

Avaliação da Endotelização de Hastes de Stents em Artérias Ilíacas de Coelhos

Assessment of Stent Strut Endothelialization in Iliac Arteries of Rabbits

Celso Kiyochi Takimura¹, Ii-sei Watanabe², Francisco Rafael Martins Laurindo¹, Paulo Sampaio Gutierrez¹, Vera Demarchi Aiello¹, Spero Penha Morato³, Pedro Alves Lemos Neto¹

Instituto do Coração (InCor) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo¹, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo², Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo e Innovatech Medical Ltda³, São Paulo, SP – Brasil

Resumo

Fundamento: A rápida endotelização pós-implante de stent é ocorrência desejável por teoricamente reduzir a possibilidade de trombose do stent.

Objetivo: Avaliar a extensão da endotelização de hastes de stents eluidores de sirolimus (liberados da face luminal e abluminal e abluminal exclusivamente) em artérias ilíacas de coelhos.

Métodos: Foram implantados em artérias ilíacas de 10 coelhos quatro stents eluidores de sirolimus na face luminal e abluminal, três stents eluidores de sirolimus na face abluminal, seis stents recobertos com polímero e quatro stents sem recobrimento. Após quatro semanas, foi realizada eutanásia e utilizou-se microscopia eletrônica de varredura para quantificação da área de hastes de stent exposta e da porcentagem de endotelização.

Resultados: A área (média \pm DP) (mm^2) de hastes expostas de stent sem recobrimento, stent recoberto com polímero, stent eluidor de sirolimus na face luminal e abluminal e stent eluidor de sirolimus na face abluminal foi de $0,12 \pm 0,08$; $0,09 \pm 0,12$; $0,60 \pm 0,67$ e $0,05 \pm 0,04$ respectivamente ($p = 0,120$). A porcentagem de endotelização (média \pm DP) (%) de stent sem recobrimento, stent recoberto com polímero, stent eluidor de sirolimus na face luminal e abluminal e stent eluidor de sirolimus na face abluminal foi de 99 ± 01 ; 99 ± 0 ; 97 ± 03 e 99 ± 0 respectivamente ($p = 0,133$).

Conclusão: Após quatro semanas de implante em artérias ilíacas de coelhos, os stents com liberação de sirolimus tanto da face luminal e abluminal quanto da face abluminal exclusivamente apresentaram taxas de endotelização de hastes de stent semelhantes aos apresentados nos demais tipos de stents sem eluição de medicamento. (Arq Bras Cardiol. 2012; [online]. ahead print, PP.0-0)

Palavras-chave: Stents farmacológicos; artérias; sirolimo; microscopia eletrônica de varredura.

Abstract

Background: Fast post-implantation stent endothelialization is desirable for theoretically reducing the possibility of stent thrombosis.

Objective: To evaluate the extent of sirolimus-eluting stent strut endothelialization (delivered from the luminal and abluminal aspects or abluminal aspect only) in the iliac arteries of rabbits.

Methods: The iliac arteries of 10 rabbits were implanted with four sirolimus-eluting stents in the luminal and abluminal aspects, three sirolimus-eluting stents in the abluminal aspect, six polymer-coated stents, and four uncoated stents. After four weeks, the rabbits were euthanized and scanning electron microscopy was performed to quantify the area of exposed stent strut as well as the percentage of endothelialization.

Results: The area (mean \pm SD) (mm^2) of exposed uncoated stent struts, polymer-coated stents, sirolimus-eluting stent in the abluminal and luminal aspects and sirolimus-eluting stent in the abluminal aspect was 0.12 ± 0.08 , 0.09 ± 0.12 , 0.60 ± 0.67 and 0.05 ± 0.04 , respectively ($p = 0.120$). The percentage of endothelialization (mean \pm SD) (%) of uncoated stents, polymer-coated stents, sirolimus-eluting stents in the luminal and abluminal aspects and sirolimus-eluting stents in the abluminal aspect was 99 ± 01 , 99 ± 0 , 97 ± 03 and 99 ± 0 , respectively ($p = 0.133$).

Conclusion: After four weeks of implantation in the iliac arteries of rabbits, both the sirolimus-eluting stents in the luminal plus abluminal aspects and those in the abluminal aspect only showed stent strut endothelialization rates similar to those of the other types of non-drug eluting stents. (Arq Bras Cardiol. 2012; [online]. ahead print, PP.0-0)

Keywords: Drug eluting stents; arteries; sirolimus; microscopy, electron, scanning.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Celso Kiyochi Takimura •

Av. Açacê, 92, apto 162, Indianópolis. CEP 04075020, São Paulo, SP – Brasil
E-mail: celsotakimura@hotmail.com

Artigo recebido em 09/02/12, revisado em 10/07/12, aceito em 31/07/12.

Introdução

Estudos em animais de experimentação são fundamentais para melhor entendimento da fisiopatologia das doenças cardiovasculares¹. Esses experimentos permitem o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos e terapêuticos, além de avaliar a segurança e eficácia desses métodos, precedendo a sua aplicação em seres humanos².

A introdução dos stents coronarianos no arsenal terapêutico da cardiologia intervencionista resultou em grande evolução no tratamento da doença arterial coronariana, com evolução ainda maior quando a esses stents foram adicionados medicamentos antiproliferativos³.

O stent eluidor de sirolimus Inspiron® (Scitech® Produtos Médicos, Goiânia, Brasil) tem base em um stent de liga metálica cromo-cobalto (Cro-Co) de hastes finas (stent Cronus®)⁴. Foi concebido e desenvolvido no Brasil e recentemente obteve a aprovação para uso clínico pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). O sirolimus é liberado exclusivamente da superfície abluminal, ou seja, da face do stent voltada para a parede do vaso, de polímeros biodegradáveis e em estudo pré-clínico com implante de versão anterior desse stent farmacológico, com sirolimus desprendido tanto da superfície luminal (face do stent voltada para a luz do vaso) quanto da superfície abluminal do stent em artérias coronárias de porcos. Isso demonstrou efetiva inibição da proliferação neointimal⁵.

A presença do medicamento sirolimus apenas na face abluminal do stent teoricamente é mais vantajosa em relação a stents eluidores de sirolimus em sua face luminal e abluminal por permitir uma endotelização mais rápida dos stents⁶.

Sabe-se que a presença de hastes metálicas de stent não recobertas pelo endotélio possivelmente tem um papel importante na predisposição à ocorrência de trombose tardia⁷⁻¹⁰. Portanto, para uma estimativa da segurança clínica de stents farmacológicos, torna-se importante a estimativa em estudo pré-clínico da magnitude da taxa de endotelização de stents após a sua implantação^{7,8}.

Objetivamos avaliar a endotelização das hastes de stents farmacológicos eluidores de sirolimus produzidos pela Scitech® (com sirolimus liberados da superfície luminal e abluminal e da superfície abluminal exclusivamente) em artérias ilíacas de coelhos por meio de microscopia eletrônica de varredura comparando-se com a endotelização ocorrida em stents não liberadores de medicamentos.

Métodos

Em todos os procedimentos foram respeitadas as normas de proteção e cuidados para animais de experimentação estabelecidos nos Princípios Éticos na Experimentação Animal do Serviço de Apoio à Pesquisa e Experimentação Animal do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), assim como do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* do Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences and National Research Council, National Academy Press (Washington, D.C., 1996) e dos Princípios

Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa sob número SDC 2929/07/004.

Angiografia

Dez coelhos machos adultos da raça New Zealand, com peso médio de 3345 g (2860 a 3897 g), não ateroscleróticos, provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), foram submetidos à pré-medicação anestésica com cloridrato de cetamina (Ketalar®, Cristália) e cloridrato de xylazina 2% (Rompum®, Bayer) por via intramuscular e anestesia com administração endovenosa de pentobarbital sódico (Nembutal®).

Os animais receberam oxigênio a 3 l/min por via inalatória e tinham a sua frequência arterial e saturação de oxigênio determinadas por oxímetro de pulso com sensor colocado na cauda do animal.

Foi dissecada a artéria carótida direita de cada animal e sob a visão direta foi inserida uma bainha vascular 4F. Por essa bainha foi administrada heparina não fracionada 250 UI/kg e direcionado um fio hidrofílico 0,035" até a aorta descendente sob fluoroscopia por meio do equipamento de angiografia digital Phillips BV Pulsera®, e então foi avançado um cateter angiográfico 4F até a aorta distal. Realizou-se infusão de nitroglicerina 200 µg seguida por angiografia da aorta descendente distal e das artérias ilíacas. Em seguida foi introduzido um fio guia 0,014" Choice® PT (Boston Scientific Corporation) pelo lume do cateter angiográfico até uma das artérias ilíacas. Retirado o cateter, foi introduzido por sobre a guia um stent pré-montado 2,5x14 mm e liberado na artéria ilíaca por insuflação por 10 segundos à pressão média de 7 ATM, procurando-se obter uma relação balão/artéria de 1,2:1. Nas artérias ilíacas (direita e esquerda) de cada animal foi implantado um tipo de stent sem que o operador soubesse dessa informação.

Foram implantados no total 20 stents (Innovatech Medical Ltda, São Paulo e Scitech® Produtos Médicos, Goiânia, Brasil) sendo quatro stents Cro-Co sem recobrimento, seis stents Cro-Co recobertos com polímero na face luminal e abluminal, três stents Cro-Co recobertos com polímero apenas na face abluminal, quatro stents com eluição de sirolimus na superfície luminal e abluminal e três stents com eluição de sirolimus na face abluminal exclusivamente. Após o implante era retirada a bainha vascular, ligada à artéria carótida e administrada antibioticoterapia profilática com uma solução de gentamicina e benzilpenicilina intramuscular.

O animal era então reconduzido ao biotério e mantido por quatro semanas sob dieta padrão e água *ad libitum*, quando então era submetido a reestudo por dissecação da artéria carotídea esquerda e realização de angiografia de controle.

Eutanásia

A eutanásia foi realizada após a angiografia de controle por *overdose* de anestésico com pentobarbital sódico,

logo após heparinização na dose de 250 UI/kg. Era realizada então laparotomia mediana e exposição da aorta abdominal e da veia cava inferior com infusão via cateter de solução fisiológica 0,9% pela aorta abdominal *in situ* até que pela veia cava inferior seccionada retornasse uma solução clara. A seguir era infundida sob pressão de 100 mmHg por 30 minutos uma solução fixadora de Karnovsky modificada contendo 2,0% de paraformaldeído e 2,5% de glutaraldeído em solução tampão cacodilato de sódio a 0,1 M e pH=7,4⁹.

Microscopia eletrônica de varredura

O segmento da artéria ilíaca contendo o stent era dissecado, removido e submetido a uma bissecção longitudinal, com uma das metades enviada para estudo anatomopatológico e a outra metade encaminhada para processamento específico e posterior análise em microscópio eletrônico de varredura.

O hemissegmento contendo o stent era imerso em solução de Karnovsky modificada por 12 horas a 4 °C, lavado em solução tampão cacodilato de sódio, pós-fixado em solução tamponada de tetróxido de ósmio a 1% e desidratado em séries crescentes de alcoóis até o absoluto. A secagem das amostras foi feita ao ponto crítico no aparelho Balzers CPD 030 e estas eram metalizadas com íons de ouro em aparelho Balzers SCD 040 e analisadas no microscópio eletrônico de varredura modelo JSM 7401S (JEOL, Japão) com a tomada de imagens com aumento de 25 vezes. As imagens obtidas foram arquivadas e submetidas à análise por meio dos softwares Adobe® Photoshop® versão 7.0 (Adobe Systems Inc.) e ImageJ versão 1.42q para Windows (NIH, Bethesda, EUA), sendo mensuradas as áreas de hastes expostas dos stents (mm²) e calculados os percentuais de endotelização (%) para cada tipo de stent.

Análise estatística

Os dados são apresentados como média ± DP ou número (porcentagem). Comparações das médias entre os tipos de stents foram realizadas por meio da análise de variância com um fator (*One-Way ANOVA*). Se o teste de razão das variâncias (teste F) fosse significativa a análise *pos hoc* das diferenças das médias entre os grupos seria realizada por meio do teste de Dunnett. O nível de significância adotado foi de 5% (α). Utilizou-se para análise dos dados o programa estatístico IBM® SPSS® Statistics versão 20.

Resultados

Todos os 10 coelhos sobreviveram inicialmente ao procedimento de implante de stents e nenhum animal evoluiu com qualquer déficit neurológico decorrente da ligadura da artéria carotídea.

Após quatro semanas de implante de stents, nove coelhos/18 stents foram submetidos à angiografia de controle. Um animal (coelho 8), no qual foram implantados dois stents recobertos com polímero apenas

na face abluminal, foi encontrado morto (*causa mortis* não determinada) na 3ª semana pós-implante de stent. Isso resultou em um número amostral insuficiente para análise da endotelização do stent recoberto com polímero apenas na face abluminal, sendo excluídos os dados oriundos do outro stent do mesmo tipo (stent recoberto com polímero apenas na face abluminal) implantado na artéria ilíaca esquerda do coelho 7 (Tabela 1).

Angiografia de controle

Todos os stents estavam pÉrvios e sem reestenose angiográfica ou imagem sugestiva de trombo no momento do reestudo após quatro semanas de implante dos stents.

Microscopia eletrônica de varredura

As áreas analisadas (média ± DP) mediram 17,03 ± 4,82; 15,89 ± 3,90; 17,97 ± 3,25 e 10,40 ± 4,54 referentes ao stent sem recobrimento, stent recoberto com polímero na face luminal e abluminal, stent com eluição de sirolimus na face luminal e abluminal e stent com eluição de sirolimus apenas na face abluminal, respectivamente ($p = 0,219$).

As áreas de hastes de stent expostas (média ± DP) (mm²) foram de 0,12 ± 0,08; 0,09 ± 0,12; 0,60 ± 0,67 e 0,05 ± 0,04 (stent sem recobrimento, stent recoberto com polímero na face luminal e abluminal, stent com eluição de sirolimus na face luminal e abluminal e stent com eluição de sirolimus apenas na face abluminal, respectivamente) ($p = 0,120$).

A porcentagem de endotelização foi de 99%; 99%; 97% e 99% (stent sem recobrimento, stent recoberto com polímero na face luminal e abluminal, stent com eluição de sirolimus na face luminal e abluminal e stent com eluição de sirolimus na face abluminal, respectivamente) ($p = 0,133$) (Tabela 2 e Figura 1).

Discussão

Os resultados deste experimento evidenciaram que os stents com eluição de sirolimus da face luminal e abluminal e abluminal exclusivamente apresentaram após quatro semanas de implante em artérias ilíacas de coelhos não ateroscleróticos uma taxa de endotelização das hastes de stent semelhante à ocorrida em stents sem eluição de drogas.

Vários stents coronarianos eluidores de fármacos antiproliferativos demonstraram efetiva inibição da proliferação neointimal e redução das taxas de reestenose e necessidade de reintervenção no vaso alvo. Uma das preocupações quanto ao emprego desses stents farmacológicos refere-se à probabilidade, ainda que rara, da ocorrência de trombose tardia⁸. A rápida endotelização pós-implante de um stent farmacológico é um fenômeno desejável por teoricamente reduzir o risco de trombose precoce e tardia¹⁰.

A avaliação pré-clínica da reendotelização pós-implante de stent farmacológico realiza-se preferencialmente com o implante desses stents em artérias ilíacas de coelhos por

Tabela 1 – Dados do procedimento de implante dos stents e evolução pós-operatória

Animal	Peso (g)	Local de implante	Tipo de stent implantado	Evolução
1	3767	Art. ilíaca direita	Stent recoberto com polímero na face luminal e abluminal	-
		Art. ilíaca esquerda	Stent eluidor de sirolimus na face luminal e abluminal	
2	3525	Art. ilíaca direita	Stent eluidor de sirolimus na face luminal e abluminal	-
		Art. ilíaca esquerda	Stent Cro-Co sem recobrimento	
3	3187	Art. ilíaca direita	Stent recoberto com polímero na face luminal e abluminal	-
		Art. ilíaca esquerda	Stent eluidor de sirolimus na face luminal e abluminal	
4	3897	Art. ilíaca direita	Stent eluidor de sirolimus na face luminal e abluminal	-
		Art. ilíaca esquerda	Stent Cro-Co sem recobrimento	
5	3445	Art. ilíaca direita	Stent Cro-Co sem recobrimento	-
		Art. ilíaca esquerda	Stent recoberto com polímero na face luminal e abluminal	
6	3410	Art. ilíaca direita	Stent recoberto com polímero na face luminal e abluminal	-
		Art. ilíaca esquerda	Stent Cro-Co sem recobrimento	
7	3224	Art. ilíaca direita	Stent eluidor de sirolimus na face abluminal exclusivamente	-
		Art. ilíaca esquerda	Stent recoberto com polímero na face abluminal	
8	2860	Art. ilíaca direita	Stent recoberto com polímero na face abluminal	Óbito na 3ª semana pós-implante
		Art. ilíaca esquerda	Stent recoberto com polímero na face abluminal	
9	3095	Art. ilíaca direita	Stent recoberto com polímero na face luminal e abluminal	-
		Art. ilíaca esquerda	Stent eluidor de sirolimus na face abluminal exclusivamente	
10	3042	Art. ilíaca direita	Stent eluidor de sirolimus na face abluminal exclusivamente	-
		Art. ilíaca esquerda	Stent recoberto com polímero na face luminal e abluminal	

Tabela 2 – Quantificação da endotelização após implante de stents em artérias ilíacas de coelhos avaliada pela microscopia eletrônica de varredura

	Stent Cro-Co sem recobrimento (n = 4)	Stent Cro-Co com polímero na face luminal e abluminal (n = 6)	Stent eluidor de sirolimus na face luminal e abluminal (n = 4)	Stent eluidor de sirolimus na face abluminal exclusivamente (n = 3)	Valor de p
Área analisada (mm ²)	17,03 ± 4,82	15,89 ± 3,90	17,97 ± 3,25	10,40 ± 4,54	0,219
Área de hastes expostas (mm ²)	0,12 ± 0,08	0,09 ± 0,12	0,60 ± 0,67	0,05 ± 0,04	0,120
Área porcentual de hastes expostas (%)	0,8 ± 0,7	0,5 ± 0	3,0 ± 3,2	0,4 ± 0,3	0,192
Endotelização porcentual (%)	99 ± 01	99 ± 0	97 ± 03	99 ± 0	0,133

apresentar resultados que se aproximam mais com o que se observam em seres humanos¹¹. As artérias coronárias de porcos reendotelizam muito rapidamente após o implante de stents e prestam-se mais para avaliação da segurança do implante. Além disso, atualmente recomenda-se a

realização de estudos pré-clínicos com implante de stents em animais com aterosclerose induzida^{12,13}.

Quando se comparam os dados de endotelização do stent Inspiron® eluidor de sirolimus (Scitech®, Goiânia, Brasil) com os dados experimentais do estudo de Joner e

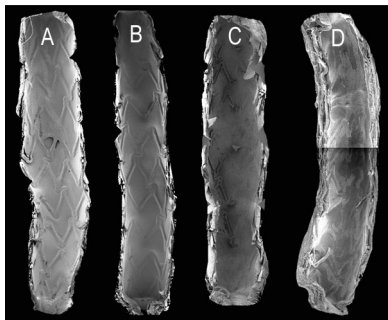


Fig. 1 – Imagens obtidas pela microscopia eletrônica de varredura da face luminal de artérias ilíacas de coelhos após quatro semanas de implante de stents. (A) stent Cro-Co sem recobrimento; (B) stent Cro-Co recoberto com polímero na face luminal e abluminal; (C) stent eluidor de sirolimus na face luminal e abluminal; (D) stent eluidor de sirolimus na face abluminal exclusivamente

cols.¹⁴, no quesito endotelização sobre as hastes dos stents, verifica-se que a taxa de endotelização do stent Inspiron® (99%) foi superior em relação a outros stents farmacológicos (Cypher®: 64%, Taxus®: 68%, Endeavor®: 76% e Xience V®: 80%) para o mesmo período de observação de quatro semanas pós-implante. Essa diferença pode ser decorrente de eluição de sirolimus exclusivamente da superfície abluminal no stent Inspiron®, enquanto nos demais stents os medicamentos antiproliferativos são liberados de ambas as faces do stent. Outro fator que poderia explicar essa diferença é que não realizamos denudação previamente ao implante de stent, minimizando a ocorrência de espasmo arterial, trauma e dissecção arterial. Pudemos analisar dessa forma apenas a endotelização sobre as hastes dos stents, não analisando com essa metodologia a endotelização entre as hastes dos stents. Outra diferença metodológica de nosso estudo em relação ao trabalho de Joner e cols.¹⁴ é que utilizamos como via de acesso a carótida enquanto estes utilizaram a via femoral. A utilização da via femoral com ligadura dessa artéria ao final do implante de stents em artérias ilíacas pode resultar em lentificação do fluxo arterial à montante da ligadura, teoricamente repercutindo em vários aspectos da coagulação e possivelmente da endotelização dos stents, o que nos motivou a utilizarmos a via carotídea¹⁵.

Limitações do estudo

Utilizamos no presente estudo animais não ateroscleróticos. Entretanto, em virtude de especificidades do processo aterosclerótico (multifatorial, doença crônica), esse modelo animal com aterosclerose que reproduza fielmente essa anormalidade em seres humanos ainda não foi desenvolvido.

O período de observação pós-implante de stents em artérias ilíacas de coelhos foi de 30 dias. Observamos desvios-padrões baixos (mínimo de 0 e máximo de 0,03) para as taxas de endotelização sobre as hastes dos stents estudados, assim calculamos, com poder do teste de 80% e admitindo-se um erro beta de 5%, que o número amostral

de cada um dos tipos de stents foi suficiente, à exceção do grupo de stents recobertos com polímero na face abluminal, que foi retirado desta análise comparativa. Entretanto grupos de animais adicionais poderiam ser estudados com períodos de observações menores (sete e/ou 14 dias), os quais não foram objetos desta investigação inicial.

Não foram avaliados no presente estudo os aspectos funcionais da neoíntima que recobriu as hastes dos stents após quatro semanas de implantados.

Conclusão

Após quatro semanas de implante em artérias ilíacas de coelhos os stents farmacológicos com liberação de sirolimus da face luminal e abluminal e abluminal exclusivamente apresentaram endotelização sobre as hastes quase completa (97% a 99%), não diferindo estatisticamente da endotelização ocorrida nos stents não farmacológicos (stents sem recobrimento e stents recobertos com polímero na face luminal e abluminal) (99%).

Agradecimentos

Os autores agradecem à Sra. Adriana Palombo Nunes da Central Analítica do Instituto de Química e ao Sr. Sebastião Aparecido Boleta, do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Anatomia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo pelo auxílio prestado na preparação das amostras e obtenção de imagens de microscopia eletrônica de varredura e às Sras. Andréa R. de Carvalho e Fernanda Giordano pelo trabalho de gestão de projetos em ciência, tecnologia e inovação.

O presente estudo faz parte do Programa de Desenvolvimento Nacional de Endopróteses Vasculares (stents) – PDNS, iniciado em 2004-2005. Conta com o suporte da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos (SCTIE)/Departamento de Ciência e Tecnologia (DECIT) do Ministério da Saúde (MS), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) do Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT). O desenvolvimento do processo de corte a laser de stents contou com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; Forma de Apoio: Inovação Tecnológica – Pesquisa Inovativa na Pequena e Micro Empresa [PIPE]).

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. Nunes G. Modelos de experimentação animal e complicações da angioplastia transluminal coronária. *Arq Bras Cardiol.* 1993;61(4):247–51.
2. Suzuki Y, Yeung AC, Ikeno F. The importance of pre-clinical animal testing in interventional cardiology. *Arq Bras Cardiol.* 2008;91(5):348–60.
3. Abizaid A. Sirolimus-eluting coronary stents: a review. *Vasc Health Risk Manag.* 2007;3(2):191–201.
4. Lemos PA, Laurindo FRM, Morato SP, Takimura C, Campos CA, Gutierrez os, et al. Stent coronário de liga cobalto-cromo concebido no Brasil: achados histológicos preliminares em modelo experimental porcino. *Rev Bras Cardiol Invasiva.* 2007;15(4):378–85.
5. Campos AH, Takimura CK, Gregores GB, Sarmiento CA, Fioretto ET, Laurindo FR, et al. Redução neointimal com stent com polímero biodegradável e sirolimus desenvolvido no Brasil: Resultados preliminares em suínos (abstract). 30 Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo; 2009; São Paulo. *Anais. São Paulo: Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo;* 2009. p.25.
6. Granada JF, Inami S, Aboodi MS, Tellez A, Milewski K, Wallace-Bradley D, et al. Development of a novel prohealing stent designed to deliver sirolimus from a biodegradable abluminal matrix. *Cir Cardiovasc Interv.* 2010;3(3):257–66.
7. Schwartz RS, Edelman E, Virmani R, Carter A, Granada JF, Kaluza GL, et al. Drug-Eluting Stents in Preclinical Studies. Updated Consensus Recommendations for Preclinical Evaluation. *Circ Cardiovasc Intervent.* 2008;1(2):143–53.
8. Guidance for Industry: Coronary Drug-Eluting Stents – Nonclinical and Clinical Studies. Companion Document. Draft Guidance. Washington DC: U.S. Department of Health and Human Services; 2008.
9. Watanabe, I.; Yamada E. The fine structure of lamellated nerve endings found in the rat gingiva. *Arch Histol JPN.* 1983;46(2):173–82.
10. Buja ML. Vascular responses to percutaneous coronary intervention with bare-metal stents and drug-eluting stents. *J Am Coll Cardiol.* 2011;57(11):1323–6.
11. Finn AV, Nakazawa G, Joner M, Kolodgie FD, Mont EK, Gold HK, et al. Vascular Responses to Drug Eluting Stents. Importance of Delayed Healing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(7):1500–10.
12. Nakazawa G, Nakano M, Otsuka F, Wilcox JN, Melder R, Pruitt S, et al. Evaluation of Polymer-Based Comparator Drug-Eluting Stents Using a Rabbit Model of Iliac Artery Atherosclerosis. *Circ Cardiovasc Interv.* 2011;4(1):38–46.
13. Drachman DE. Drug-Eluting Stents in Animals and Patients: Where Do We Stand Today? *Circulation.* 2009;120:101–3.
14. Joner M, Nakazawa G, Finn AV, Quee SC, Coleman L, Acampado E, et al. Endothelial cell recovery between comparator polymer-based drug-eluting stents. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52(5):333–42.
15. La Disa JF Jr, Meier HT, Olson LE, Kersten JR, Warltier DC, Pagel PS. Antegrade iliac artery stent implantation for the temporal and spatial examination of stent-induced neointimal hyperplasia and alterations in regional fluid dynamics. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2005;51(2):115–21.