivos valvares percutâneos em desenvolvimento. Ao longo da próxima década, os estudos clínicos elucidarão a relação dessas novas abordagens entre si

e em relação aos tratamentos cirúrgicos e clínicos atuais. Essas tecnologias percutâneas serão cuidadosamente estudadas e submetidas a um escrutínio muito maior do que o aplicado às novas terapias cirúrgicas.

### Conclusão

A área de tecnologia de intervenções cardiovasculares percutâneas está se desenvolvendo rapidamente, o que significa que as informações contidas neste artigo em breve poderão estar obsoletas. Será importante, porém, compreender os conceitos básicos, pois todos os futuros avanços serão gerados pelos estudos iniciais, inclusive os estudos pré-clínicos. O sucesso dessa subespecialidade intervencionista depende de um trabalho conjunto entre o cardiologista, o cirurgião cardíaco e a indústria de aparelhos médicos. Está começando uma nova era na disciplina de doenças cardiovasculares, com implicações não apenas no tratamento dos pacientes, mas também na área de cooperação multidisciplinar.

### Agradecimentos

Agradecemos ao Dr. Heidi Bonneau, RN, MS, CCA, pela revisão editorial deste trabalho.

**Potencial Conflito de Interesses**

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

**Fontes de Financiamento**

O presente estudo não teve fontes de financiamento

externas.

**Vinculação Acadêmica**

Não há vinculação deste estudo a programas de pós-graduação.

**Referências**

1. Serruys PW, Degertekin M, Tanabe K, Abizaid A, Sousa JE, Colombo A, et al. Intravascular ultrasound findings in the multicenter, randomized, double-blind RAVEL (RAndomized study with the sirolimus-eluting VELOCITY balloon-expandable stent in the treatment of patients with de novo native coronary artery Lesions) trial. *Circulation*. 2002; 106 (7): 798-803.
2. Sousa JE, Costa MA, Abizaid A, Sousa AG, Feres F, Mattos LA, et al. Sirolimus-eluting stent for the treatment of in-stent restenosis: a quantitative coronary angiography and three-dimensional intravascular ultrasound study. *Circulation*. 2003; 107 (1): 24-7.
3. Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, Fajadet J, Ban Hayashi E, Perin M, et al. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med*. 2002; 346 (23): 1773-80.
4. Park SJ, Shim WH, Ho DS, Raizner AE, Park SW, Hong MK, et al. A paclitaxel-eluting stent for the prevention of coronary restenosis. *N Engl J Med*. 2003; 348 (16): 1537-45.
5. Gallo R, Padurean A, Jayaraman T, Marx S, Roque M, Adelman S, et al. Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by targeting regulators of the cell cycle. *Circulation*. 1999; 99 (16): 2164-70.
6. Suzuki T, Kopia C, Hayashi S, Bailey LR, Llanos G, Wilensky R, et al. Stent-based delivery of sirolimus reduces neointimal formation in a porcine coronary model. *Circulation*. 2001; 104 (10): 1188-93.
7. Teirstein PS. Living the dream of no restenosis. *Circulation*. 2001; 104 (17): 1996-8.
8. Heldman AW, Cheng L, Jenkins GM, Heller PF, Kim DW, Ware M Jr, et al. Paclitaxel stent coating inhibits neointimal hyperplasia at 4 weeks in a porcine model of coronary restenosis. *Circulation*. 2001; 103 (18): 2289-95.
9. Schwartz RS, Edelman ER, Carter A, Chronos N, Roger C, Robinson KA, et al. Drug-eluting stents in preclinical studies: recommended evaluation from a consensus group. *Circulation*. 2002; 106 (14): 1867-73.
10. Clowes AW, Schwartz SM. Significance of quiescent smooth muscle migration in the injured rat carotid artery. *Circ Res*. 1985; 56 (1): 139-45.
11. Lindner V, Reidy MA, Fingerle J. Regrowth of arterial endothelium. Denudation with minimal trauma leads to complete endothelial cell regrowth. *Lab Invest*. 1989; 61 (5): 556-63.
12. Zempo N, Koyama N, Kenagy RD, Lea HJ, Clowes AW. Regulation of vascular smooth muscle cell migration and proliferation in vitro and in injured rat arteries by a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996; 16 (1): 28-33.
13. Jackson CL, Pettersson KS. Effects of probucol on rat carotid artery responses to balloon catheter injury. *Atherosclerosis*. 2001; 154 (2): 407-14.
14. Perlman H, Luo Z, Krasinski K, Le Roux A, Mahfoudi A, Smith RC, et al. Adenovirus-mediated delivery of the Cx43 transcription factor to rat carotid arteries inhibits smooth muscle proliferation and induces apoptosis. *Gene Ther*. 1999; 6 (5): 758-63.
15. Ascher E, Scheinman M, Hingorani A, Seth P, Marella VK, Jacob T, et al. Effect of p53 gene therapy combined with CTLA4lg selective immunosuppression on prolonged neointima formation reduction in a rat model. *Ann Vasc Surg*. 2000; 14 (4): 385-92.
16. Lamfers ML, Lardenoye JH, de Vries MR, Aalders MC, Engelse MA, Grimberger JM, et al. In vivo suppression of restenosis in balloon-injured rat carotid artery by adenovirus-mediated gene transfer of the cell surface-directed plasmin inhibitor ATF.BPTI. *Gene Ther*. 2001; 8 (7): 534-41.
17. Powell JS, Muller RK, Rouge M, Ku hn H, Hefti F, Baumgartner HR. The proliferative response to vascular injury is suppressed by angiotensin-converting enzyme inhibition. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1990; 16 (Suppl 4): S42-49.
18. Berger PB, Holmes DR Jr, Ohman EM, O'Hanesian MA, Murphy JG, Schwartz RS, et al. Restenosis, reocclusion and adverse cardiovascular events after successful balloon angioplasty of occluded versus nonoccluded coronary arteries: results from the Multicenter American Research Trial With Cilazapril After Angioplasty to Prevent Transluminal Coronary Obstruction and Restenosis (MARCATOR). *J Am Coll Cardiol*. 1996; 27 (1): 1-7.
19. Peters S, Gotting B, Trummel M, Rust H, Brattström A. Valsartan for prevention of restenosis after stenting of type B2/C lesions: the VAL-PREST trial. *J Invasive Cardiol*. 2001; 13 (2): 93-7.
20. Matsumoto K, Morishita R, Moriguchi A, Tomita N, Aoki M, Sakonjo H, et al. Inhibition of neointima by angiotensin-converting enzyme inhibitor in porcine coronary artery balloon-injury model. *Hypertension*. 2001; 37 (2): 270-4.
21. Ellis SG. Do ACE inhibitors or ARBs limit restenosis after stenting? --assimilating the data. *J Invasive Cardiol*. 2001; 13 (2): 98-9.
22. Horiba M, Kadomatsu K, Nakamura E, Muramatsu H, Ikematsu S, Sakuma S, et al. Neointima formation in a restenosis model is suppressed in midkine-deficient mice. *J Clin Invest*. 2000; 105 (4): 489-95.
23. Sata M, Maejima Y, Adachi F, Fukino K, Saiura A, Sugiura S, et al. A mouse model of vascular injury that induces rapid onset of medial cell apoptosis followed by reproducible neointimal hyperplasia. *J Mol Cell Cardiol*. 2000; 32 (11): 2097-104.
24. Moroi M, Zhang L, Yasuda T, Virmani R, Gold HK, Fishman MC, et al. Interaction of genetic deficiency of endothelial nitric oxide, gender, and pregnancy in vascular response to injury in mice. *J Clin Invest*. 1998; 101 (6): 1225-32.
25. Lindner V. Vascular repair processes mediated by transforming growth factor-beta. *Z Kardiol*. 2001; 90 (Suppl 3): 17-22.
26. Kalinowski M, Alfke H, Bergen S, Klose KJ, Bary JJ, Wagner HJ. Comparative trial of local pharmacotherapy with L-arginine, r-hirudin, and molsidomine to reduce restenosis after balloon angioplasty of stenotic rabbit iliac arteries. *Radiology*. 2001; 219 (3): 716-23.
27. Nagae T, Aizawa K, Uchimura N, Tani D, Abe M, Fujishima K, et al. Endovascular photodynamic therapy using mono-L-aspartyl-chlorin e6 to inhibit Intimal hyperplasia in balloon-injured rabbit arteries. *Lasers Surg Med*. 2001; 28 (4): 381-8.
28. Kanamasa K, Otani N, Ishida N, Inoue Y, Morü H, Ishikawa K, et al. A 7-day administration of tPA or heparin in the prevention of intimal hyperplasia following vascular injury in atherosclerotic rabbits. *J Interv Cardiol*. 2002; 15 (3): 191-5.
29. Steinhilb SR, Ellis SG, Wolski K, Lincoff AM, Topol EJ. Ticlopidine pretreatment before coronary stenting is associated with sustained decrease in adverse cardiac events: data from the Evaluation of Platelet IIb/IIIa Inhibitor for Stenting



## Artigo de Revisão

- (EPISTENT) Trial. *Circulation*. 2001; 103 (10): 1403-9.
30. Nagaoka N, Matsubara T, Okazaki K, Masuda N, Shikaura K, Hotta A, et al. Comparison of ticlopidine and cilostazol for the prevention of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Jpn Heart J*. 2001; 42 (1): 43-54.
  31. Schwartz RS, Murphy JC, Edwards WD, Camrud AR, Vliestra RE, Holmes DR, et al. Restenosis after balloon angioplasty: a practical proliferative model in porcine coronary arteries. *Circulation*. 1990; 82 (6): 2190-200.
  32. Schwartz RS, Huber KC, Murphy JC, Edwards WD, Camrud AR, Vliestra RE, et al. Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model. *J Am Coll Cardiol*. 1992; 19 (2): 267-74.
  33. Schwartz RS, Holder DJ, Holmes DR, Veinot JP, Camrud AR, Jorgenson MA, et al. Neointimal thickening after severe coronary artery injury is limited by a short-term administration of a factor Xa inhibitor: results in a porcine model. *Circulation*. 1996; 93 (8): 1542-8.
  34. Huber KC, Schwartz RS, Edwards WD, Camrud AR, Bailey KR, Jorgenson MA, et al. Effects of angiotensin converting enzyme inhibition on neointimal proliferation in a porcine coronary injury model. *Am Heart J*. 1993; 125 (3): 695-701.
  35. Schwartz RS, Edelman ER, Carter A, Chronos NA, Rogers C, Robinson KA, et al. Preclinical evaluation of drug-eluting stents for peripheral applications: recommendations from an expert consensus group. *Circulation*. 2004; 110 (16): 2498-505.
  36. Ikeno F, Buchbinder M, Yeung AC. Novel stent and delivery systems for the treatment of bifurcation lesions: porcine coronary artery model. *Cardiovasc Revasc Med*. 2007; 8 (1): 38-42.
  37. Ikeno F, Inagaki K, Rezaee M, Mochly-Rosen D. Impaired perfusion after myocardial infarction is due to reperfusion-induced deltaPKC-mediated myocardial damage. *Cardiovasc Res*. 2007; 73 (4): 699-709.
  38. Suzuki Y, Lyons JK, Yeung AC, Ikeno F. In vivo porcine model of reperfused myocardial infarction: in situ double staining to measure precise infarct area/area at risk. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2008; 71 (1): 100-7.
  39. Suzuki Y, Lyons JK, Yeung AC, Ikeno F. The porcine restenosis model using Thermal Balloon Injury: comparison with the model by coronary stenting. *J Invasive Cardiol*. 2008; 20 (3): 142-6.
  40. Lowe HC, Schwartz RS, MacNeill BD, Jang JK, Hayase M, Rogers C, et al. The porcine coronary model of in-stent restenosis: current status in the era of drug-eluting stents. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2003; 60 (4): 515-23.
  41. Lowe HC, Kumar RK, Chesterman CN, Fahmy RG, Khachigian LM. Coronary stent thrombosis: insights from the porcine coronary stent model. *Thromb Haemost*. 2001; 86 (3): 937-8.
  42. Kornowski R, Hong MK, Tio FO, Bramwell O, Wu H, Leon MB, et al. In-stent restenosis: contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia. *J Am Coll Cardiol*. 1998; 31 (1): 224-30.
  43. Tanner FC, Boehm M, Akyurek LM, San H, Yang ZY, Tashiro J, et al. Differential effects of the cyclin-dependent kinase inhibitors p27(Kip1), p21(Cip1), and p16(Ink4) on vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation*. 2000; 101 (17): 2022-5.
  44. Sun J, Marx SO, Chen HJ, Poon M, Marks AR, Rabbani LE. Role for p27(Kip1) in Vascular Smooth Muscle Cell Migration. *Circulation*. 2001; 103 (24): 2967-72.
  45. Viñals F, Chambard JC, Pouyssegur J. p70S6 kinase-mediated protein synthesis is a critical step for vascular endothelial cell proliferation. *J Biol Chem*. 1999; 274 (38): 26776-82.
  46. Abal M, Andreu JM, Barasoain I. Taxanes: microtubule and centrosome targets, and cell cycle dependent mechanisms of action. *Curr Cancer Drug Targets*. 2003; 3 (3): 193-203.
  47. Carter AJ, Laird JR, Farb A, Kufs W, Wortham DC, Virmani R. Morphologic characteristics of lesion formation and time course of smooth muscle cell proliferation in a porcine proliferative restenosis model. *J Am Coll Cardiol*. 1994; 24 (5): 1398-405.
  48. Edelman ER, Rogers C. Pathobiologic responses to stenting. *Am J Cardiol*. 1998; 81 (7A): 4E-6E.
  49. Virmani R, Kolodgie FD, Farb A, Lafont A. Drug eluting stents: are human and animal studies comparable? *Heart*. 2003; 89 (2): 133-8.
  50. Kotani J, Awata M, Nanto S, Uematsu M, Oshima F, Minamiguchi H, et al. Incomplete neointimal coverage of sirolimus-eluting stents: angioscopic findings. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 47 (10): 2108-11.
  51. Joner M, Finn AV, Farb A, Mont EK, Kolodgie FD, Ladich E, et al. Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 48 (1): 193-202.
  52. Finn AV, Kolodgie FD, Harnek J, Guerrero LJ, Acampado E, Tefera K, et al. Differential response of delayed healing and persistent inflammation at sites of overlapping sirolimus- or paclitaxel-eluting stents. *Circulation*. 2005; 112 (2): 270-8.
  53. Nakazawa G, Finn AV, John MC, Kolodgie FD, Virmani R. The significance of preclinical evaluation of sirolimus-, paclitaxel-, and zotarolimus-eluting stents. *Am J Cardiol*. 2007; 100 (8B): 36M-44M.
  54. Becker GJ, Lee BI, Waller BF, Barry KJ, Kaplan J, Connolly R, et al. Radiofrequency balloon angioplasty: rationale and proof of principle. *Invest Radiol*. 1988; 23 (11): 810-7.
  55. Lee BI, Becker GJ, Waller BF, Barry KJ, Connolly RJ, Kaplan J, et al. Thermal compression and molding of atherosclerotic vascular tissue with use of radiofrequency energy: implications for radiofrequency balloon angioplasty. *J Am Coll Cardiol*. 1989; 13 (5): 1167-75.
  56. Yamashita K, Satake S, Ohira H, Ohtomo K. Radiofrequency thermal balloon coronary angioplasty: a new device for successful percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol*. 1994; 23 (2): 336-40.
  57. Saito S, Arai H, Kim K, Aoki N. Initial clinical experiences with rescue unipolar radiofrequency thermal balloon angioplasty after abrupt or threatened vessel closure complicating elective conventional balloon coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol*. 1994; 24 (5): 1220-8.
  58. Staab ME, Srivatsa SS, Lerman A, Sangiorgi G, Jeong MH, Edwards WD, et al. Arterial remodeling after experimental percutaneous injury is highly dependent on adventitial injury and histopathology. *Int J Cardiol*. 1997; 58 (1): 31-40.
  59. Orlic D, Stankovic G, Sangiorgi G, Airolidi F, Chieffo A, Micev I, et al. Preliminary experience with the Frontrunner coronary catheter: novel device dedicated to mechanical revascularization of chronic total occlusions. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2005; 64 (2): 146-52.
  60. Ng W, Chen W-H, Lee PY, Lau CP. Initial experience and safety in the treatment of chronic total coronary occlusions with a new optical coherent reflectometry-guided radiofrequency ablation guidewire. *Am J Cardiol*. 2003; 92 (6): 732-4.
  61. Elzinga WE. Ameroid constrictor: uniform closure rates and a calibration procedure. *J Appl Physiol*. 1969; 27 (3): 419-21.
  62. Bredee JJ, Blickman JR, Holman van der Heide JN, Kootstra CJ, Zeelenberg HJ, Zijlstra WC. Standardized induction of myocardial ischaemia in the dog. *Eur Surg Res*. 1975; 7 (4-5): 269-86.
  63. Murphy TP, Dorfman GS, Esparza AR, Duwaji MS, Smith WJ. Arteriosclerosis obliterans in a rabbit model. *Invest Radiol*. 1992; 27 (12): 1059-63.
  64. Strauss BH, Goldman L, Qiang B, Nili N, Segev A, Butany J, et al. Collagenase plaque digestion for facilitating guide wire crossing in chronic total occlusions. *Circulation*. 2003; 108 (10): 1259-62.
  65. Strauss BH, Segev A, Wright GA, Chiang B, Munce N, Anderson KJ, et al. Microvessels in chronic total occlusions: pathways for successful guidewire crossing? *J Interv Cardiol*. 2005; 18 (6): 425-36.
  66. Nikol S, Armeanu S, Engelmann MG, Pelisek J, Fuchs A, Zahringer C, et al. Evaluation of endovascular techniques for creating a porcine femoral artery occlusion model. *J Endovasc Ther*. 2001; 8 (4): 401-7.
  67. Katsuragawa M, Fujiwara H, Miyamae M, Sassayama S. Histologic studies in percutaneous transluminal coronary angioplasty for chronic total occlusion: comparison of tapering and abrupt types of occlusion and short and long occluded segments. *J Am Coll Cardiol*. 1993; 21 (3): 604-11.
  68. Srivatsa SS, Edwards WD, Boos CM, Grill DE, Sangiorgi GM, Garratt KN, et al. Histologic correlates of angiographic chronic total coronary artery occlusions: influence of occlusion duration on neovascular channel patterns and intimal

- plaque composition. *J Am Coll of Cardiol.* 1997; 29 (5): 955-63.
69. Tanguay JF, Zidar JP, Phillips HR 3rd, Stack RS. Current status of biodegradable stents. *Cardiol Clin.* 1994; 12 (4): 699-713.
70. Prosser L, Agrawal CM, Polan J, Elliott J, Adams DG, Bailey SR. Implantation of oxygen enhanced, three-dimensional microporous L-PLA polymers: a reproducible porcine model of chronic total coronary occlusion. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2006; 67 (3): 412-6.
71. Fann JI, Chronos N, Rowe SJ, Michiels R, Lyons BE, Leon MB, et al. Evolving strategies for the treatment of valvular heart disease: Preclinical and clinical pathways for percutaneous aortic valve replacement. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2008; 71 (3): 434-40.
72. Iung B, Baron G, Butchart EG, Delahaye F, Gohlke-Barwolf C, Leung OW, et al. A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease. *Eur Heart J.* 2003; 24 (13): 1231-43.
73. Cribier A, Eltchaninoff H, Bash A, Borenstein N, Tron C, Bauer F, et al. Percutaneous transcatheter implantation of an aortic valve prosthesis for calcific aortic stenosis: first human case description. *Circulation.* 2002; 106 (24): 3006-8.
74. Grube E, Laborde JC, Zickmann B, Gerckens U, Felderhoff T, Sauren B, et al. First report on a human percutaneous transluminal implantation of a self-expanding valve prosthesis for interventional treatment of aortic valve stenosis. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2005; 66 (4): 465-9.
75. Gillinov AM, Liddicoat JR. Percutaneous mitral valve repair. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 2006; 18 (2): 115-21.
76. Liddicoat JR, Mac Neill BD, Gillinov AM, Cohn WE, Chin CH, Prado AD, et al. Percutaneous mitral valve repair: a feasibility study in an ovine model of acute ischemic mitral regurgitation. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2003; 60 (3): 410-6.
77. Kaye DM, Byrne M, Alferness C, Power J. Feasibility and short-term efficacy of percutaneous mitral annular reduction for the therapy of heart failure-induced mitral regurgitation. *Circulation.* 2003; 108 (15): 1795-7.
78. Maniu CV, Patel JB, Reuter DG, Mayer DM, Edwards WD, Rihal CS, et al. Acute and chronic reduction of functional mitral regurgitation in experimental heart failure by percutaneous mitral annuloplasty. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 44 (8): 1652-61.
79. Daimon M, Shiota T, Gillinov AM, Hayase M, Ruel M, Cohn WE, et al. Percutaneous mitral valve repair for chronic ischemic mitral regurgitation: a real-time three-dimensional echocardiographic study in an ovine model. *Circulation.* 2005; 111 (17): 2183-9.
80. Komamura K, Shannon RP, Pasipoularides A, Ihara T, Lader AS, Patrick TA, et al. Alterations in left ventricular diastolic function in conscious dogs with pacing-induced heart failure. *J Clin Invest.* 1992; 89 (6): 1825-38.
81. Yamamoto K, Burnett JC Jr, Meyer LM, Sinclair L, Stevens TL, Redfield MM. Ventricular remodeling during development and recovery from modified tachycardia-induced cardiomyopathy model. *Am J Physiol.* 1996; 271 (6 Pt 2): R1529-1534.
82. Gorman RC, McCaughan JS, Ratcliffe MB, Gupta KB, Streicher JT, Ferrari VA, et al. Pathogenesis of acute ischemic mitral regurgitation in three dimensions. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995; 109 (4): 684-93.
83. Feldman T, Wasserman HS, Herrmann HC, Gray W, Block PC, Whitlow P, et al. Percutaneous mitral valve repair using the edge-to-edge technique: six-month results of the EVEREST Phase I Clinical Trial. *J Am Coll Cardiol.* 2005; 46 (11): 2134-40.
84. Alfieri O, Elefteriades JA, Chapolini RJ, Steckel R, Allen WJ, Reed SW, et al. Novel suture device for beating-heart mitral leaflet approximation. *Ann Thorac Surg.* 2002; 74 (5): 1488-93.
85. Feldman T. Percutaneous valve repair and replacement: challenges encountered, challenges met, challenges ahead. *Circulation.* 2006; 113 (6): 771-3.
86. Webb JG, Harnek J, Munt BI, Kimblad PO, Chandavimol M, Thompson CR, et al. Percutaneous transvenous mitral annuloplasty: initial human experience with device implantation in the coronary sinus. *Circulation.* 2006; 113 (6): 851-5.
87. Babaliaros V, Block P. State of the art percutaneous intervention for the treatment of valvular heart disease: a review of the current technologies and ongoing research in the field of percutaneous valve replacement and repair. *Cardiology.* 2007; 107 (2): 87-96.