

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

CYRO CASTRO JÚNIOR

**ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS SECUNDÁRIAS À INTERRUÇÃO
DOS *VASA VASORUM* NA AORTA DESCENDENTE COM O USO DE
TERAPIA ANTIANGIOTÉTICA: RESULTADOS EM MODELO SUÍNO**

Orientador: Prof. Dr. Adamastor Humberto Pereira

Tese de Doutorado

**Porto Alegre
2016**

CYRO CASTRO JÚNIOR

**ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS SECUNDÁRIAS À INTERRUÇÃO
DOS *VASA VASORUM* NA AORTA DESCENDENTE COM O USO DE
TERAPIA ANTIANGIOGÊNICA: RESULTADOS EM MODELO SUÍNO**

Tese para obtenção do título de Doutor em Medicina.
Faculdade de Medicina da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em
Medicina - Ciências Cirúrgicas.

Orientador: Prof. Dr. Adamastor Humberto Pereira

Porto Alegre

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Castro Júnior, Cyro

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS SECUNDÁRIAS À INTERRUPTÃO
DOS VASA VASORUM NA AORTA DESCENDENTE COM O USO DE
TERAPIA ANTIANGIOGÊNICA: RESULTADOS EM MODELO SUÍNO
/ Cyro Castro Júnior. -- 2016.

91 f.

Orientador: Adamastor Humberto Pereira.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2016.

1. vasa vasorum. 2. neovascularização patológica.
3. inibidores da angiogênese. I. Pereira, Adamastor
Humberto, orient. II. Título.

CYRO CASTRO JÚNIOR

**ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS SECUNDÁRIAS À INTERRUPÇÃO
DOS *VASA VASORUM* NA AORTA DESCENDENTE COM O USO DE
TERAPIA ANTIANGIOGÊNICA: RESULTADOS EM MODELO SUÍNO**

Orientador - Presidente da Banca: Prof. Dr. Adamastor Humberto Pereira

Tese para obtenção do título de Doutor em Medicina.
Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Medicina - Ciências Cirúrgicas.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Nilon Erling Júnior (UFCSPA)

.....

Prof. Dr. Orlando Carlos Belmonte Wender (UFRGS)

.....

Dr. Marco Aurélio Grüdtner (UFRGS)

.....

Aprovação: Porto Alegre, 06 de abril de 2016.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Adamastor Humberto Pereira, pela orientação, confiança, segurança e exemplo dispensados na minha formação profissional.

Aos meus pais, Cyro Castro e Hedy Rosa Castro, fontes de inspiração, pelo apoio sempre decisivo em todos os projetos e conquistas da minha vida.

À toda a minha família, por confiar em mim e conceder suporte, sempre que necessário.

Ao meu amigo e padrinho, Dr. Acir Júlio Mangoni, por tudo que me ensinou e pelo auxílio indispensável para a conclusão desse trabalho.

Ao Dr. Mário Bernardes Wagner, MD PhD DLSHTM, pela excelência profissional na análise dessa tese.

Aos professores da Faculdade de Medicina da UFRGS e do Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas pelo apoio e ensinamento.

Aos profissionais do Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas, do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA, da Unidade de Cirurgia Experimental do HCPA, da Unidade de Patologia Experimental do HCPA os quais trabalham de forma exemplar.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelos mais de 120 anos de atuação no ensino, desde a fundação da Escola de Farmácia e Química (1895).

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sul-Riograndense e a seus servidores pelo incentivo ao crescimento científico e suporte disponibilizado.

A todos que, de alguma forma, colaboraram para a realização desta tese.

Dedico este trabalho à minha esposa Flávia e aos meus filhos Vítor e Diego que me acompanham, apoiam, compreendem e confortam, em todos os momentos da minha vida.

RESUMO

JÚNIOR CASTRO, C. Alterações histológicas secundárias à interrupção dos *vasa vasorum* na aorta descendente com o uso de terapia antiangiogênica: resultados em modelo suíno / Cyro Castro Júnior; orientador Prof. Dr. Adamastor Humberto Pereira - Porto Alegre, 2016.

OBJETIVO: demonstrar as alterações histológicas secundárias ao uso de bevacizumabe na aorta descendente de suínos submetida à interrupção dos *vasa vasorum*.

MATERIAIS E MÉTODOS: em doze suínos, divididos em grupos tratamento e controle (n=6 cada) foi realizada dissecação por 5 cm da aorta torácica, ligadura das artérias intercostais e cobertura com polivinil; o grupo tratamento recebeu uma dose endovenosa única de bevacizumabe. Após quinze dias, os animais foram sacrificados para retirada da artéria e preparo das lâminas histológicas dos grupos tratamento, controle e área não manipulada dos dois grupos. As lâminas foram analisadas com relação aos graus de angiogênese, injúria, inflamação e espessamento intimal. A análise estatística foi conduzida através da média e do desvio-padrão dos escores e as comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste de Mann-Whitney. Para obtenção de intervalos de confiança de 95% para as médias das contagens dos escores utilizou-se a distribuição de Poisson, a fim de determinar o efeito estatístico.

RESULTADOS: o bevacizumabe causou parefeitos em todos os suínos tratados, com um óbito. As variáveis analisadas através da Escala de Magnitude para Efeito Estatístico, demonstram tendência de redução da angiogênese e da injúria e de aumento da inflamação no limite do moderado. Não ocorreu modificação do espessamento intimal entre os grupos.

CONCLUSÃO: a medicação utilizada na lesão da parede arterial induzindo hipóxia, mostrou tendência de redução da angiogênese e da injúria, mas não reduziu o processo inflamatório ou o espessamento intimal da parede arterial. O bevacizumabe mostrou toxicidade no modelo suíno.

PALAVRAS-CHAVE: Vasa vasorum. Neovascularização patológica. Inibidores da angiogênese.

ABSTRACT

JÚNIOR CASTRO, C. Histological changes secondary to interruption of vasa vasorum flow in the descending aorta with the use of anti-angiogenic therapy: results in a porcine model / Cyro Castro Júnior; advisor Prof. Dr. Adamastor Humberto Pereira - Porto Alegre, 2016.

OBJECTIVE: To demonstrate histological changes secondary to the use of bevacizumab in the descending aorta of pigs after interruption of vasa vasorum flow.

METHODS: Twelve pigs were divided into control and treatment groups (n = 6 each). It was performed a 5-cm dissection of the thoracic aorta, ligation of the intercostal arteries and protection with polyvinyl chloride. Pigs in the treatment group received a single intravenous dose of bevacizumab. After 15 days, the animals were euthanized and the aorta removed. Histological slides were prepared for control and treatment groups and for the non-surgically manipulated part of the aorta in both groups. The slides were analyzed for the degree of angiogenesis, injury, inflammation, and intimal thickening. Data were expressed as mean (SD) of scores and groups were compared using the Mann-Whitney test. The Poisson distribution was used to calculate 95% confidence intervals for the mean scores in order to determine effect statistics.

RESULTS: Bevacizumab had adverse effects on all treated pigs, leading to one death. The analysis using a scale of magnitudes for effect statistics showed a trend toward a decrease in angiogenesis and injury and an increase in inflammation for moderate effects. There was no change in intimal thickening in either group.

CONCLUSION: The medication used for arterial wall injury inducing hypoxia showed a trend toward reduced angiogenesis and injury, but with no reduction in the inflammatory process or intimal thickening of the arterial wall. Bevacizumab showed toxicity in the porcine model.

KEYWORDS: Vasa Vasorum. Neovascularization, Pathologic. Angiogenesis Inhibitors

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquematisação dos <i>vasa vasorum</i> e modalidades que se encontram na túnica adventícia	18
Figura 2 - Diagrama que ilustra moléculas importantes à angiogênese e potenciais alvos terapêuticos	28
Figuras 3 e 4 - Suíno da raça mista Large White x Landrance. Baia para alojamento dos suínos no pós-operatório, no Centro de Pesquisa Experimental do HCPA - UFRGS.....	83
Figuras 5, 6 e 7 - Sala de cirurgia do Bloco Cirúrgico Experimental do HCPA - UFRGS. Equipamento de anestesia e monitorização	83
Figuras 8 e 9 - Indução anestésica e venóclise veia marginal da orelha	83
Figuras 10 e 11 - Intubação oro-traqueal, monitorização pressórica e sondagem naso-gástrica.....	84
Figuras 12 e 13 - Tricotomia, assepsia e antissepsia com álcool iodado	84
Figuras 14 e 15 - Mesa, material cirúrgico e colocação de campos estéreis	84
Figuras 16 e 17 - Toracotomia lateral esquerda em 6º EIC, abertura por planos, desinsuflação do pulmão esquerdo e visualização da aorta torácica.....	84
Figuras 18 e 19 - Dissecção, domínio da aorta torácica descendente, ligadura dos ramos intercostais, proteção da área dissecada com polivinil.....	85
Figuras 20 e 21 - Aspecto final da cirurgia e bloqueio anestésico intercostal para analgesia.....	85
Figuras 22 e 23 - Drenagem do tórax, fechamento por planos e sutura cutânea.....	85

Figuras 24 e 25 - Preparo para a 2ª fase, toracotomia abaixo da incisão prévia, abertura por planos, liberação de aderências evidenciando a área dissecada da aorta torácica descendente	86
Figuras 26 e 27 - Dissecção da aorta torácica descendente até o diafragma (áreas manipulada e não manipulada pela cirurgia prévia). Clampeamento, ressecção da peça em estudo, eutanásia	86
Figuras 28 e 29 - Preparo, limpeza e conservação da peça cirúrgica em solução de formol	86
Figuras 30, 31 e 32 - Fotomicrografia da aorta (parcial), não submetida à manipulação cirúrgica. Coloração de HE, Weigert e Masson (respectivamente). Magnificação original 8x.....	87
Figuras 33, 34 e 35 - Fotomicrografia da aorta (parcial), submetida à manipulação cirúrgica no grupo controle. Coloração de HE, Weigert e Masson (respectivamente). Magnificação original 8x.....	87
Figuras 36, 37 e 38 - Fotomicrografia da aorta (parcial), submetida à manipulação cirúrgica no grupo tratamento. Coloração de HE, Weigert e Masson (respectivamente). Magnificação original 8x	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média e desvio padrão da contagem dos escores88

Tabela 2 – Distribuição de Poisson - média, desvio padrão e intervalo de confiança .
.....88

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Graduação das alterações histológicas relativas à angiogênese	89
Gráfico 2 - Graduação das alterações histológicas relativas à injúria	89
Gráfico 3 - Graduação das alterações histológicas relativas à inflamação	90
Gráfico 4 - Graduação das alterações histológicas relativas ao espessamento intimal	90
Gráfico 5 – Escala de magnitude para efeito estatístico (ES)	91

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	HISTÓRICO.....	15
2.2	PAREDE VASCULAR.....	16
2.3	VASA VASORUM.....	18
2.4	FUNÇÕES.....	20
2.5	ALTERAÇÕES.....	23
2.6	PERSPECTIVAS.....	26
2.7	LEGISLAÇÃO E ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.....	31
2.8	MODELO EM ANIMAL DE DOENÇAS DA ESPÉCIE HUMANA.....	35
2.9	MODELO DE LESÃO AÓRTICA.....	36
2.10	BEVACIZUMABE.....	38
3	HIPÓTESE	40
4	OBJETIVO	41
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
5	ARTIGO EM LÍNGUA PORTUGUESA	48
	RESUMO.....	48
	INTRODUÇÃO.....	49
	MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
	RESULTADOS.....	53
	DISCUSSÃO.....	56
	CONCLUSÃO.....	61
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
6	ARTIGO EM LÍNGUA INGLESA	66
	ABSTRACT.....	66
	INTRODUCTION.....	67
	MATERIAL AND METHODS.....	68
	RESULTS.....	71
	DISCUSSION.....	74
	CONCLUSION.....	79
	REFERENCES.....	80

ANEXOS	83
FIGURAS.....	83
TABELAS.....	88
GRÁFICOS.....	89

1 INTRODUÇÃO

A importância da angiogênese na progressão da placa aterosclerótica é bem conhecida e a sua fisiopatologia inclui a possibilidade do espessamento da parede vascular além do limite da difusão dos nutrientes, a condução de células inflamatórias e lipoproteínas para a lesão aterosclerótica e a contribuição para a instabilidade e a ruptura das placas.

A proliferação dos *vasa vasorum* (VV) foi identificada em lesões arteriais em desenvolvimento e invade a camada íntima em locais de ruptura da média, podendo formar uma massa de microvasos tipo tumoral, propensa à ruptura, como encontrado em regiões de lesões complexas da aorta humana, como a dissecação clássica, o hematoma intramural e a úlcera penetrante.

A ligadura dos ramos intercostais, que dão origem aos VV adventiciais da aorta, promove hipóxia da parede arterial, desencadeando o processo de angiogênese na tentativa de promover a nutrição adequada, porém carreando também células inflamatórias em direção à camada íntima arterial.

Os VV e a angiogênese têm papel chave no crescimento da placa e no remodelamento arterial aterosclerótico e evitar esse processo pode induzir regressão das lesões. Os agentes antiangiogênicos demonstraram reduzir a proliferação neovascular e o desenvolvimento da placa em modelos animais. O impacto da supressão da angiogênese sugere que a redução da proliferação dos VV pode estabilizar ou reverter a progressão da doença. O desenvolvimento de agentes reguladores da angiogênese pode ter implicações terapêuticas na progressão ou nas manifestações agudas da doença aterosclerótica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

A aterosclerose é uma doença crônica das médias e grandes artérias e é a causa mais frequente de doença arterial coronária, periférica e de carótida¹.

A existência da aterosclerose é conhecida há mais de 500 anos. A interpretação como uma condição patológica é descrita há cerca de 150 anos, porém o entendimento da doença vascular aterosclerótica aumentou nos últimos 25 anos com o crescimento do conhecimento da biologia vascular².

Os fatores de risco reconhecidos para a aterosclerose são tabagismo, diabetes melito (DM), dislipidemia e hipertensão arterial sistêmica (HAS). Além disso, a aterosclerose envolve muitos processos inter-relacionados, incluindo distúrbios lipídicos, ativação plaquetária, trombose, disfunção endotelial, inflamação, estresse oxidativo, migração de células musculares lisas, alteração metabólica, remodelamento e fatores genéticos².

A vascularização da placa arterial tem sido implicada no seu crescimento e estabilidade, porém faltam informações sobre a origem dessa vascularização. O suprimento de nutrientes da parede da aorta normal é dado por difusão do lúmen ou pelos vasos adventíciais, uma rede de pequenos vasos que penetra a camada média chamada *vasa vasorum* (VV). Os VV correm na camada adventícia arterial e suprem oxigênio e outros nutrientes para a porção externa da camada média arterial. A porção interna é suprida pela difusão da luz arterial^{1, 3, 4, 5}.

Histórico estudo de Woodruff (1926)⁶, descreveu a demonstração dos VV pela injeção de tinta da índia na luz arterial da aorta de cavalos e de cachorros ou pela canulização direta evidenciando a penetração dos VV através da camada média e íntima, terminando abruptamente. Esse estudo demonstrou, também, que os VV se originam mais frequentemente dos ramos da aorta, a poucos milímetros da origem desses e retornando para penetrar na superfície dos vasos maiores. O estudo tridimensional desses vasos foi possível graças ao advento da microtomografia computadorizada, assim como a sua anatomia e distribuição foram melhor entendidas pela microarteriografia através da injeção de polímero de silicone^{7, 8, 9, 10}.

2.2 PAREDE VASCULAR

Do ponto de vista embriológico, uma estrutura tubular é a origem tanto de átrios e ventrículos, como de grandes vasos que, posteriormente, constituirão a parte central do aparelho circulatório. Paralelo a esse desenvolvimento embrionário, originam-se as artérias coronárias, com função de irrigação e nutrição do coração, formadas por músculos, elastina e colágeno. O correlato das artérias coronárias nos vasos sanguíneos seria o conjunto dos VV, que irrigam toda a artéria com mais de 29 camadas celulares de espessura¹¹.

Os vasos sanguíneos são compostos por três estruturas básicas: o endotélio, o músculo liso e o tecido conjuntivo, incluindo elementos elásticos. Estes componentes dispõem-se em camadas concêntricas (ou túnicas), sendo a quantidade relativa e a configuração dos componentes estruturais básicos variáveis em todo o sistema circulatório. Em alguns pontos, adaptações locais às necessidades mecânicas ou metabólicas podem exigir acréscimo, reforço, diminuição ou omissão de alguns componentes. As artérias são divididas em três tipos, com base em seu tamanho e em seus aspectos histológicos: artérias elásticas, como a aorta e seus ramos; artérias musculares, como as coronárias e renais; artérias pequenas que passam, em sua maioria, dentro da substância dos tecidos e do parênquima dos órgãos¹².

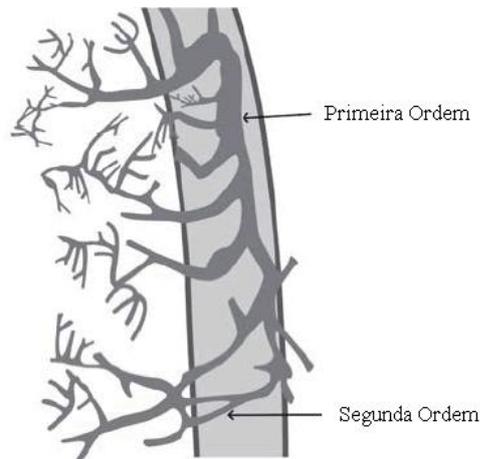
A parede arterial é composta por três camadas: a íntima, a média e a adventícia, com arquitetura particular ligada à sua função. A camada íntima é composta pelo endotélio e pelo subendotélio que é dividido em duas camadas: uma imediatamente situada sob as células endoteliais, chamada de camada de proteoglicanas e outra, mais grossa, chamada de camada músculo-elástica, composta por células lisas, fibras elásticas e colágeno. O tecido elástico é constituído por microfibrilas e elastina, sintetizadas por células endoteliais e células musculares lisas. Laminina, trombospodina, fibronectina e fator de von Willebrand, sintetizados por células endoteliais, musculares lisas, fibroblastos e plaquetas, também compõem a estrutura do subendotélio. A camada íntima está separada da média pela lâmina elástica interna (LEI), que é interrompida por fenestrações através das quais as células do músculo liso podem migrar da camada média para a íntima. Nas arteríolas, nos capilares, nas vênulas e nas pequenas veias intermediárias, uma membrana basal está regularmente presente. A camada média é proeminente na

parede de artérias elásticas e é composta por uma ou duas camadas de células musculares lisas, além de estar separada da camada adventícia pela lâmina elástica externa (LEE). A adventícia é formada por uma camada de tecido conjuntivo fibroso, mais externo ao vaso, com espessura variável, podendo ser quase nula, como nas artérias cerebrais ou constituir 60% a 75% da parede vascular, como nas veias de médio e grosso calibre. A sua estrutura contém fibroblastos, fibras colágenas, os vasos linfáticos, os nervos e os VV, com funções mecânica, de controle e nutricional^{11, 12, 13, 14, 15}.

A função mecânica da túnica adventícia deriva da sua arquitetura e constituição, resistindo a deformações quando é submetida a pressões internas altas, respeitando a Lei de Laplace e reduzindo os efeitos da pulsatilidade sobre tecidos vizinhos. A adventícia também exerce controle vascular através dos *nervi vasorum* e fatores liberados por alguns de seus componentes (noradrenalina, acetilcolina, substância P, calcitonina, óxido nítrico). A função nutricional, regulada através dos VV, tem um delicado sistema de controle que regula a sua atividade através de estímulos simpáticos e barorreceptores. A sua importância não deve ser subestimada, uma vez que estudos experimentais que descreveram ligaduras de artérias intercostais, fonte dos VV da parede aórtica, foram capazes de produzir necrose da túnica média^{5, 11, 16}.

A parede vascular pode ser classificada por sua histologia em uma zona avascular, mais interna, nutrida por embebição pela luz do vaso e uma zona vascular mais externa, a partir da camada celular número 29, que contém os VV. Os VV são constituídos por artérias, veias e linfáticos de minúsculo calibre e, no caso das artérias, podem ser de primeira ordem, correndo longitudinalmente ao vaso, ou de segunda ordem, correndo de forma circunferencial (figura 1)^{5, 11}.

Figura 1 - Esquemática dos *vasa vasorum* e modalidades que se encontram na túnica adventícia.



Fonte¹¹.

2.3 VASA VASORUM

Os VV consistem de um emaranhado de pequenas artérias e veias que penetram a parede arterial pela superfície adventicial e ramificam na camada média. Eles funcionam como circulação terminal por causa da pressão da parede arterial que pode comprimi-los (Lei de Lamé). Como consequência, no local da parede em que a pressão tecidual excede a pressão dos VV, que é determinada, principalmente, pela queda da pressão ao longo dos vasos (Lei de Poiseuille), nenhuma perfusão da parede pode ocorrer perto da luz arterial^{7,17,18}. Em artérias normais, os vasos adventiciais originados dos VV penetram a parede arterial em intervalos regulares e bifurcam na circunferência da artéria. Eles não ultrapassam a parte externa da camada média. A proliferação dos VV foi identificada em lesões arteriais em desenvolvimento e invade a camada íntima em locais específicos de ruptura da média, formando uma massa de microvasos tipo tumoral, propensa à ruptura, como já foi identificado em regiões de lesões complexas da aorta humana, como a dissecação clássica, o hematoma intramural e a úlcera penetrante^{7,19,20}.

Quando o espessamento da aorta torácica aumenta, a nutrição é suplementada pela penetração dos VV na camada média arterial. Os VV estão presentes na maioria das artérias. Nas coronárias, os VV originam-se das

bifurcações dos vasos epicárdicos; na aorta ascendente originam-se das coronárias e artérias braquiocefálicas; no arco aórtico, dos grandes vasos cervicais e seus ramos; na aorta descendente originam-se das artérias intercostais, lombares e mesentéricas^{3, 17, 21}. Os VV venosos (VVV) são mais abundantes e também drenam, preferencialmente, as porções mais externas da túnica média. Em humanos, as artérias que apresentam menos de 29 camadas de células ou menos de 0,5 mm de diâmetro não apresentam VV^{2, 5, 7, 16}.

Os VVV drenam a parede arterial em veias que acompanham paralelamente os VV arteriais (VVA) ou drenam para ramos das veias principais, onde penetram a cada 5 a 15 milímetros (mm). Existem diferenças quantitativas distintas entre os VVV e os VVA. Os VVA são em número menor e com diâmetros entre 11,6 a 36,6 micrômetros (μm), enquanto os VVV, encontrados em maior número, variam de 11,1 a 200,3 μm . Modelos anatômicos à microscopia eletrônica mostram que os VVV mudam de curso em ângulos agudos e formam *kinks* e constrições. Essa distribuição espacial permite que os VVV suportem a distensão ou o alongamento da parede arterial, devido ao aumento da pressão, sem maiores efeitos sobre a sua função²².

Os VV são mais abundantes na aorta ascendente e no arco aórtico, justamente os segmentos mais suscetíveis à dissecação aórtica. Entretanto o seu papel na patogênese da doença não está bem estabelecido²³.

O processo de aterosclerose é frequentemente iniciado antes da idade adulta pelo acúmulo de LDL na camada íntima arterial e ativação endotelial, com adesão leucocitária, diferenciação de monócitos em macrófagos e formação de células *foam*. A inflamação adventicial, a proliferação e a infiltração intimal dos VV estão ligadas às lesões avançadas e correlacionam-se com a neovascularização e progressão da placa, sugerindo que enquanto neovasos são gerados, a resposta inflamatória continua²⁰.

Os VV contribuem para a aterosclerose e estão implicados na formação da placa arterial, com a sua proliferação, através da angiogênese, visível à histologia do vaso. Se isso contribui ou é uma resposta ao crescimento da placa ainda é incerto, porém algumas evidências sugerem que os VV possam estar envolvidos na gênese de aneurismas e dissecações².

2.4 FUNÇÕES

A estrutura anatômica dos VV caracteriza-se pela presença de células endoteliais, células musculares lisas e cobertura externa de tecido conectivo, o que indica que pode haver autorregulação do seu tônus e da perfusão da parede arterial, semelhante às pequenas artérias coronárias^{7, 20, 24}.

Na artéria sadia, os VV nutrem o componente externo da parede arterial, enquanto a camada íntima é nutrida por difusão do oxigênio pelo lúmen. Com a progressão da doença aterosclerótica, aumenta a espessura da camada íntima dificultando a difusão do oxigênio. Como resultado, os VV tornam-se a principal fonte de nutrição da parede do vaso^{17, 20}. Quando o espessamento da parede vascular excede a distância de difusão efetiva do oxigênio, proliferam os VV para as camadas mais internas da parede arterial²¹.

A angiogênese é a formação de novos vasos a partir de uma rede vascular pré-existente e é um fenômeno importante na fisiologia do desenvolvimento embrionário, cicatrização de feridas e em condições patológicas, como a retinopatia diabética, artrite reumatoide, progressão de tumores e aterosclerose²⁰.

A angiogênese pode ter um importante papel no desenvolvimento da aterosclerose. A proliferação dos VV e a infiltração na camada média provêm nutrientes para o desenvolvimento e expansão da camada íntima e, conseqüentemente, podem prevenir morte celular e contribuir para o crescimento e estabilização da placa em lesões iniciais. Entretanto, as reações inflamatórias envolvidas apresentam, também, um papel na desestabilização da placa aterosclerótica, convertendo um processo crônico numa desordem aguda. Em placas mais avançadas, a infiltração de células inflamatórias e a produção concomitante de numerosas citocinas pró-angiogênicas podem ser responsáveis pela indução da proliferação neo-intimal descontrolada, resultando na formação de neovasos imaturos e frágeis, como os vistos no desenvolvimento dos tumores. Isso pode contribuir para o desenvolvimento de lesões instáveis, com hemorragia e passíveis de ruptura nas placas. Evidências sugerem que neovasos intimaes estão relacionados ao estágio de desenvolvimento da placa, risco de ruptura e presença de doença sintomática^{20, 25}.

A adventícia e as camadas externas de uma parede arterial propensa à aterosclerose são vascularizadas por VV. Esses permanecem em estado dormente,

provavelmente pela expressão da síntese de fatores antiangiogênicos, como o trombospondin e o endostatin, os quais contrabalançam a presença de baixas quantidades de fatores pró-angiogênicos. Entretanto, durante o desenvolvimento da placa intimal, o balanço entre os fatores angiogênicos e antiangiogênicos altera-se com o aumento da produção de fatores de crescimento e citocinas, junto com a redução dos moduladores negativos, resultando na angiogênese de vasos adventíciais no local da lesão arterial^{20, 26}.

Após o crescimento de uma lesão aterosclerótica na camada íntima arterial, brotos neovasculares originários dos VV adventíciais entram no local da lesão, como reação à hipóxia, por aumento do estresse oxidante intramural e por infiltração de células inflamatórias (macrófagos, células T e mastócitos). Os indutores angiogênicos presentes na lesão incluem vários fatores de crescimento, quimiocinas, citocinas, proteinases e vários outros fatores que possuem atividades diretas ou indiretas na angiogênese, enquanto a lista de fatores antiangiogênicos é menor. Um desequilíbrio entre os indutores endógenos e os inibidores da angiogênese, com predomínio dos primeiros, é essencial para o desenvolvimento de neovasos durante a progressão da lesão. Por fornecer oxigênio e nutrientes para as células de lesões ateroscleróticas, a neovascularização, inicialmente, tende a prevenir a morte celular e assim contribui para o crescimento e a estabilização das placas. No entanto, as células inflamatórias podem induzir à ruptura dos neovasos frágeis, e assim causar hemorragia intraplaca e consequente desestabilização da placa. A inibição farmacológica da angiogênese em placas ateroscleróticas, com a consequente inibição da progressão da lesão, foi alcançada em modelos animais. Porém, os estudos clínicos com o objetivo de regulação da angiogênese na parede arterial aterosclerótica, podem ser concebidos apenas depois de se ter chegado a uma conclusão sobre o papel da angiogênese nos vários estágios de desenvolvimento da lesão vascular^{5, 20, 26}.

O papel dos VV no desenvolvimento de doenças ateroscleróticas, seja como causador ou como uma reação a essa, ainda não está claro. A constatação de que a maior concentração das placas de ateroma nos vários segmentos arteriais é anatomicamente coincidente com a menor perfusão pelos VV pode representar uma evidência direta do papel desses vasos no processo da doença aterosclerótica. Entretanto, mesmo que a sua proliferação seja apenas reacional, esses novos vasos

podem ser fonte para a progressão da doença arterial, como caminho para a migração de monócitos para os locais de lesão endotelial inicial^{2, 5, 7, 18, 12}.

A neovascularização patológica da parede vascular é uma característica do desenvolvimento e da progressão da placa aterosclerótica e, além disso, os microvasos estão implicados na hemorragia intraplaca, na ruptura da placa e no desenvolvimento de doença sintomática. A densidade dos microvasos está aumentada nas placas com ruptura, em comparação com as sem ruptura, na aorta humana. Os microvasos facilitam a penetração de células inflamatórias através da parede vascular aumentando a infiltração de macrófagos. Além disso, a inflamação também aumenta a atividade angiogênica, aumentando o recrutamento de macrófagos, mostrando uma associação sinérgica em doença avançada²¹.

Estudos *post-mortem* confirmam que a hemorragia intraplaca e a ruptura são proporcionais ao aumento na densidade neovascular. A densidade vascular é o dobro em placas vulneráveis e quatro vezes em ruptura de placa, comparada com lesões estáveis severamente obstrutivas. No intuito de verificar esse princípio, foi desenvolvido um modelo animal simulando hemorragia intraplaca para avaliar o papel das células vermelhas sanguíneas, aliadas ao colesterol na progressão da lesão. A injeção direta de hemácias em placas quiescentes ateroscleróticas da aorta produziu excessiva infiltração de macrófagos repletos de hemossiderina junto com cristais livres de colesterol. Lipídios neutros também foram significativamente maiores em placas com a injeção. Em contraste, as lesões controle mostraram as características de uma lesão regredida com muito menos macrófagos lesionais e sem colesterol livre²⁷.

Baseado no princípio de que os espaços de hemácias são os maiores determinantes da vulnerabilidade da placa, a inibição da angiogênese pode constituir um valioso tratamento para a estabilização da placa. Embora a maior parte da pesquisa em angiogênese esteja ligada à biologia do câncer, evidências sugerem que moléculas semelhantes estão envolvidas em desordens não neoplásicas, incluindo doenças inflamatórias crônicas e oftálmicas. Conceitualmente, a abordagem da neo-angiogênese é viável para a eliminação de microvasos pré-existentes ou o seu crescimento, pois a remoção seletiva dos estímulos angiogênicos já mostrou que causa a regressão dos vasos, como demonstrado em tumores e no coração, principalmente quando os vasos são recentes e imaturos²⁷.

O crescimento da placa é um processo pouco entendido. Estudos prévios sugerem que a inibição da vascularização da placa pode reduzir a sua progressão, mas a relação entre a vascularização da placa e da parede arterial permanece indefinida. Vários estudos sugerem que o aumento dos VV de “segunda ordem” esteja associado ao aumento do tamanho das lesões ateroscleróticas em humanos e em modelos experimentais. A primeira função desses vasos é o transporte de nutrientes para a parede vascular. O aumento da densidade desses microvasos na adventícia e na placa de artérias em humanos está associado à instabilidade da placa, hemorragia e ruptura, enfim, todos os eventos graves que acompanham a aterosclerose. A literatura cita que produtos com propriedades antiangiogênicas podem reduzir os VV e o crescimento da placa¹.

2.5 ALTERAÇÕES

A aterosclerose é uma doença progressiva das artérias, que inicia muitos anos antes da manifestação clínica, pela proliferação ou migração de células musculares lisas e formação de células *foam* entre a camada endotelial e a lâmina elástica interna, sendo essa a causa primária da doença vascular oclusiva, incluindo aterosclerose, restenose após intervenção percutânea e estenose de *by-pass*. A angiogênese está implicada na progressão das lesões ateromatosas iniciais em modelos animais, porém o seu papel na proliferação das células musculares lisas não está bem definido. A lesão inicial nesse processo é desconhecida em humanos e atribuída, ao longo dos séculos, por mudanças na luz vascular. Um novo modelo de aterosclerose descreve a hiperplasia das células musculares lisas e a formação de células *foam* sem alteração endotelial, através da oclusão dos VV adventíciais e possível isquemia da porção externa da camada média, forçando a migração dessas células para a superfície interna. A hipóxia estimula a proliferação de células musculares lisas e atração leucocitária, podendo iniciar a hiperplasia intimal. Com base nisso, uma nova hipótese sugere que a hipóxia da parede arterial, secundária à oclusão dos VV adventíciais, pode ser a lesão inicial na aterosclerose^{4, 28}.

Os VV são considerados a maior fonte de nutrientes para a parede vascular. A ateromatose é associada com neovascularização, pois uma densa rede de VV desenvolve-se na parede arterial ateromatosa. Além disso, uma grande quantidade de VV em placas ateroscleróticas instáveis promove a vulnerabilidade da placa. A

partir de estudos científicos, já foi demonstrado o efeito da remoção dos VV em artérias animais. A ligadura das artérias intercostais, que dão origem aos VV aórticos produz necrose da camada média como visto em estudos experimentais^{5,11,12}. A necrose da camada média e a infiltração de células musculares lisas ocorrem mesmo em endotélio intacto, sugerindo o papel dos VV adventíciais nas fases iniciais da doença aterosclerótica^{29, 30}.

Os efeitos da remoção dos VV foram analisados em diversos estudos experimentais com modelos animais. Estudos prévios demonstraram edema da parede da aorta ascendente trinta minutos após a remoção dos VV. A interrupção do fluxo dos VV causou uma diminuição da distensibilidade da aorta ascendente, tanto na fase aguda, como quinze dias após o procedimento em animais de experimentação. Outras alterações estruturais da parede aórtica e posterior deterioração das propriedades elásticas da aorta também ocorreram após a remoção dos VV. A necrose da camada média e a infiltração de macrófagos e células musculares lisas ocorreram em um período de sete dias, mesmo com o endotélio intacto, sugerindo um papel dos VV da adventícia na fase inicial da doença aterosclerótica. A necrose das células musculares lisas e as alterações nas fibras elásticas ocorreram na camada média da aorta ascendente, quinze dias após a remoção dos VV, por isquemia sustentada da parede. A neoformação vascular na parede representada pela angiogênese ocorre desde a segunda semana e aumenta, progressivamente, até a oitava semana^{11,12}. A alteração na relação colágeno-elastina determina o aumento na rigidez da parede aórtica. Esses achados lembram aqueles encontrados no envelhecimento da aorta, especulando-se que esse pode também estar relacionado à falta de nutrição da parede arterial. Levanta-se a hipótese de que os VV têm importante papel na degeneração da camada média em humanos, alteração responsável pelo desenvolvimento de dissecções arteriais^{3, 17}.

Alterações nos VV podem ocorrer em várias condições clínicas, como crises hipertensivas, choque, insuficiência cardíaca congestiva, pós-operatório de cirurgia cardíaca, vasoconstrição ou vasodilatação por regulação neuro-hormonal ou farmacológica. A redução da vascularização da aorta torácica altera a morfologia das fibras de elastina e colágeno da camada média, resultando em aumento da rigidez da parede aórtica. Do ponto de vista clínico, a HAS reduz a distensibilidade da parede aórtica por provável redução do fluxo nos VV. Uma vez que a lesão muscular da parede arterial aumenta com a idade, especialmente após os quarenta anos,

principalmente como ocorre na HAS, isso pode aumentar a rigidez da camada média da aorta torácica e produzir pontos de fragilidade entre as camadas da parede vascular, contribuindo para o desenvolvimento da dissecação aórtica. A necrose da camada média em aortas dissecadas é atribuída à ruptura dos VV e à interrupção do suprimento sanguíneo da parede arterial, o que pode formar um local de manutenção ou ocorrência de nova dissecação e pode sugerir, também, que o enfraquecimento da camada média resultaria em alteração da absorção das forças hemodinâmicas da parede aórtica, podendo acarretar dilatação aórtica^{3, 23}.

A HAS, principal fator predisponente para dissecação, é acompanhada de hipertrofia e hiperplasia das células musculares lisas da aorta e aumento de consumo de oxigênio. Por outro lado, a HAS crônica limita a capacidade vasodilatadora dos VV, falhando na perfusão das necessidades metabólicas da camada média da aorta espessada, resultando em algum grau de isquemia e rigidez, principalmente, na parte externa dessa camada, já que a parte interna é nutrida por difusão da luz arterial. Além disso, a crise hipertensiva pode reduzir o fluxo sanguíneo através dos VV devido à condutância diminuída, uma vez que, vasos de tipo terminal, introduzidos em uma massa de músculo liso, com um grau de contração capaz de modificar o seu lúmen e com o aumento da demanda metabólica podem acentuar a isquemia parietal. Assim sendo, a camada média pode apresentar uma parte externa isquêmica e rígida e uma parte interna com elasticidade normal, podendo desenvolver pontos de fragilidades entre as camadas que, se destacadas, levam à dissecação. Esse modelo patogênico caracteriza a aorta como um órgão funcional^{11, 23}.

A Neovascularização é o processo de geração de novos vasos sanguíneos mediado por células endoteliais progenitoras em formato de tubo, resultando em um canal vascular estabilizado. Ela ocorre quando o espessamento da túnica íntima vascular é maior que 500µm. A angiogênese é a forma predominante de neovascularização na aterosclerose e é mediada por células endoteliais de vênulas pós-capilares formando novos capilares. O mecanismo molecular para isso está relacionado, predominantemente, à hipóxia e também à inflamação e à ativação de receptores do tipo *Toll*. Vários estudos mostram que a fonte para os microvasos pode ser dos VV adventíciais ou do lúmen vascular, porém o primeiro representa mais de 95% deles e representa lesões estenóticas severas com maior infiltração inflamatória e componente lipídico¹⁷.

Além disso, a neovascularização predispõe ao recrutamento de leucócitos e a infiltração de macrófagos em placas ricas em lipídios, sugerindo a hipótese de que a neovascularização, derivada dos VV adventiciais pelo gatilho da deposição e oxidação na camada íntima de LDL, mediada pela hipóxia e por receptores tipo *Toll*, contribuem para a remoção da gordura da camada íntima quando a concentração dessa é menor na circulação dos neovasos do que na íntima. Entretanto, a permeabilidade dos microvasos é responsável pelo extravasamento de células vermelhas sanguíneas, podendo causar hemorragia intraplaca, acelerar a aterosclerose e ainda atrair macrófagos para a placa e para a junção da túnica média e íntima. A fagocitose dos eritrócitos e das plaquetas provoca ativação celular, produção ceróide, formação de células *foam* e acúmulo de lipídios nesses pontos causando a ruptura da LEI e do colágeno da cápsula fibrosa precipitando ruptura da placa e trombose^{5, 17}.

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica e a angiogênese tem papel importante na aterotrombose. Sabe-se que durante o desenvolvimento da placa aterosclerótica existem muitos fatores pró-angiogênicos formando vasos imaturos passíveis de ruptura. Portanto, a inibição da angiogênese pode ser um ponto importante na prevenção do desenvolvimento de lesões arteriais instáveis. A identificação de mudanças fisiopatológicas relacionadas à angiogênese pode significar um futuro tratamento para a inibição do desenvolvimento da placa aterosclerótica²⁰.

2.6 PERSPECTIVAS

A importância da angiogênese na progressão da placa aterosclerótica é bem conhecida. Sua fisiopatologia inclui a possibilidade do espessamento da parede vascular além do limite da difusão dos nutrientes, a condução de células inflamatórias e lipoproteínas para a lesão e a contribuição para a instabilidade e a ruptura da placa. Estudos sugerem que os VV e a angiogênese têm papel chave no crescimento da placa e no remodelamento arterial aterosclerótico e que evitar esse processo pode induzir regressão das lesões ateroscleróticas. O impacto da supressão da angiogênese sugere que a redução da expansão dos VV pode estabilizar ou reverter a progressão da doença. O desenvolvimento de agentes

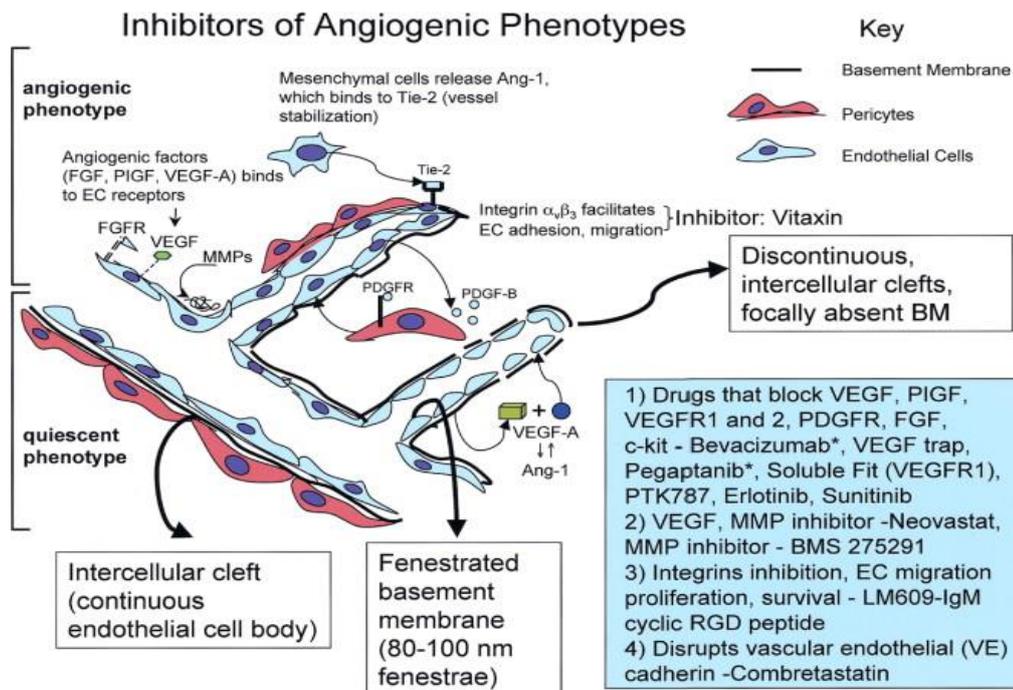
reguladores da angiogênese pode ter implicações terapêuticas na progressão e na manifestação aguda da aterosclerose. Agentes antiangiogênicos demonstraram reduzir a proliferação neovascular e o desenvolvimento da placa em modelos animais de aterosclerose, quando administrados cronicamente e em altas doses^{1,31,32}.

Khurana et al (2004)²⁸, em estudo experimental com lesão arterial local em dois modelos animais diferentes, induziu a angiogênese peri-adventicial e a formação neo-intimal. A aplicação de estimuladores da angiogênese à adventícia da artéria lesada induziu um aumento no espessamento neo-intimal maior do que fora encontrado com a lesão isolada, em ambos os modelos. A inibição dos fatores pró-angiogênicos reduziu o espessamento intimal ao nível encontrado na lesão mecânica apenas. Entretanto, os inibidores não foram eficazes na prevenção do espessamento neo-intimal, após a lesão mecânica da artéria, na ausência de administração de fatores de crescimento angiogênico, indicando que a angiogênese estimula o espessamento intimal, mas não o inicia. Esse estudo demonstrou que a proliferação neo-intimal, após lesão mecânica de uma artéria, consiste em um componente independente e outro dependente da angiogênese. A lesão mecânica da artéria por si só induz a uma resposta angiogênica da adventícia. O aumento dessa resposta está relacionado com o aumento da formação neo-intimal, a qual, mesmo com inibição da neovascularização, não elimina o componente induzido pela lesão no desenvolvimento neo-intimal. Por outro lado, foi observada uma correlação positiva entre o grau da angiogênese adventicial e o espessamento intimal e esse efeito foi abolido pela coadministração de inibidores angiogênicos. Dessa forma, os autores propõem um modelo de duas fases na formação neo-intimal: uma fase precoce, independente da angiogênese, iniciada por uma lesão ou estímulo mecânico e uma fase posterior, dependente da angiogênese, durante a qual a estimulação angiogênica provoca aumento na formação neo-intimal.

A vasta gama de indutores angiogênicos, incluindo fatores de crescimento, quimiocinas, enzimas angiogênicas, receptores endoteliais específicos e moléculas adesivas, representa amplo leque de potenciais terapêuticos para a eliminação da neovascularização patológica. A lista de drogas possíveis contém agentes, primeiramente, contra fatores de crescimento endotelial (VEGF e mediadores) e seus receptores. Inibidores endógenos da angiogênese incluem produtos de clivagem dos componentes matriciais como *canstatin* e *tumstatin* do colágeno IV,

vatstatin do colágeno VIII, *restin* do colágeno XV e *endostatin* do colágeno XVIII. Outros componentes incluem inibidores sintéticos da invasão (*marimastat*, *neovastat*, AG-3340), da adesão (*vitaxin*) e da proliferação celular (TNP-470, talidomida, *combretastatin A-4*), além de componentes que interferem com os fatores de crescimento angiogênicos (*interferon-alpha*, *suramin* e análogos), ou seus receptores (SU6668, SU5416). Para os componentes conhecidos por serem efetivos em tumores serem benéficos para eliminar a angiogênese da placa dependemos do conhecimento das características de maturação e crescimento dos vasos em diferentes leitos vasculares (figura 2) ^{5, 27}.

Figura 2 - Diagrama que ilustra moléculas importantes à angiogênese e potenciais alvos terapêuticos.



Fonte²⁷.

O esquema destaca a capacidade de fatores de crescimento para regular e estimular a angiogênese, mediada por uma resposta coordenada envolvendo fator de crescimento derivado de plaquetas, o receptor (PDGR / PDGFR) e angiopoietina (Ang) ¹³³. BM = membrana basal; EC = células endoteliais; Fator de crescimento de fibroblasto FGF =; Receptor FGFR = fator de crescimento de fibroblastos; Ig = imunoglobulina; MMP = metaloproteinase; PIGF = fator de crescimento placentário; RGD = ácido arginina-glicina-aspartico; Tie-2 = túnica quinase de células endoteliais internas; VEGF = fator de crescimento endotelial vascular; VEGFR = receptor do fator de crescimento endotelial vascular.

A redução do fluxo sanguíneo nos ramos terminais dos VV, como visto em pacientes com fatores de risco para aterosclerose, pode desencadear inflamação

seguida por aumento de permeabilidade, deposição de LDL, fagocitose por macrófagos e a formação de células *foam*. Estudos sugerem que terapia antiangiogênica pode trazer benefícios para pacientes pela modulação da vascularização da placa. A prevenção da proliferação dos VV pode representar o primeiro passo para a terapia contra as complicações da placa aterosclerótica²⁰.

A existência da teoria atual *outside-in* (de fora para dentro), onde a inflamação vascular começa na adventícia e avança para as camadas média e íntima opõem-se à antiga teoria *inside-out* (de dentro para fora) que descrevia a infiltração na parede vascular de monócitos através da luz do vaso. Entre os argumentos que favorecem a teoria *outside-in* está a presença de células imunes e macrófagos na adventícia. Estudos experimentais demonstraram que a adventícia é a primeira a mostrar células inflamatórias após lesão mecânica por balão de angioplastia, em artérias coronárias. Esses resultados são coincidentes com estudos em humanos que reportam à infiltração de células inflamatórias da adventícia para a placa, reguladas pelas células endoteliais dos VV, precocemente à formação de folículos linfáticos contendo células plasmáticas²².

A neovascularização pode agir como conduto para a entrada de leucócitos em sítios de inflamação crônica. Observou-se, em estudos experimentais, que a densidade dos VV se correlaciona com a extensão das células inflamatórias e não com o tamanho do ateroma e que aortas ateroscleróticas promovem a ativação da angiogênese. Por outro lado, o angiostatin inibe a angiogênese e a aterosclerose, reduz os macrófagos na placa e ao redor dos VV, mas não há um efeito direto do angiostatin sobre os monócitos. Após o bloqueio da angiogênese *in vivo*, o potencial angiogênico do tecido aterosclerótico é reduzido. Macrófagos ativados estimulam a angiogênese e recrutam mais células inflamatórias. A inibição da angiogênese pode interromper esse *feedback* e promover a estabilização da placa³⁴.

A aprovação recente de drogas antiangiogênicas para uso clínico em câncer e degeneração macular aumenta a possibilidade de testar esses agentes como inibidores da angiogênese da placa aterosclerótica. O campo de interesse é testar a possibilidade de prevenir, destruir ou normalizar neovasos intraplaca, num paralelo com a oncologia, onde a inibição ou a destruição dos vasos existentes em tumores tem sido a área mais estudada na última década. A proposta e a demonstração de que agentes antiangiogênicos podem corrigir a vascularização anormal de tumores pode ser extrapolada para a correção de vasos imaturos da placa aterosclerótica,

prevenindo hemorragia intraplaca, tornando-se uma questão intrigante quanto a ser possível aplicar essas terapias para a aterosclerose. Novos agentes que podem normalizar a vascularização, sem afetar vasos saudáveis, podem ser uma estratégia de tratamento^{33, 35}.

A Neovascularização é principalmente mediada pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). O VEGF é um regulador potente da fisiopatologia da angiogênese. A inibição da neovascularização da placa é um alvo terapêutico em potencial. Um anticorpo monoclonal recombinante específico contra VEGF, como o bevacizumabe, aplicado em oncologia como um potente agente antiangiogênico, tem sido usado recentemente na forma de *stent* farmacológico para reestenoses coronarianas em síndromes coronárias agudas, com segurança e mínimo crescimento neo-intimal^{29, 36}.

O interesse dos pesquisadores nos últimos anos está no desenvolvimento de modelos animais para a investigação de placas vulneráveis. Até agora não há modelo animal padrão para esses estudos³⁷.

A inibição local ou sistêmica da ativação inflamatória tem sido testada. Estudo experimental demonstrou que em aortas ateromatosas de coelhos, avaliadas por termografia, a remoção dos VV foi associada com a diminuição da temperatura da parede vascular, inferindo que a inibição da proliferação dos VV pode estabilizar as placas instáveis. Fármacos antiangiogênicos, como os usados em oncologia, são testados para a inibição da proliferação dos VV nas placas ateroscleróticas³⁷.

Estudos em vivo mostram que o bloqueio da formação vascular pode reduzir significativamente a placa intimal²⁰. Moulton et al. (1999)³⁸ demonstraram que endostatin e TNP-470, potentes inibidores angiogênicos, reduziram a formação neovascular e o crescimento da placa intimal em aorta de ratos. Stefanadis et al. (2006)³⁹ em um estudo experimental em coelhos, com dieta aterogênica, concluíram que o implante de *stent* farmacológico com bevacizumabe, comparado ao *stent* não farmacológico, nas artérias ilíacas, é um procedimento possível e seguro. Stefanadis et al. (2007)⁴⁰ mostraram que o uso de anticorpos específicos contra VEGF resultou em redução significativa do crescimento neovascular e espessamento neo-intimal após 4 semanas em coelhos com dieta aterogênica. Gossl et al. (2009)⁴¹ mostraram que a inibição da neovascularização dos VV em suínos, com dieta rica em colesterol, usando talidomida, reduziu significativamente o espessamento e a formação de placa neo-intimal. Mollmark et al. (2011)⁴² demonstraram que a atividade

antiangiogênica do rPAI-123 (proteína inibidora da ativação do plasminogênio) induz ao colapso dos VV e reduz significativamente o colesterol e a área da placa em ratos hipercolesterolêmicos. Kampshulte et al. (2014)⁴³ conduziram um estudo experimental analisando a aorta descendente de ratos alimentados com *western diet*, com ou sem talidomida, por 29 semanas, através de nano-CT, revelando que a área da secção transversal da adventícia dos VV foi significativamente reduzida em ratos tratados com talidomida, acompanhado por uma diminuição do número total de VV nos cortes, demonstrando uma diminuição significativa da área da placa aterosclerótica.

Baseado no descrito, experimentos de regressão de placa têm sido conduzidos com o uso de HDL promovendo transporte lipídico reverso da íntima para a adventícia e a redução dos microvasos pelo uso de inibidores angiogênicos como o endostatin¹⁷.

Nos últimos anos, um número crescente de terapias angiogênicas está sendo proposto para facilitar a modulação da neovascularização e suas consequências em doenças como câncer e degeneração macular. Um conhecimento dos mecanismos responsáveis pela proliferação vascular adventicial e a sua extensão para a camada íntima é necessário para o estudo de terapêuticas antiangiogênicas aplicáveis à aterosclerose²⁰.

2.7 LEGISLAÇÃO E ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

A utilização de animais em experimentos científicos é descrita desde o século V a.C., no entanto, a sua crescente aplicação ocorreu a partir do início do século XIX. Foi o francês Claude Bernard, considerado o fundador da moderna medicina experimental, que lançou os princípios do uso de animais como modelo de estudo e transposição para a fisiologia humana na obra *Introduccion à L'étude de la Médecine Expérimentale*⁴⁴, publicada em Paris em 1865^{45, 46}.

A experimentação animal é a prática da utilização de animais com propósitos científicos ou didáticos. O objetivo do modelo experimental em pesquisa é imitar as condições fisiopatológicas, na busca de informações prognósticas, sobre a resposta orgânica que determinada intervenção possa causar e estabelecer um paralelo com a resposta em seres humanos.

O uso de animais em experimentos é alvo de muitas críticas, só comparável àquelas recebidas pelos laboratórios que trabalham com energia nuclear⁴⁷. A questão do status moral dos animais sempre foi debatida. Muitos filósofos dedicaram-se a este tema, mas a controvérsia permanece até os dias atuais, não havendo consenso quanto à posição que os animais ocupam em relação aos seres humanos⁴⁵.

As buscas pela normatização dos cuidados com os animais no processo científico acompanham esse tema no cenário internacional. A primeira sociedade protetora dos animais, a *Society for the Preservation of Cruelty to Animals*, foi criada na Inglaterra em 1824. A primeira lei a regulamentar o uso de animais em pesquisa foi proposta no Reino Unido em 1876, pelo *British Cruelty to Animal Act*⁴⁵.

Em 1909, surge a primeira publicação norte-americana sobre aspectos éticos da utilização de animais em experimentação. Cientistas e movimentos de defesa do bem-estar e dos direitos dos animais intervêm, propondo disciplinar a prática da pesquisa científica em animais. Russel e Burch (1959), na publicação *Principles of Humane Experimental Technique*⁴⁸, apresentaram o princípio dos três erres: *replacement, reduction, refinement*, que significam reduzir o uso de animais ao mínimo, refinar as técnicas de criação e de experimentação e repor ou substituir os animais por alternativas tecnológicas ou por animais menos sensíveis. Esses princípios norteiam e são citados nos estatutos de cuidados com os animais de experimentação até hoje. O *Guide for the Care and Use for Laboratory Animals*⁴⁹, da *National Academy of Sciences - US*, com a primeira publicação em 1963 e revisado em 1965, 1968, 1972, 1978, 1985, 1996 e 2008 (8ª edição) tornou-se referência internacional no uso e cuidado de animais e é exigência nos Estados Unidos para a Política dos Serviços Públicos de Saúde^{45, 46, 50}.

A publicação do livro *Animal Liberation* (1975)⁵¹, do professor Peter Singer, citado como o livro mais importante sobre ética animal, causou polêmicas mundiais e contribuiu para a inclusão de uma salvaguarda ao uso de animais na Declaração de Helsinque II, adotada na 29ª Assembleia Mundial de Médicos, no Japão no mesmo ano. Em Bruxelas, 1978, a UNESCO estabeleceu a Declaração Universal dos Direitos dos Animais, com grandes temas de discussão⁴⁵.

A preocupação social com a crueldade aos animais está presente no Brasil desde o século XIX, nos Códigos de Posturas Municipais, e datam desse período as primeiras leis relacionadas ao controle animal. Pelo código civil de 1916 (art. 47), os

animais estavam sob a guarda e responsabilidade humana. Os abusos cometidos na criação, transporte, trabalho animal, comercialização e diversão foram proibidos em 1924 e 1934. O decreto 24.645 de 1934 foi a primeira norma jurídica a contemplar a proteção dos animais em atividades científicas, referindo-se a esse uso como exceção. Os animais passaram a ser tutelados pelo Estado e os maus tratos passíveis de punição com multa e até prisão. A “crueldade contra animais” mesmo para “fins didáticos ou científicos”, foi regulamentada como contravenção penal no Estado Novo pelo decreto-lei 3.688, de 1941^{45, 46}.

A lei 5.197 de 1967, “Lei de Proteção à Fauna”, atualizou as regulamentações dos decretos-lei 24.645/1934 e 5.894/1943 e estabeleceu penas severas para a posse, a compra, a venda, o transporte ou a caça de animal silvestre, além das listagens de espécies animais ameaçados de extinção. O artigo 14 dispõe sobre a “Casa Científica”, concedendo licença a cientistas de instituições oficiais para a coleta de material destinado para fins científicos. A lei 5.517, de 1968, estabelece que todos os procedimentos anestésicos e/ou cirúrgicos em animais de produção ou silvestres devem ser realizados pelo médico-veterinário e apenas esse pode realizar anestesia, analgesia e eutanásia⁴⁶.

Em maio de 1979, foi publicada a lei nº 6.638, que estabeleceu as Normas para a Prática Didático-Científica da Vivisseção de Animais, exigindo anestesia, locais apropriados, supervisão de técnicos especializados e proibindo a presença de menores de idade. Dez anos depois, o uso de animais na pesquisa científica foi regulado na Constituição Federal (CF/88), no artigo 225, estabelecendo que a coletividade e o Poder Público são responsáveis pela proteção da fauna, além de outros dispositivos jurídicos relacionados às noções de crueldade e maus-tratos, incluindo o tráfico de animais. Em 1998, foi sancionada no Brasil a Lei de Crimes Ambientais (Lei nº 9.605/98), que estabelece crime para quem praticar “ato de abuso, maus-tratos, ferir ou mutilar animais silvestres, domésticos ou domesticados, nativos ou exóticos”. Incluem, nas mesmas penas, quem “realiza experiência dolorosa ou cruel em animal vivo, ainda que para fins didáticos ou científicos, quando existirem recursos alternativos”^{45, 46, 47, 52}.

Durante esse período, nascia em 1983 o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com objetivo de defender o bem-estar animal e seu uso racional, capacitar profissionais e lutar por uma legislação específica. Em 2008, passa a chamar-se Sociedade Brasileira da Ciência em Animais de

Laboratório (SBCAL/COBEA). A SBCAL/COBEA atua para a evolução da ciência de animais de laboratório. Participações importantes, como na aprovação da Lei 11.794/2008⁵³, demonstra o caráter atuante da sociedade na busca pela proteção e o bem-estar de animais de laboratório.

A Lei 11.794 de 2008 (Lei Arouca)⁵³, regulamentada pelo decreto 6.899/09, revoga a lei 6.638/79 e estabelece procedimentos para o uso científico de animais incluindo estabelecimentos de ensino superior e educação profissional técnica da área biomédica. A Lei Arouca também cria o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), torna obrigatória a constituição das Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAs) em instituições com atividades de ensino ou pesquisa com animais, além da obrigatoriedade do registro e licenciamento da instituição, criando o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais (CIUCA)^{45, 52}.

O CONCEA é a instância colegiada multidisciplinar, ligada ao Ministério da Ciência e Tecnologia. Tem como competências formular normas relativas à utilização humanitária de animais, credenciar instituições para criação ou utilização de animais, monitorar e avaliar a introdução de técnicas alternativas, estabelecer e rever as normas para uso e cuidados com animais, instalação e funcionamento de biotérios, credenciamento de instituições e manter cadastro atualizado dos procedimentos de ensino e pesquisa. O CONCEA, em 2013, lançou a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA)⁵⁴ e as Diretrizes da Prática de Eutanásia⁵⁵, estabelecendo os princípios atuais da experimentação animal no Brasil.

A DBCA⁵⁴ tem por finalidade “apresentar princípios de condutas que permitam garantir o cuidado e o manejo éticos de animais utilizados para fins científicos ou didáticos”. Os princípios estabelecidos nesta diretriz são orientações para pesquisadores, professores, estudantes, técnicos, instituições, CEUAs e todos os envolvidos no cuidado e manejo de animais para fins científicos ou didáticos. As Diretrizes da Prática de Eutanásia⁵⁵, por sua vez, “objetivam estabelecer procedimentos que evoquem o mínimo de dor e sofrimento com a realidade da maioria dos estabelecimentos onde a eutanásia é realizada”.

Estudos com animais exigem do pesquisador planejamento cuidadoso, conhecimento das leis e diretrizes do país, princípios éticos, regras e condições da revista em que o trabalho será publicado e, principalmente, ter conhecimento de

estudos anteriores na mesma área. O direito dos animais deve ser respeitado, assim como o desenvolvimento da pesquisa em benefício da humanidade⁴⁵.

2.8 MODELO EM ANIMAL DE DOENÇAS DA ESPÉCIE HUMANA

O modelo animal é usado virtualmente em todos os campos da pesquisa biológica nos dias de hoje. A relação entre os humanos e os animais de outras espécies ganhou contornos mais definidos e a exploração de outras espécies tem regras e ética estabelecidas. A inferência dos resultados do animal para a espécie humana tem critérios claros e objetivos a serem preenchidos⁵⁶.

Em ciências biológicas, um modelo poderia ser comparado ao conceito estatístico de amostragem. Como existem limitações, às vezes intransponíveis, para se trabalhar com toda uma população, busca-se uma amostra representativa desta população. Os resultados obtidos com a amostra, em que o trabalho foi exequível, transpõem-se para toda a população⁵⁷.

Um modelo deve ter características suficientes de semelhança e possuir a capacidade de ser manipulado sem as limitações do objeto imitado, atendendo aos pressupostos de permitir o estudo dos fenômenos biológicos ou de comportamento do animal, além de permitir que um processo patológico, espontâneo ou induzido, possa ser investigado e que o fenômeno, em um ou mais aspectos, seja semelhante ao fenômeno em seres humanos⁵⁶.

O objetivo do modelo experimental é imitar as condições fisiopatológicas dos humanos e a escolha do animal experimental é de crucial importância. O levantamento das bases de dados da Biblioteca Regional de Medicina cita o rato como o animal mais usado em pesquisa, seguido pelo camundongo, coelho, cão, suíno e os primatas^{12, 56}.

Para o presente estudo, a escolha do animal para o modelo experimental deve considerar características de disponibilidade, manejo, ganho ponderal, tamanho, custo, mas, principalmente, as características de resposta à lesão vascular, sistema de fibrinólise e coagulação. Os animais utilizados, com maior frequência, como modelo para lesão aórtica são os suínos, principalmente para experimentos agudos ou de curta duração, evitando a restrição da elevada

capacidade de conversão alimentar, que reflete em ganho de peso e crescimento acelerados^{12, 13, 57}.

O uso do suíno em pesquisas científicas é uma prática antiga. Nos anos de 1540, Versalius, em sua famosa obra *De Humani Corporis Fabrica*, em que tentava descrever os mecanismos que regem o corpo humano, desenhou um porco sendo utilizado em experimentação da maneira como o médico grego Galeno o fizera há mais de mil anos. Segundo o autor, essa deve ser a mais antiga ilustração do uso desses animais nas diferentes áreas da ciência. Em 1628, Willian Harvey descreveu os mecanismos que regem a circulação sanguínea utilizando o suíno como animal de experimentação para melhor compreender a fisiologia humana⁵⁷.

Hoje estão amplamente estabelecidas as semelhanças entre a anatomia, fisiologia e fisiopatologia dos suínos e a dos homens, principalmente no que diz respeito a aspectos ligados à anatomia cardiovascular, resposta vascular à lesão, sistema de fibrinólise e coagulação, embasando a escolha desse animal como modelo para o estudo^{12, 13, 57}.

2.9 MODELO DE LESÃO AÓRTICA

O desenvolvimento de um modelo de lesão para estudos experimentais deve levar em consideração além da melhor técnica necessária para a transposição dos resultados para os humanos, o uso racional dos animais de laboratório, necessitando da simplificação do ato cirúrgico para reduzir morbimortalidade, reduzindo sofrimento e perda de animais, ao mesmo tempo, sendo reproduzível numa linha de pesquisa.

Como já descrito, um modelo de aterosclerose descreve a hiperplasia das células musculares lisas e formação de células *foam* sem alteração endotelial, através da oclusão dos VV adventíciais e isquemia da porção externa da camada média, forçando a migração dessas células para a superfície interna. A hipóxia estimula a proliferação de células musculares lisas e atração leucocitária, podendo iniciar a hiperplasia intimal. Portanto, a nova hipótese sugere que a hipóxia da parede arterial, a qual é secundária à oclusão dos VV adventíciais, pode ser a lesão inicial na aterosclerose^{4, 28}.

A lesão mecânica da artéria por si só induz a uma resposta angiogênica da adventícia, sendo observada uma correlação positiva entre o grau da angiogênese adventicial e o espessamento intimal²⁸. Vários estudos suportam esse conceito. Wilens et al. (1965) demonstraram que a ligadura das artérias intercostais na aorta descendente de cães, com o intuito de bloquear o fluxo dos VV, causou necrose na camada média 10 dias após a ligadura, enquanto o terço externo e o interno da parede não estavam necróticos⁵. A remoção da gordura periaórtica, que contém os VV da aorta ascendente de cães, resultou em uma extensa necrose da camada média e uma diminuição na distensibilidade da aorta. Estudos prévios em aorta de caninos também indicam que a interrupção do fluxo nos VV produz mudanças agudas na distensibilidade e mudanças estruturais na parede aórtica^{24, 58}.

Há mais de 4 décadas, sabe-se que a ressecção da adventícia e, por conseguinte, dos VV, leva à isquemia das camadas mais externas da túnica média⁷. Angouras et al. (2000)²³ publicaram estudo em suínos submetidos à ressecção da adventícia associada a ligadura de intercostais, recobrando a aorta circunferencialmente por material não poroso (cloreto de polivinil) para prevenir a fibrose periaórtica e a neovascularização, concluindo que, após 15 dias, a interrupção do fluxo pelos VV resultou em necrose isquêmica das porções mais externas da túnica média, com perda completa das células musculares lisas e da arquitetura das fibras de colágeno e elastina. Fischer (2004)¹¹ realizou experimento em modelo animal para determinar alterações na parede arterial na presença e na ausência da adventícia, demonstrando que, com a eliminação da túnica adventícia, havia redução do diâmetro e aumento da rigidez arterial. Portanto, a importância nutritiva dos VV para a parede arterial não deve ser subestimada, uma vez que a ligadura experimental das artérias intercostais, fonte de VV para a aorta descendente, é capaz de produzir necrose da túnica média^{11, 16}.

No presente estudo, a opção foi pela dissecação de um segmento da aorta descendente de suínos, com a ligadura de intercostais, sem a remoção da adventícia, para realizar a avaliação da proliferação dos VV, grau de injúria, grau de inflamação e de fibrose intimal.

2.10 BEVACIZUMABE⁵⁹

O bevacizumabe é um anticorpo monoclonal humanizado recombinante, produzido por tecnologia de DNA recombinante em um sistema de expressão de célula de mamífero (ovário de hamster chinês), em meio nutriente que contém o antibiótico gentamicina, o qual é purificado por um processo que inclui inativação viral específica e etapas de remoção. A gentamicina é detectável no produto final em $\leq 0,35$ ppm. O bevacizumabe é constituído de 214 aminoácidos e tem peso molecular de, aproximadamente, 149 mil dáltons.

O bevacizumabe age reduzindo a vascularização de tumores. Sem o suprimento de nutrientes que chega por meio dos vasos sanguíneos, o crescimento dos tumores e de suas metástases é inibido. O medicamento começa a agir logo após a sua administração.

O mecanismo de ação desse anticorpo monoclonal humanizado recombinante ocorre através das suas propriedades farmacodinâmicas, ligando-se e neutralizando seletivamente a atividade biológica do fator de crescimento do endotélio vascular humano (VEGF). O bevacizumabe contém regiões estruturais humanas, com regiões ligantes de antígenos de um anticorpo murino humanizado, que se liga ao VEGF. Ele inibe a ligação do VEGF a seus receptores, Flt-1 e KDR, na superfície das células endoteliais. A neutralização da atividade biológica do VEGF reduz a vascularização de tumores, inibindo, assim, o crescimento tumoral. A administração de bevacizumabe (ou de seu anticorpo murino original) a modelos de xenoenxerto de câncer em camundongos resultou em atividade antitumoral extensa em cânceres humanos, incluindo câncer colorretal, mama, pâncreas e próstata. A progressão da doença metastática foi inibida e a permeabilidade microvascular foi reduzida.

Quanto às propriedades farmacocinéticas, de modo geral, com base nos estudos clínicos, a distribuição de bevacizumabe foi caracterizada por baixa depuração, volume limitado do compartimento central (V_c) e meia-vida de eliminação prolongada. Isso permite que os níveis séricos terapêuticos desejados de bevacizumabe sejam mantidos com uma variação do esquema de administração (tal como uma administração a cada duas ou três semanas). A meia-vida de eliminação, conforme o modelo bicompartimental, é de 18 a 20 dias.

Os eventos adversos mais graves são perfurações gastrintestinais, hemorragia e tromboembolismo arterial.

A apresentação injetável é em frasco-ampola de 4ml, contendo o princípio ativo bevacizumabe (anticorpo monoclonal anti-VEGF humanizado), em 100mg (25mg/mL) e excipientes a-trealosediidratado, fosfato de sódio monobásico monoidratado, fosfato de sódio dibásico, polissorbato 20 e água para injetáveis.

O bevacizumabe, em combinação, é indicado para o tratamento de pacientes com carcinoma metastático do cólon ou do reto. A dosagem padrão para o câncer colorretal metastático, no tratamento de primeira linha, é de 5mg/kg de peso corporal, administrada uma vez a cada 2 semanas, mantida continuamente até a progressão da doença de base ou até que ocorra a toxicidade inaceitável.

3 HIPÓTESE

O uso da terapia antiangiogênica reduz a proliferação vascular adventicial e sua extensão para a camada íntima, reduzindo as alterações histológicas secundárias à interrupção dos VV, na aorta descendente, em modelo suíno.

4 OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho é demonstrar a alteração na resposta histológica secundária à interrupção dos VV, na aorta descendente, com o uso de terapia antiangiogênica, em modelo suíno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ DRINANE, M. et al. The Anti-Angiogenic Activity of rPAI-1₂₃ Inhibits Vasa Vasorum and Growth of Atherosclerotic Plaque. **Circ Res**, Baltimore, v. 104, n. 3, p. 337-45, 13 feb. 2009.
- ² FAXON, D. P. et al. Atherosclerotic Vascular Disease Conference. Writing Group III: Pathophysiology. **Circulation**, Hagerstown, v. 109, n. 21, p. 2617-25, jul. 2004.
- ³ STEFANADIS, C.; VLACHOPOULOS, C.; KARAYANNACOS, P. Effect of Vasa Vasorum Flow on Structure and Function of the Aorta in Experimental Animals. **Circulation**, Hagerstown, v. 91, n. 10, p. 2669-78, may. 1995.
- ⁴ BARKER, S. G. et al. Arterial Intimal Hyperplasia after Occlusion of the Adventitial Vasa Vasorum in the Pig. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, Baltimore, v. 13, n. 1, p. 70-7, jan. 1993.
- ⁵ MULLIGAN-KEHOE, M.J. Anti-angiogenic Activity of rPAI-123 and Vasa Vasorum Regression. **Trends Cardiovasc Med**, New York, v. 23, n. 4, p. 114-20, may. 2013.
- ⁶ WOODRUFF, C. Studies on the Vasa Vasorum. **Am J Pathol**, New York, v. 2, p. 567-72, 16 jul. 1926.
- ⁷ PEREIRA, A.H. Ruptura dos Vasa Vasorum e Hematoma Intramural da Aorta: Um Paradigma em Mudança. **J Vasc Bras**, Salvador, v. 9, n. 2, p. 57-60, jun. 2010.
- ⁸ BARGER A.C. et al. Hypothesis: Vasa Vasorum and Neovascularization of Human Coronary Arteries. A Possible Role in the Pathophysiology of Atherosclerosis. **N Engl J Med**, Boston, v. 310, n. 3, p. 175-7, jan. 1984.
- ⁹ GÖSSL M. et al. Impact of Coronary Vasa Vasorum Functional Structure on Coronary Vessel Wall Perfusion Distribution. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, Bethesda, v. 285, n. 5, p. H2019-26, nov. 2003.
- ¹⁰ DEN HARTOG J.P. Strength of Materials. **Dover Publications**, New York, p. 323, 1949.
- ¹¹ FISCHER, E.I.C. La Adventicia: Estado Actual Del Conocimiento. **Rev Argent Cardiol**, Buenos Aires, v. 76, n. 1, p. 58-63, ene./feb. 2008.

¹² FAGUNDES, A. et al. Efeitos da Remoção da Túnica Adventícia da Aorta Descendente em Suínos. **Rev Col Bras Cir**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 2, p. 133-8, mar./abr. 2012.

¹³ CASTRO, C. J.; PEREIRA, A. H.; PASA, M. B. Morphometric Analysis of the Intimal Reaction After Stent Implantation in Iliac Arteries Submitted to Angioplasty in Pigs. **Acta Cir Bras**, São Paulo, v. 21, n. 3, p. 139-43, may. 2006.

¹⁴ YAMAMOTO, G.R.I. **Trombose Arterial Aguda Induzida Experimentalmente por Lesão Endotelial e Ativação da Coagulação Sanguínea: Efeito da Administração Crônica de L-Arginina**. 1998. Tese (Doutorado em Cardiologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

¹⁵ PASA, M. B.; PEREIRA, A. H.; CASTRO, C. J. Análise Morfométrica do Espessamento Intimal Secundário ao Implante de *Stent* em Artérias Carótidas de Suínos. **Acta Cir Bras**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 165-72, mar./abr. 2008.

¹⁶ WOLINSKY, H.; GLAGOV, S. Nature of Species Differences in the Medial Distribution of Aortic Vasa Vasorum in Mammals. **Circ Res**, Baltimore, v. 20, n. 4, p. 409-21, apr. 1967.

¹⁷ MORENO, P.R. et al. Neovascularization in Human Atherosclerosis. **Circulation**, Hagerstown, v. 113, n. 18, p. 2245-52, may. 2006.

¹⁸ RITMAN, E.L.; LERMANN, A. The Dynamic Vasa Vasorum. **Cardiovasc Res**, Oxford, v. 75, n. 4, p. 649-58, sep. 2007.

¹⁹ JUNYAN XU; XIAOTONG LU; GUO-PING SHI. Vasa Vasorum in Atherosclerosis and Clinical Significance. **Int J Mol Sci**, Basel, v. 16, n. 5, p. 11574-608, may. 2015.

²⁰ SLEVIN, M.; KRUPINSKI, J.; BADIMON, L. Controlling the Angiogenic Switch in Developing Atherosclerotic Plaques: Possible Targets for Therapeutic Intervention. **J Angiogenes Res**, London, v. 1, n. 1, p. 4, sep. 2009.

²¹ MORENO, P.R. et al. Plaque Neovascularization Is Increased in Ruptured Atherosclerotic Lesions of Human Aorta. Implications for Plaque Vulnerability. **Circulation**, Hagerstown, v. 110, n. 14; p. 2032-8, oct. 2004.

- ²² MULLIGAN-KEHOE, M.J.; SIMONS, M. Vasa Vasorum in Normal and Diseased Arteries. **Circulation**, Hagerstown, v. 129, n. 24, p. 2557-66, 17 jun. 2014.
- ²³ ANGOURAS, D. et al. Effect of Impaired Vasa Vasorum Flow on the Structure and Mechanics of the Thoracic Aorta: Implications for the Pathogenesis of Aortic Dissection. **Eur J Cardiothorac Surg**, Kidlington, v. 17, p. 468-73, apr. 2000.
- ²⁴ SCOTLAND, R.S.; VALLANCE, P.J.; AHLUWALIA, A. Endogenous Factors Involved in Regulation of Tone of Arterial Vasa Vasorum: Implications for Conduit Vessel Physiology. **Cardiovasc Res**, Oxford, v. 46, n 3; p. 403-11, jun. 2000.
- ²⁵ DI STEFANO, R.; FELICE, F.; BALBARINI, A. Angiogenesis as Risk Factor for Plaque Vulnerability. **Curr Pharm Des**, Schiphol, v. 15, n. 10, p. 1095-106, 2009.
- ²⁶ RIBATTI, D.; LEVI-SCHAFFER, F.; KOVANEN, P.T. Inflammatory Angiogenesis in Atherogenesis: a Double-Edged Sword. **Ann Med**, London, v. 40, n. 8, p. 606-21, 2008.
- ²⁷ KOLODZIE, F.D. et al. Elimination of Neoangiogenesis For Plaque Stabilization: Is There a Role For Local Drug Therapy? **J Am Coll Cardiol**, New York, v. 49, n. 21, p. 2093-101, 29 may. 2007.
- ²⁸ KHURANA, R. et al. Angiogenesis-Dependent and Independent Phases of Intimal Hyperplasia. **Circulation**, Hagerstown, v. 110, n. 16, p. 2436-43, 19 oct. 2004.
- ²⁹ STEFANADIS, C. et al. First-in-Man Study with Bevacizumab-Eluting Stent: a New Approach for the Inhibition of Atheromatic Plaque Neovascularization. **EuroIntervention**, Toulouse, v. 3, n. 4, p. 460-4, jan. 2008.
- ³⁰ OHHIRA, A.; OHHASHI, T. Effects of Aortic Pressure and Vasoactive Agents on the Vascular Resistance of the Vasa Vasorum in Canine Isolated Thoracic Aorta. **J Physiol**, Oxford, v. 453, p. 233-45, 1992.
- ³¹ WINTER, P. M. et al. Endothelial $\alpha V \beta_3$ Integrin-Targeted Fumagillin Nanoparticles Inhibit Angiogenesis in Atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, Baltimore, v. 26, n. 9, p. 2103-9, sep. 2006
- ³² MOULTON, K. S. Plaque Angiogenesis and Atherosclerosis. **Curr Atheroscler Rep**, Dordrecht, v. 3, n. 3, p. 225-33, may. 2001.

- ³³ MOULTON, K. S. Angiogenesis in Atherosclerosis: Gathering Evidence Beyond Speculation. **Curr Opin Lipidol**, London, v. 17, n. 5, p. 548–55, oct. 2006.
- ³⁴ MOULTON, K. S. et al. Inhibition of Plaque Neovascularization Reduces Macrophage Accumulation and Progression of Advanced Atherosclerosis. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 100, n. 8, p. 4736–41, 15 apr. 2003.
- ³⁵ FINN, A.V.; JAIN, R.K. Coronary Plaque Neovascularization and Hemorrhage: a Potential Target for Plaque Stabilization? **J ACC Cardiovasc Imaging**, Boston, v. 3, n. 1, p. 41-4, jan. 2010.
- ³⁶ STEFANADIS, C. et al. Avastin-Eluting Stent: Long-Term Angiographic and Clinical Follow Up. **Hellenic J Cardiol**, Athens, v. 49, n. 3, p. 188-90, may./jun. 2008.
- ³⁷ TOUTOUZAS, K.; STEFANADIS, C. Advances in Vulnerable Plaque Detection and Treatment: How Far Have We Gone? **Hellenic J Cardiol**, Athens, v. 47, n. 3, p. 129-31, may./Jun. 2006.
- ³⁸ MOULTON, K. S. et al. Angiogenesis Inhibitors Endostatin or TNP-470 Reduce Intimal Neovascularization and Plaque Growth in Apolipoprotein E-Deficient Mice. **Circulation**, Hagerstown, v. 99, n. 13, p. 1726–32, apr. 1999.
- ³⁹ STEFANADIS, C. et al. First Experimental Application of Bevacizumab-Eluting PC Coated Stent For ilhibition of Vasa Vasorum of Atherosclerotic Plaque: Angiographic Results in a Rabbit Atheromatic Model. **Hellenic J Cardiol**, Athens, v. 47, n. 1, p. 7-10, jan./feb. 2006.
- ⁴⁰ STEFANADIS, C. et al. Inhibition of Plaque Neovascularization and Intimal Hyperplasia by Specific Targeting Vascular Endothelial Growth Factor with Bevacizumab-Eluting Stent: an Experimental Study. **Atherosclerosis**, Limerick, v. 195, n. 2, p. 269-76, dec. 2007.
- ⁴¹ GOSSL, M. et al. Prevention of Vasa Vasorum Neovascularization Attenuates Early Neointima Formation in Experimental Hypercholesterolemia. **Basic Res Cardiol**, Darmstadt, v. 104, n. 6, p. 695-706, nov. 2009.
- ⁴² MOLLMARK, J. et al. Antiangiogenic Activity of rPAI-123 Promotes Vasa Vasorum Regression in Hypercholesterolemic Mice Through a Plasmin-Dependent Mechanism. **Circ Res**, Baltimore, v. 108, n. 12, p. 1419–28, 10 jun. 2011.

⁴³ KAMPSCHULTE, M. et al. Thalidomide Influences Atherogenesis in Aortas of ApoE(-/-)/LDLR (-/-) Double Knockout Mice: a Nano-CT Study. **Int J Cardiovasc Imaging**, Boston, v. 30, n. 4, p. 795-802, apr. 2014.

⁴⁴ BERNARD, Claude. **Introduction à L'étude de la Médecine Expérimentale**. 1 ed. Paris: Libraires de L'Académie Imperiale de Mèdecine, 1865.

⁴⁵ MIZIARA, I. D. et al. Ética da Pesquisa em Modelos Animais. **Braz. J. Otorhinolaryngol**, São Paulo, v. 78, n. 2, mar./apr. 2012.

⁴⁶ MACHADO, C. J. S. et al. A regulação do uso de animais no Brasil do século XX e o processo de formação do atual regime aplicado à pesquisabiomédica. **Hist. Cienc. Saúde Manguinhos**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 1, p. 87-105, jan./mar. 2010.

⁴⁷ PEREIRA, C. E. M.; SILVA, J. D. M. da; ROMEIRO, V. R. Aspectos Éticos da Experimentação Animal. **Acta Cir. Bras.** São Paulo, v. 13, n.2, apr./may./jun. 1998.

⁴⁸ RUSSEL, William M. S.; BURCH, Rex L. **Principles of Humane Experimental Technique**. 1 ed. London: Methuen, 1959.

⁴⁹ National Research Council of the National Academies. **Guide for the Care and Use for Laboratory Animals**. 8. Ed. Washington, D.C.: The National Academies Press, 2011.

⁵⁰ DAMY, S. B. et al. Aspectos Fundamentais da Experimentação Animal - Aplicações em Cirurgia Experimental. **Rev. Assoc. Med. Bras.** São Paulo, v.56, n.1, jan./fev. 2010.

⁵¹ SINGER, Peter. **Animal Liberation: a New Ethics for Our Treatment of Animals**. 1 ed., New York: Harper Collins, 1975.

⁵² GREIF, S. A Experimentação Animal e as Leis. **ANDA**, dez. 2008. Disponível em: <<http://www.anda.jor.br/11/12/2008/a-experimentacao-animal-e-as-leis>>. Acesso em: 26 out. 2015.

⁵³ BRASIL. Presidência da República. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. **Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008**. Disponível em:

<http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2008/Lei/L11794.htm>. Acesso em: 26 out. 2015.

⁵⁴ BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). **Diretriz Brasileira para Cuidado e Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos**. Brasília, DF, 2013. 50 p.

⁵⁵ BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). **Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA**. Brasília, DF, 2013. 8 p.

⁵⁶ FAGUNDES, D. J.; TAHALL, M. O. Animais de Laboratório - Modelo Animal de Doença: Critérios de Escolha e Espécies de Animais de Uso Corrente. **Acta Cir. Bras.** São Paulo, v. 19, n.1, p. 59-65, jan./feb. 2004.

⁵⁷ MARIANO, M. Animais de Laboratório - Minisuíno (Minipig) na Pesquisa Biomédica Experimental: o Minipig br1. **Acta Cir. Bras.** São Paulo, v.18, n.5, p. 387-91, sep./oct. 2003.

⁵⁸ TABUCHI, Y. et al. Endothelin Modulates L-NG-Nitroarginine-Induced Enhancement of Vasoconstriction Evoked by Norepinephrine. **J. Cardiovasc Pharmacol.** Hagerstown, v. 17, n.7, p. 203-5, 1991.

⁵⁹ AVASTIN®: bevacizumabe. Farm. Resp. Guilherme N. Ferreira, CRF-RJ 4288. Rio de Janeiro: Roche, 2013. Bula de remédio.

5 ARTIGO EM LÍNGUA PORTUGUESA

RESUMO

JÚNIOR CASTRO, C. Alterações histológicas secundárias à interrupção dos *vasa vasorum* na aorta descendente com o uso de terapia antiangiogênica: resultados em modelo suíno / Cyro Castro Júnior; orientador Prof. Dr. Adamastor Humberto Pereira - Porto Alegre, 2016.

OBJETIVO: demonstrar as alterações histológicas secundárias ao uso de bevacizumabe na aorta descendente de suínos submetida à interrupção dos *vasa vasorum*.

MATERIAIS E MÉTODOS: em doze suínos, divididos em grupos tratamento e controle (n=6 cada) foi realizada dissecação por 5cm da aorta torácica, ligadura das artérias intercostais e proteção com polivinil; o grupo tratamento recebeu uma dose endovenosa única de bevacizumabe. Após quinze dias, os animais foram sacrificados para retirada da artéria e preparo das lâminas histológicas dos grupos tratamento, controle e área não manipulada dos dois grupos. As lâminas foram analisadas com relação aos graus de angiogênese, injúria, inflamação e espessamento intimal. A análise estatística foi conduzida através da média e do desvio-padrão dos escores e as comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste de Mann-Whitney. Para obtenção de intervalos de confiança de 95% para as médias das contagens dos escores utilizou-se a distribuição de Poisson, a fim de determinar o efeito estatístico.

RESULTADOS: o bevacizumabe causou parefeitos em todos os suínos tratados, com um óbito. As variáveis analisadas, através da Escala de Magnitude para Efeito Estatístico, demonstram tendência de redução da angiogênese e da injúria e de aumento da inflamação no limite do moderado. Não ocorreu modificação do espessamento intimal entre os grupos.

CONCLUSÃO: a medicação utilizada na lesão da parede arterial induzindo hipóxia, mostrou tendência de redução da angiogênese e da injúria, mas não reduziu o processo inflamatório ou o espessamento intimal da parede arterial. O bevacizumabe mostrou toxicidade no modelo suíno.

PALAVRAS-CHAVE: Vasa vasorum. Neovascularização patológica. Inibidores da angiogênese.

INTRODUÇÃO

Os vasa vasorum (VV) adventíciais, nas artérias sadias, têm a função de nutrir o componente externo da parede arterial, enquanto a camada íntima é nutrida por difusão do oxigênio pelo lúmen. A ligadura dos ramos intercostais, que dão origem aos VV adventíciais da aorta descendente, promove uma hipóxia da parede arterial, desencadeando o processo de neo-angiogênese na tentativa de promover a nutrição adequada, porém carreando também células inflamatórias em direção à camada íntima arterial^{1, 2, 3, 4}.

Estudos sugerem que os VV e a angiogênese têm papel chave no crescimento da placa de ateroma e no remodelamento arterial e evitar esse processo pode induzir regressão das lesões ateroscleróticas^{5, 6}. Agentes antiangiogênicos demonstraram reduzir a proliferação neovascular e o

desenvolvimento da placa em modelos animais de aterosclerose, quando administrados cronicamente e em altas doses. O impacto da supressão da angiogênese sugere que a redução da expansão dos VV pode estabilizar ou reverter a progressão da doença. O desenvolvimento de agentes reguladores da angiogênese pode ter implicações terapêuticas na progressão e manifestação aguda da aterosclerose^{5, 6}.

O objetivo deste trabalho é demonstrar a alteração na resposta histológica secundária à interrupção dos VV, na aorta descendente de suínos, com o uso de terapia antiangiogênica, no intuito de reduzir a proliferação vascular na parede arterial e estabelecer se há influência no espessamento intimal, no grau de inflamação e no grau de injúria.

MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo experimental com a amostra formada por doze suínos de raça mista (*Large White x Landrace*), com 60 a 80 dias de idade e peso variando entre 20 a 30 kg. Os animais foram divididos em dois grupos, tratamento e controle, com n=6 em cada. O modelo de lesão aórtica adotado, associado com a avaliação da modificação da resposta através de terapia antiangiogênica sistêmica, não encontra semelhança na literatura estudada. A amostra foi definida com base em estudos experimentais em linha de pesquisa semelhante^{5, 7, 8}. Além da preocupação em poupar recursos animais, existem poucas publicações científicas na área para serem tomadas como base para o cálculo da amostra.

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Grupo de Pesquisa e Pós-graduação (projeto 11-0515) e conduzido na Unidade de Experimentação Animal do

Centro de Pesquisa Experimental, ambos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Todos os animais foram alojados em local apropriado e receberam dieta balanceada para a idade, sem suplementação lipídica. Os procedimentos seguiram as recomendações do *Guide for the Care and Use for Laboratory Animals* (ILAR/EUA, 1996) e os preceitos da atual legislação brasileira (Lei 11794/2008 e diretrizes do CONCEA).

O estudo foi dividido em duas fases.

1ª Fase: o grupo tratamento foi pré-medicado com cimetidina e ondansetrona para proteção gástrica e não foram utilizados anti-inflamatórios na analgesia, devido aos efeitos do bevacizumabe. Todos os animais receberam uma dose profilática do antibiótico cefalotina. A anestesia foi geral, com intubação endotraqueal, os animais foram mantidos sob ventilação mecânica com monitorização eletrocardiográfica e hemodinâmica contínua. No pós-operatório imediato, foi aplicado tramadol (2mg/kg) por via intramuscular nos suínos dos dois grupos e cetoprofeno (2mg/kg) apenas no grupo controle.

A técnica cirúrgica consistiu de lavagem prévia da pele, tricotomia e antissepsia com álcool iodado a 2%; colocação de campos estéreis; incisão de toracotomia lateral esquerda no 6º espaço intercostal esquerdo (EIC), abertura por planos com abordagem da aorta torácica; dissecação circunferencial junto à gordura periaórtica e ligadura das artérias intercostais por 5 cm distais à emergência da artéria subclávia esquerda; cobertura da área dissecada da aorta com policloreto de vinila (PVC). No grupo tratamento foi feita a aplicação de bevacizumabe 5 mg/kg EV (dose conforme protocolo para câncer colorretal metastático). Em ambos os grupos foi realizada a drenagem do tórax em aspiração contínua até o término do fechamento e aproximação dos tecidos por planos com fio de mononylon 0 e 3-0.

2ª Fase: após 15 dias, os suínos receberam preparo e anestesia semelhantes à primeira fase. A perviedade da aorta torácica foi avaliada pela presença de pulso arterial distal à área dissecada. Técnica cirúrgica também semelhante, porém, com dissecação extensa da aorta torácica permitindo a excisão dessa em área manipulada (lesão) e não manipulada pela cirurgia (sem lesão), irrigação do segmento para o estudo com solução de cloreto de sódio a 0,9% e fixação em formalina a 10%. A eutanásia foi realizada após a coleta do material para o estudo, por meio de dose letal de cloreto de potássio (solução a 50%, aproximadamente 1ml/kg), obtendo seus efeitos cardiotóxicos sob anestesia geral.

O preparo dos tecidos para a análise histológica compreendeu dois blocos de material de cada suíno, incluindo a área manipulada (lesão) e a não manipulada cirurgicamente (sem lesão) da aorta. O material foi submetido a cortes histológicos, medindo 4µm de espessura, para o preparo de lâminas histológicas na Unidade de Patologia Experimental do HCPA. As lâminas de cada segmento (manipulado e não manipulado cirurgicamente) das aortas foram coradas pela Hematoxilina e Eosina (HE), pelo método de Masson e também pelo método de Weigert – van Gieson, para destaque das fibras elásticas.

As variáveis consideradas foram a angiogênese, a injúria, a inflamação e o espessamento intimal. A avaliação desses parâmetros histológicos foi feita através da adaptação de um consenso publicado por Schwartz e Edelman⁹, já utilizado em nosso serviço⁷.

A variável angiogênese foi graduada em grau 0: ausente; grau 1: envolvendo o 1/3 externo da camada média da artéria; grau 2: envolvendo de 1/3 até 2/3 da camada média; grau 3: envolvendo mais de 2/3 da camada média.

A inflamação foi graduada em grau 0: ausência de células inflamatórias; grau 1: infiltrado celular leve no 1/3 externo da camada média; grau 2: infiltrado celular moderado de 1/3 até 2/3 externos da camada média; grau 3: infiltrado celular denso em toda a camada média.

A injúria foi graduada em grau 0: camada média preservada; grau 1: camada média desorganizada no 1/3 externo; grau 2: camada média desorganizada nos 2/3 externos; grau 3: camada média desorganizada na sua totalidade.

O espessamento intimal foi graduado como ausente, mínimo e leve de acordo com o conteúdo de células musculares lisas da camada íntima, adaptada da descrição de Suzuki et al¹⁰.

A análise estatística foi conduzida através da sumarização dos dados de escore por média e desvio-padrão. As comparações entre os grupos intervenção e controle foram realizadas pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Para obtenção de intervalos de confiança de 95% para as médias das contagens dos escores, utilizou-se a distribuição de Poisson, com o intuito de determinar o efeito estatístico e analisar através da Escala de Magnitude para Efeito Estatístico. O nível de significância adotado foi de $p \leq 0,05$. Os dados foram analisados com o programa SPSS, versão 22.0.

RESULTADOS

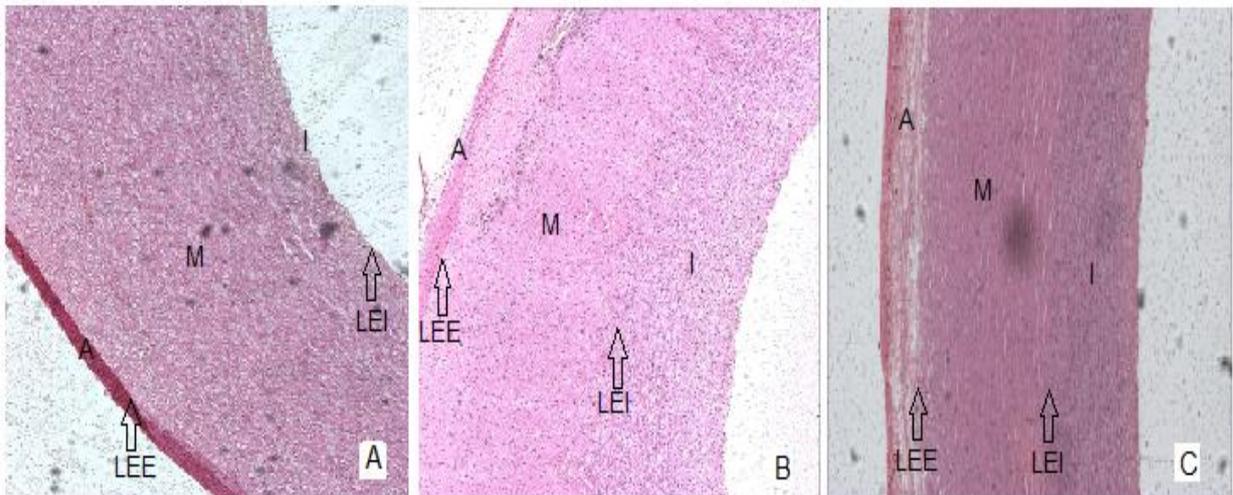
O bevacizumabe apresentou efeitos adversos em todos os suínos tratados, especialmente hipotensão, sangramento e lesões gástricas. Um animal no grupo tratamento foi excluído do estudo por óbito após a 1ª fase devido à ulcera gástrica perfurada, com peritonite.

O segmento manipulado cirurgicamente da aorta estava livre de aderências aos tecidos vizinhos, protegido pela película de polivinil. A avaliação macroscópica das peças evidenciava as áreas de manipulação cirúrgica com espessamento parietal, em relação às áreas não dissecadas da mesma artéria.

Na análise das lâminas preparadas a partir das peças onde não houve manipulação cirúrgica prévia (sem lesão), não foram encontradas alterações com relação à angiogênese, à injúria, à inflamação ou ao espessamento intimal (grau 0) (figura 1A).

Nas fotomicrografias da parede aórtica (figura 1), pode-se comparar a área não lesada (A) com os grupos controle (B) e tratamento (C), onde observa-se o espessamento intimal e a desorganização das fibras elásticas no 1/3 externo da camada média e adventícia.

Figura 1: Fotomicrografia da aorta (parcial), área não manipulada (A), áreas submetidas à manipulação cirúrgica no grupo controle (B) e tratamento (C). Coloração HE. Magnificação original 8x.



Fonte: autor.

Notação: A: camada adventícia; M: camada média; I: camada íntima; LEE: lâmina elástica externa; LEI: lâmina elástica interna.

A descrição dos achados à análise histológica das peças dos grupos controle e tratamento foi sumarizada em média e desvio-padrão dos graus de angiogênese, injúria, inflamação e espessamento intimal e podem ser vistos na tabela 1. Não

foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em nenhuma das variáveis analisadas.

Tabela 1 - Média e desvio padrão da contagem dos escores.

	GRUPO CONTROLE		GRUPO TRATAMENTO		p
	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	
ANGIOGÊNESE	2,17	0,41	1,80	0,84	0,338
INJÚRIA	2,17	0,41	2,00	0,00	0,361
INFLAMAÇÃO	1,00	0,00	1,20	0,45	0,273
ESPESSAMENTO	2,00	0,00	2,00	0,71	0,99

Notação: DP: desvio padrão; p: nível de significância estatística.

Fonte: autor.

Para a obtenção de intervalos de confiança de 95% para as médias das contagens dos escores utilizou-se a distribuição de Poisson, conforme tabela 2:

Tabela 2 - Distribuição de Poisson - média, desvio padrão e intervalo de confiança.

	GRUPO CONTROLE			GRUPO TRATAMENTO		
	MÉDIA	DP	95% IC	MÉDIA	DP	95% IC
ANGIOGÊNESE	2,17	0,15	1,89 - 2,49	1,80	0,33	1,25 - 2,59
INJÚRIA	2,17	0,15	1,89 - 2,49	2,00	0,00	2,00 - 2,00
INFLAMAÇÃO	1,00	0,00	1,00 - 1,00	1,20	0,18	0,90 - 1,61
ESPESSAMENTO	2,00	0,23	1,59 - 2,52	2,00	0,28	1,52 - 2,64

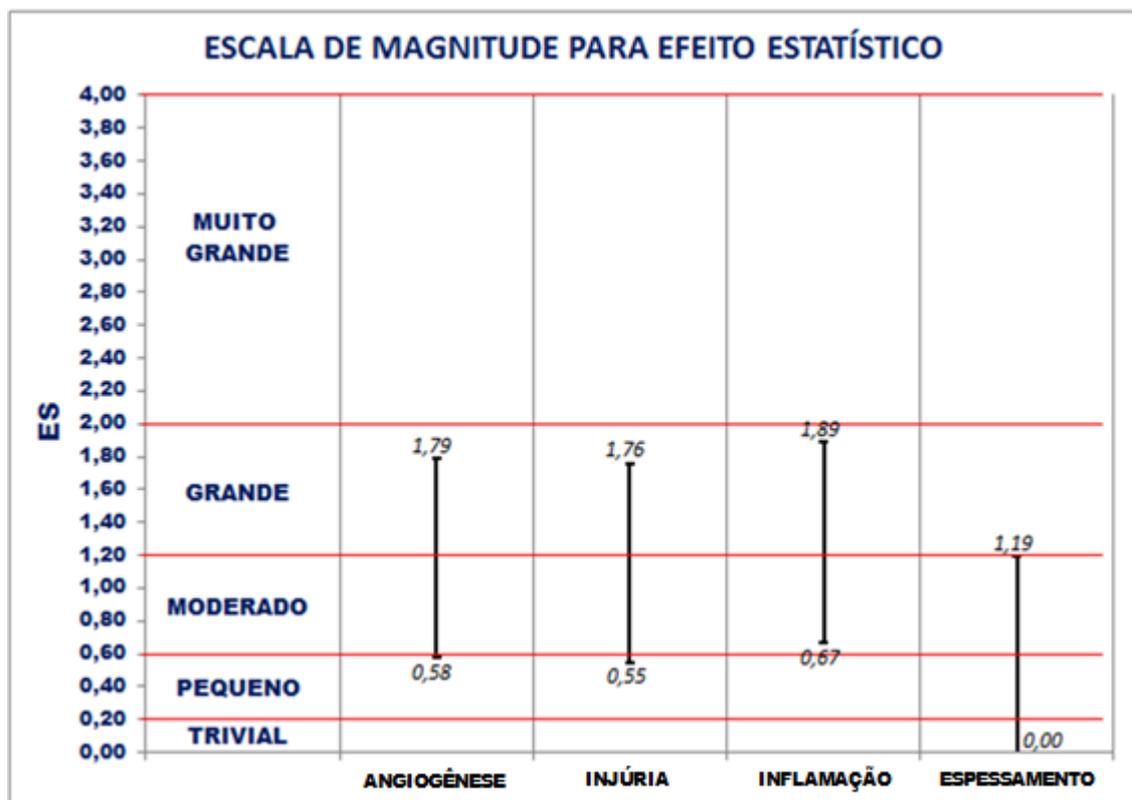
Notação: DP: desvio padrão; IC: intervalo de confiança.

Fonte: autor.

Com base nos dados encontrados através da distribuição de Poisson, calculou-se o efeito estatístico (ES) encontrado para cada variável estudada, com resultado para a angiogênese de -0,58 (-1,79 a 0,63), para a injúria de -0,55 (-1,76 a 0,66), para a inflamação de 0,67 (-0,55 a 1,89) e para o espessamento intimal de 0 (-

1,19 a 1,19), os quais analisados através da Escala de Magnitude para Efeito Estatístico¹¹, demonstraram uma tendência de efeito estatístico de redução da angiogênese e da injúria no limite do moderado, podendo atingir grande efeito e de aumento da inflamação de moderado, podendo atingir grande efeito. Com relação ao espessamento intimal, o efeito estatístico foi 0, ou seja, não houve alteração entre os grupos controle e tratamento (gráfico 1).

Gráfico 1: Escala de magnitude para efeito estatístico (ES).



Fonte: autor, ¹¹.

DISCUSSÃO

As semelhanças entre a anatomia, fisiologia e fisiopatologia dos suínos e a dos homens estão amplamente estabelecidas, principalmente no que diz respeito a aspectos ligados à anatomia cardiovascular, resposta vascular à lesão, sistema de

fibrinólise e coagulação, embasando a escolha desse animal como modelo para o estudo^{7, 12, 13}.

A lesão mecânica da artéria por si só induz a uma resposta angiogênica e espessamento intimal^{14, 15}. O espessamento intimal agravaria a hipóxia da parede arterial dificultando a nutrição das camadas mais internas da túnica média. Estudos prévios em aorta de caninos também indicam que a interrupção do fluxo nos VV produz mudanças agudas na distensibilidade e mudanças estruturais na parede aórtica, corroborando com esse conceito^{16, 17}. Angouras et al. (2000)⁸ publicaram estudo em suínos submetidos à ressecção da adventícia associada à ligadura de intercostais, recobrando a aorta com polivinil, descrevendo que, após 15 dias, a interrupção do fluxo pelos VV resultou em necrose isquêmica das porções mais externas da túnica média, com perda da arquitetura das fibras de colágeno e elastina. Fagundes et al.⁷, em estudo experimental, concluíram que a remoção da adventícia da aorta em suínos levou a alterações degenerativas da média, determinando perda da estrutura da parede aórtica.

O delineamento deste experimento não encontra semelhança com outros na literatura pois estuda os efeitos da hipóxia da parede arterial da aorta torácica, através da ligadura das artérias intercostais, sem a remoção da camada adventícia para que o trauma seja minimizado e não interfira nos achados histológicos e nos efeitos da terapia antiangiogênica administrada sistemicamente. Como os tecidos periaórticos poderiam aderir à área dissecada e contribuir na neovascularização, este fator foi controlado pelo envolvimento da aorta por membrana de PVC.

Portanto, pode-se observar que a angiogênese, a injúria, a inflamação e o espessamento intimal desenvolvem-se pronunciadamente com a ligadura de artérias intercostais, mesmo não havendo lesão direta de qualquer camada da parede

aórtica, determinando uma neoformação precoce (duas semanas) de vasos na túnica média. A hipóxia da parede foi suficiente para degradar as fibras elásticas do 1/3 externo da túnica média e provocar hiperplasia intimal em todos os espécimes, corroborando com os achados de pesquisas anteriores^{7, 16, 18, 19}.

Nos últimos anos, um número crescente de terapias antiangiogênicas estão sendo propostas para interferir na modulação da neovascularização e nas suas consequências em doenças como câncer e degeneração macular. O conhecimento dos mecanismos responsáveis pela proliferação vascular adventicial e a sua extensão para a camada íntima é necessário para o estudo de terapias antiangiogênicas aplicáveis à aterosclerose^{6, 20}.

A neovascularização é, principalmente, mediada pelo VEGF, que é um regulador potente da fisiopatologia da angiogênese. A inibição da neovascularização da placa é um alvo terapêutico em potencial. O anticorpo monoclonal recombinante específico contra VEGF, bevacizumabe, tem sido usado recentemente na forma de *stent* farmacológico para tratar reestenoses em coronárias, com segurança e mínimo crescimento neo-intimal^{6, 19, 21}.

Estudos em vivo mostram que o bloqueio da neoformação vascular pode reduzir significativamente a placa intimal²⁰. Moulton et al. (1999)²² demonstraram que os inibidores angiogênicos endostatin e TNP-470 reduziram a formação neovascular e o crescimento da placa intimal em aorta de ratos. Stefanadis et al. (2007)²³ mostraram que o uso de anticorpos específicos contra VEGF resultou em redução significativa do crescimento neovascular e espessamento neo-intimal, após 4 semanas, em coelhos com dieta aterogênica. Gossel et al. (2009)²⁴ mostraram que a inibição da neovascularização dos VV, usando talidomida em suínos com dieta rica em colesterol, reduziu significativamente o espessamento e a formação de placa

neo-intimal. Mollmark et al. (2011)²⁵ demonstraram que a atividade antiangiogênica do rPAI-123 (proteína inibidora da ativação do plasminogênio) induz colapso dos VV e reduz significativamente o colesterol e a área da placa em ratos hipercolesterolêmicos. Kampshulte et al. (2014)²⁶ conduziram um estudo experimental com ratos alimentados por *western diet*, com e sem talidomida, por 29 semanas, analisando a aorta descendente através de nano-CT, que revelou que a área da secção transversal da adventícia dos VV foi significativamente reduzida em ratos tratados com talidomida, acompanhado por uma diminuição do número total de VV nos cortes, demonstrando uma diminuição significativa da área da placa aterosclerótica. Entretanto, em nenhum dos três estudos citados acima, foi testada a ação da droga em artérias submetidas à isquemia da parede por diminuição do fluxo pelos VV, como estabelecido neste experimento.

Os conceitos fisiopatológicos de que as porções mais internas da placa de ateroma sofrem um processo isquêmico que induz neoformação vascular a partir dos VV e de que esse processo traz um maior número de células inflamatórias para a parede arterial são bem definidos na literatura ^{3, 5, 20}. O objetivo deste estudo foi testar a ação de um anticorpo monoclonal recombinante específico contra VEGF (bevacizumabe), para testar a hipótese de que o uso da terapia antiangiogênica reduziria as alterações histológicas secundárias à hipóxia, induzida pela interrupção dos VV na aorta descendente de suínos, através da avaliação da proliferação vascular, do grau de injúria, da inflamação e do espessamento intimal.

Os suínos mostraram-se muito sensíveis aos efeitos do bevacizumabe. Todos os animais do grupo tratamento necessitaram cuidados especiais no trans e pós-operatório por efeitos dessa medicação. Os seis suínos do grupo tratamento apresentaram hipotensão no momento da administração da medicação e

sangramento aumentado, sendo necessários reposição volêmica agressiva com cristaloides e coloides e, em dois casos, o uso de droga vasopressora trans-operatório.

No pós-operatório, o primeiro e o segundo suínos do grupo tratamento apresentaram vômitos, diarreia com melena, hematúria, anorexia e dor abdominal, sendo iniciado tratamento com cimetidina, sucralfato, ondansetrona e metoclopramida. Para a investigação diagnóstica, foi realizada, nesses dois animais, ecografia abdominal que evidenciou líquido livre na cavidade. O primeiro suíno evoluiu para óbito no terceiro dia pós-operatório, apesar do tratamento instituído, revelando, pela necropsia, úlcera gástrica perfurada com peritonite, sendo excluído do estudo. O segundo suíno evoluiu favoravelmente. Na data da eutanásia programada para a coleta do material, esse suíno também apresentava úlcera gástrica, à necropsia. Foi estabelecido um protocolo para a proteção gástrica pré e pós-operatório com as medicações citadas e contraindicado o uso de anti-inflamatórios, obtendo-se controle aceitável desses parefeitos no pós-operatório dos próximos quatro suínos operados nesse grupo.

A significância estatística não foi alcançada, para as variáveis analisadas, devido ao tamanho da amostra. A amostra baseou-se em estudos similares, mas o modelo utilizado neste experimento tem características singulares, sem paralelo nas publicações estudadas, portanto sem dados objetivos para o cálculo. Com base na tendência estatística encontrada neste experimento, a amostra necessária seria de dezoito suínos em cada grupo, para alcançar a significância estatística. Entretanto, a não equivalência entre a significância estatística e a sua importância para a prática clínica é bem reconhecida. Portanto, não é recomendável incorrer no erro de interpretação de que não exista a diferença entre os grupos²⁷.

Com base nos achados deste experimento, determinou-se o cálculo da magnitude do efeito estatístico¹¹ para as variáveis. Na análise dos resultados, observou-se uma tendência de redução da angiogênese e do grau de injúria à parede do vaso com o uso de bevacizumabe, com efeito estatístico próximo ao moderado. Por outro lado, foi observada uma tendência de piora quanto ao grau de inflamação com o uso do anticorpo monoclonal, também com efeito estatístico moderado, o que contraria os achados de alguns estudos, de que a terapia antiangiogênica diminuiria essa resposta e, por conseguinte, retardaria ou diminuiria o processo aterosclerótico^{4, 14, 20}.

Entretanto, não foi observada modificação em relação ao espessamento intimal nos dois grupos estudados, apesar das diferenças relatadas nas outras variáveis, mostrando, para essa variável, um efeito estatístico igual a zero (gráfico 1). Portanto, a angiogênese, induzida pela hipóxia da parede, na fase inicial, parece ser um fenômeno secundário neste processo e, portanto, não tendo influência em reduzir o espessamento intimal. Estes achados levantam a questão que talvez o potencial de estabilizar ou reduzir as placas complexas, induzido por algumas substâncias antiangiogênicas, limite-se apenas à capacidade de diminuir o risco de hemorragia intraplaca não tendo influência em diminuir o grau de inflamação ou da hiperplasia intimal.

O papel da neovascularização na resposta à hipóxia da parede arterial ainda não tem uma definição conclusiva, ao contrário, é um processo intrincado que necessita de mais estudos sobre os efeitos fisiológicos em vários estágios da lesão arterial.

CONCLUSÃO

Neste estudo, o uso do bevacizumabe sistêmico em modelo suíno de lesão da parede da aorta, submetida à hipóxia, apresentou uma tendência à redução do grau de angiogênese e de injúria na parede do vaso. Entretanto, não reduziu a inflamação ou o espessamento intimal da parede arterial com a terapia antiangiogênica aplicada. Finalmente, o bevacizumabe mostrou toxicidade neste modelo animal, evidenciada por alterações hemodinâmicas, da crase sanguínea e lesões gástricas graves, com perfuração de víscera, necessitando cuidados trans e pós-operatórios intensivos.

FONTES DE FINANCIAMENTO

Projeto realizado com recursos do FIPE e do próprio autor, sem conflito de interesses.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

¹ PEREIRA, A.H. Ruptura dos Vasa Vasorum e Hematoma Intramural da Aorta: Um Paradigma em Mudança. **J Vasc Bras**, Salvador, v. 9, n. 2, p. 57-60, jun. 2010.

² MORENO, P.R. et al. Neovascularization in Human Atherosclerosis. **Circulation**, Hagerstown, v. 113, n. 18, p. 2245-52, may. 2006.

³ MORENO, P.R. et al. Plaque Neovascularization Is Increased in Ruptured Atherosclerotic Lesions of Human Aorta. Implications for Plaque Vulnerability. **Circulation**, Hagerstown, v. 110, n. 14; p. 2032-8, oct. 2004.

⁴ MOULTON, K. S. et al. Inhibition of Plaque Neovascularization Reduces Macrophage Accumulation and Progression of Advanced Atherosclerosis. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 100, n. 8, p. 4736–41, 15 apr. 2003.

⁵ DRINANE, M. et al. The Anti-Angiogenic Activity of rPAI-1₂₃ Inhibits Vasa Vasorum and Growth of Atherosclerotic Plaque. **Circ Res**, Baltimore, v. 104, n. 3, p. 337-45, 13 feb. 2009.

⁶ JUNYAN XU; XIAOTONG LU; GUO-PING SHI. Vasa Vasorum in Atherosclerosis and Clinical Significance. **Int J Mol Sci**, Basel, v. 16, n. 5, p. 11574-608, may. 2015.

⁷ FAGUNDES, A. et al. Efeitos da Remoção da Túnica Adventícia da Aorta Descendente em Suínos. **Rev Col Bras Cir**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 2, p. 133-8, mar./abr. 2012.

⁸ ANGOURAS, D. et al. Effect of Impaired Vasa Vasorum Flow on the Structure and Mechanics of the Thoracic Aorta: Implications for the Pathogenesis of Aortic Dissection. **Eur J Cardiothorac Surg**, Kidlington, v. 17, p. 468-73, apr. 2000.

⁹ SCHWARTZ, R.S.; EDELMAN, E.R. Drug-Eluting Stents in Preclinical Studies: Recommended Evaluation from a Consensus Group. **Circulation**. v. 106, n. 14, p. 1867-73, 2002.

¹⁰ SUZUKI T. et al. Stent-based delivery of sirolimus reduces neointimal formation in a porcine coronary model. **Circulation**. v. 104, n. 10, p. 1188-93, 2001.

- ¹¹ HOPKINS, W.G. [Internet]. A New View of Statistics – A Scale of Magnitudes for Effect Statistics. 2002. Available from: <<http://www.sportsci.org/resource/stats/effectmag.html>>. Cited jan. 06, 2016.
- ¹² CASTRO, C. J.; PEREIRA, A. H.; PASA, M. B. Morphometric Analysis of the Intimal Reaction After Stent Implantation in Iliac Arteries Submitted to Angioplasty in Pigs. **Acta Cir Bras**, São Paulo, v. 21, n. 3, p. 139-43, may. 2006.
- ¹³ MARIANO, M. Animais de Laboratório - Minisuíno (Minipig) na Pesquisa Biomédica Experimental: o Minipig br1. **Acta Cir. Bras.** São Paulo, v.18, n.5, p. 387-91, sep./oct. 2003.
- ¹⁴ KHURANA, R. et al. Angiogenesis-Dependent and Independent Phases of Intimal Hyperplasia. **Circulation**, Hagerstown, v. 110, n. 16, p. 2436-43, 19 oct. 2004.
- ¹⁵ RITMAN, E.L.; LERMANN, A. The Dynamic Vasa Vasorum. **Cardiovasc Res**, Oxford, v. 75, n. 4, p. 649-58, sep. 2007.
- ¹⁶ MULLIGAN-KEHOE, M.J. Anti-angiogenic Activity of rPAI-123 and Vasa Vasorum Regression. **Trends Cardiovasc Med**, New York, v. 23, n. 4, p. 114-20, may. 2013.
- ¹⁷ SCOTLAND, R.S.; VALLANCE, P.J.; AHLUWALIA, A. Endogenous Factors Involved in Regulation of Tone of Arterial Vasa Vasorum: Implications for Conduit Vessel Physiology. **Cardiovasc Res**, Oxford, v. 46, n 3; p. 403-11, jun. 2000.
- ¹⁸ FISCHER, E.I.C. La Adventicia: Estado Actual Del Conocimiento. **Rev Argent Cardiol**, Buenos Aires, v. 76, n. 1, p. 58-63, ene./feb. 2008.
- ¹⁹ STEFANADIS, C. et al. First-in-Man Study with Bevacizumab-Eluting Stent: a New Approach for the Inhibition of Atheromatic Plaque Neovascularization. **EuroIntervention**, Toulouse, v. 3, n. 4, p. 460-4, jan. 2008.
- ²⁰ SLEVIN, M.; KRUPINSKI, J.; BADIMON, L. Controlling the Angiogenic Switch in Developing Atherosclerotic Plaques: Possible Targets for Therapeutic Intervention. **J Angiogenes Res**, London, v. 1, n. 1, p. 4, sep. 2009.
- ²¹ STEFANADIS, C. et al. Avastin-Eluting Stent: Long-Term Angiographic and Clinical Follow Up. **Hellenic J Cardiol**, Athens, v. 49, n. 3, p. 188-90, may./jun. 2008.

- ²² MOULTON, K. S. et al. Angiogenesis Inhibitors Endostatin or TNP-470 Reduce Intimal Neovascularization and Plaque Growth in Apolipoprotein E-Deficient Mice. **Circulation**, Hagerstown, v. 99, n. 13, p. 1726–32, apr. 1999.
- ²³ STEFANADIS, C. et al. Inhibition of Plaque Neovascularization and Intimal Hyperplasia by Specific Targeting Vascular Endothelial Growth Factor with Bevacizumab-Eluting Stent: an Experimental Study. **Atherosclerosis**, Limerick, v. 195, n. 2, p. 269-76, dec. 2007.
- ²⁴ GOSSL, M. et al. Prevention of Vasa Vasorum Neovascularization Attenuates Early Neointima Formation in Experimental Hypercholesterolemia. **Basic Res Cardiol**, Darmstadt, v. 104, n. 6, p. 695-706, nov. 2009.
- ²⁵ MOLLMARK, J. et al. Antiangiogenic Activity of rPAI-123 Promotes Vasa Vasorum Regression in Hypercholesterolemic Mice Through a Plasmin-Dependent Mechanism. **Circ Res**, Baltimore, v. 108, n. 12, p. 1419–28, 10 jun. 2011.
- ²⁶ KAMPSCHULTE, M. et al. Thalidomide Influences Atherogenesis in Aortas of ApoE(-)/LDLR(-) Double Knockout Mice: a Nano-CT Study. **Int J Cardiovasc Imaging**, Boston, v. 30, n. 4, p. 795-802, apr. 2014.
- ²⁷ ALTMAN, D.G.; BLAND, J.M. Absence of Evidence is not Evidence of Absence. **BMJ**. 311:485, aug. 19, 1995.

6 ARTIGO EM LÍNGUA INGLESA

ABSTRACT

JÚNIOR CASTRO, C. Histological changes secondary to interruption of vasa vasorum flow in the descending aorta with the use of anti-angiogenic therapy: results in a porcine model / Cyro Castro Júnior; advisor Prof. Dr. Adamastor Humberto Pereira - Porto Alegre, 2016.

OBJECTIVE: To demonstrate histological changes secondary to the use of bevacizumab in the descending aorta of pigs after interruption of vasa vasorum flow.

METHODS: Twelve pigs were divided into control and treatment groups (n = 6 each). It was performed a 5-cm dissection of the thoracic aorta, ligation of the intercostal arteries and protection with polyvinyl chloride. Pigs in the treatment group received a single intravenous dose of bevacizumab. After 15 days, the animals were euthanized and the aorta removed. Histological slides were prepared for control and treatment groups and for the non-surgically manipulated part of the aorta in both groups. The slides were analyzed for the degree of angiogenesis, injury, inflammation, and intimal thickening. Data were expressed as mean (SD) of scores and groups were compared using the Mann-Whitney test. The Poisson distribution was used to calculate 95% confidence intervals for the mean scores in order to determine effect statistics.

RESULTS: Bevacizumab had adverse effects on all treated pigs, leading to one death. The analysis using a scale of magnitudes for effect statistics showed a trend toward a decrease in angiogenesis and injury and an increase in inflammation for moderate effects. There was no change in intimal thickening in either group.

CONCLUSION: The medication used for arterial wall injury inducing hypoxia showed a trend toward reduced angiogenesis and injury, but with no reduction in the inflammatory process or intimal thickening of the arterial wall. Bevacizumab showed toxicity in the porcine model.

KEYWORDS: Vasa Vasorum. Neovascularization, Pathologic. Angiogenesis Inhibitors.

INTRODUCTION

The adventitial vasa vasorum (VV) of healthy arteries are responsible for nourishing the outer component of the vessel wall, while the intima is fed by oxygen diffusion from the lumen. Ligation of the intercostal branches, from which the adventitial VV to the descending thoracic aorta arise, promotes induced arterial wall hypoxia, triggering the process of neoangiogenesis in an attempt to promote proper nutrition while also triggering the migration of inflammatory cells toward the arterial intima¹⁻⁴.

The VV and angiogenesis have been suggested to play a key role in atherosclerotic plaque growth and arterial remodeling, and thus prevention of this process may induce regression of atherosclerotic lesions. Antiangiogenic agents have been shown to reduce neovascular proliferation and plaque development in animal models of atherosclerosis when administered chronically at high doses. The impact of angiogenesis inhibition suggests that suppression of VV expansion may stabilize or reverse disease progression. The development of angiogenesis regulators may have therapeutic implications in the acute onset and progression of atherosclerosis⁵⁻⁶.

The objectives of the present study were to demonstrate changes in histological response secondary to interruption of VV flow in the descending aorta of pigs with the use of antiangiogenic therapy aiming to reduce vascular proliferation in the aortic wall and to determine whether there is an influence on intimal thickening, degree of inflammation, and degree of injury.

MATERIALS AND METHODS

An experimental study was conducted with 12 crossbred pigs (Large White × Landrace) aged 60 to 80 days and weighing 20 to 30 kg each. The animals were randomly divided into two groups, treatment and control (n = 6 each). The model of aortic wall injury adopted in this study, associated with evaluation of response change through systemic antiangiogenic therapy, has no similar examples in the literature reviewed. The sample was defined based on experimental studies in the same line of research^{5, 7, 8}. In addition to the concern about saving animal resources, there are few scientific publications in the area to be used as a basis for sample size calculation.

All experimental procedures were conducted in the Animal Experimentation Unit at the Experimental Research Center of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), and the study was approved by the Institutional Ethics Committee (protocol no. 11-0515). All animals were housed in a proper unit and received the same balanced age-appropriate diet, without lipid supplementation. Animal handling and experimentation followed international standards and guidelines for the care and use of laboratory animals and the Brazilian ethical principles of animal experimentation.

All efforts were made to minimize pain and discomfort, as well as to use only the minimum number of animals required to produce reliable scientific data.

The study was conducted in two phases.

Phase 1. Pigs in the treatment group were premedicated with cimetidine and ondansetron for gastric protection. No anti-inflammatory drugs were used for analgesia due to the adverse effects of bevacizumab. All animals received single-dose antibiotic prophylaxis (cephalothin). The procedures were performed under general anesthesia and endotracheal intubation. The animals were maintained on mechanical ventilation under continuous hemodynamic and electrocardiographic monitoring. In the immediate postoperative period, tramadol (2 mg/kg) was administered intramuscularly in pigs in the two groups and ketoprofen (2 mg/kg) was administered only in controls.

Before surgery, the incision site was washed, shaved and cleaned with iodine alcohol 2%. A left lateral thoracotomy incision was made in the 6th left intercostal space, with dissection by planes to the thoracic aorta. After circumferential dissection of the peri-aortic fat, the intercostal arteries were ligated along a segment of about 5 cm distal to the emergence of the left subclavian artery and the dissected aortic area was coated with polyvinyl chloride (PVC). Pigs in the treatment group received a single intravenous dose of bevacizumab (5 mg/kg, according to the protocol for metastatic colorectal cancer). In both groups, chest drainage was performed with continuous suction until the end of the procedure. The incision was closed by planes with 0 and 3-0 monofilament nylon suture.

Phase 2. After 15 days, all pigs were prepared and anesthetized following the same protocol used for the first phase. Patency of the thoracic aorta was determined

by the presence of a palpable arterial pulse distal to the dissected area. The surgical technique was similar to that performed in Phase 1, with the inclusion of extensive dissection of the thoracic aorta allowing excision of the aortic segment from both surgically manipulated (injured) and non-surgically manipulated (uninjured) areas. The excised segments were irrigated with sodium chloride 0.9%, fixed in 10% formalin and embedded in paraffin for histological analysis.

After specimen collection, the pigs were euthanized under general anesthesia with a lethal dose of potassium chloride 50% (1 mL/kg), injected intravenously, which exerts cardiotoxic effects that quickly cause cardiac arrest.

For histological analysis, two paraffin blocks were prepared for each pig, one including the surgically manipulated (injured) and the other including the non-surgically manipulated (uninjured) part of the aorta. From each paraffin block, 4- μ m-thick sections were cut and mounted on glass slides. All slides were stained with hematoxylin and eosin (HE), Masson's trichrome stain and Weigert-van Gieson stain for analysis of elastic fibers.

The following variables were analyzed: angiogenesis, injury, inflammation, and intimal thickening. The degree of angiogenesis, injury and inflammation was analyzed based on criteria adapted from the consensus published by Schwartz and Edelman⁹, which has been used in our unit⁷, and scored on a scale from 0 to 3.

Angiogenesis: (0) absent; (1) involving the outer third of the media; (2) involving one to two-thirds of the media; and (3) involving more than two-thirds of the media.

Injury: (0) preserved media; (1) tissue disruption in the outer third of the media; (2) tissue disruption in the outer two-thirds of the media; and (3) total media tissue disruption.

Inflammation: (0) absence of inflammatory cells; (1) mild inflammatory infiltrate in the outer third of the media; (2) moderate inflammatory infiltrate involving one to two-thirds of the media; and (3) dense inflammatory infiltrate in the entire media.

Intimal thickening was graded as absent, minimal or mild based on the amount of smooth muscle cells in the intima (adapted from Suzuki et al¹⁰).

For all variables, data are expressed as mean (SD). Control and treatment groups were compared using the nonparametric Mann-Whitney test. The Poisson distribution was used to calculate 95% confidence intervals (95%CI) for the mean scores in order to determine effect statistics using a scale of magnitudes. The level of significance was set at $p \leq 0.05$. Statistical analysis was performed using SPSS, version 22.0.

RESULTS

Bevacizumab had adverse effects on all treated pigs, especially hypotension, bleeding, and gastric lesions. One animal in the treatment group was excluded from the study due to death after Phase 1 caused by a perforated gastric ulcer and peritonitis.

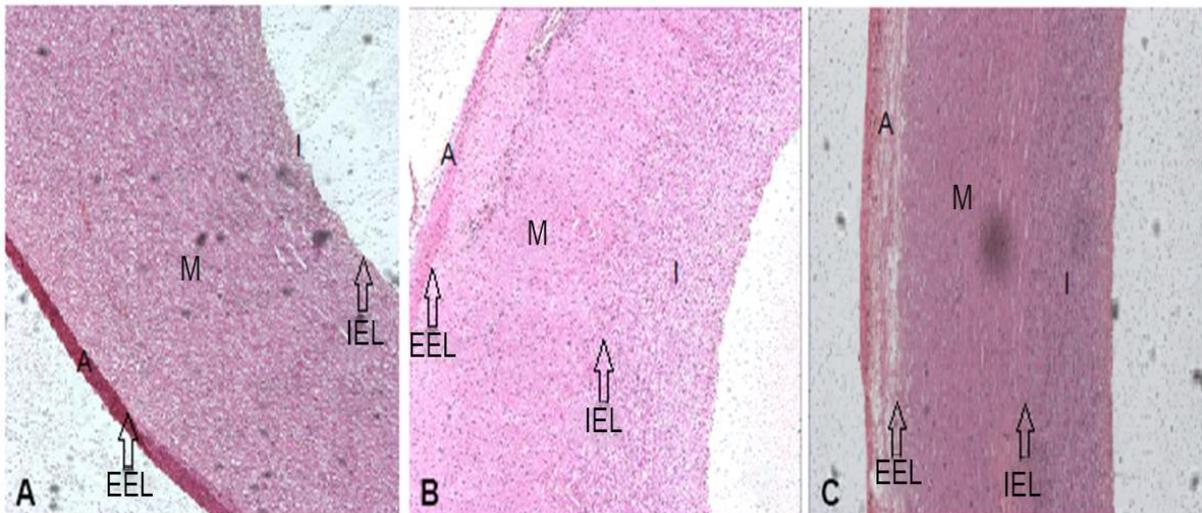
The injured aortic segment was free of adhesions to the surrounding tissue, protected by the PVC membrane. Wall thickening of the surgically manipulated parts

of the aorta was macroscopically evident when compared to the non-surgically manipulated parts of the same aorta.

In the uninjured specimens, there were no changes regarding angiogenesis, injury, inflammation, or intimal thickening (score of 0).

In the photomicrographs of the aortic wall, when comparing the uninjured area (Figure 1A) with injured areas in the control (Figure 1B) and treatment (Figure 1C) groups, intimal thickening and disruption of elastic fibers were observed in the outer third of the media and adventitia in the control and treatment groups.

Figure 1. Photomicrograph of the aorta (partial). Non-surgically manipulated area (1A) and surgically manipulated areas in the control (1B) and treatment (1C) groups. Staining: hematoxylin and eosin. Original magnification: 8x.



Notation: A: adventitia ; M: middle layer; I: intima; EEL: external elastic lamina; IEL: internal elastic lamina.

Source: author.

The histological findings regarding angiogenesis, injury, inflammation, and intimal thickening in surgically manipulated specimens of bevacizumab-treated and control animals are shown in Table 1. There were no significant differences between control and treatment groups in any of the histological parameters analyzed.

Table 1 – Mean, standard deviation, p.

	CONTROL GROUP		TREATMENT GROUP		p
	MEAN	SD	MEAN	SD	
ANGIOGENESIS	2,17	0,41	1,80	0,84	0,338
INJURY	2,17	0,41	2,00	0,00	0,336
INFLAMMATION	1,00	0,00	1,20	0,45	0,273
THICKENING	2,00	0,00	2,00	0,71	0,99

Notation: SD: standard deviation; p: level of statistical significance.
Source: author.

The results obtained from the Poisson distribution are shown in Table 2.

Table 2 – Poisson Distribution - mean, standard deviation and confidence interval.

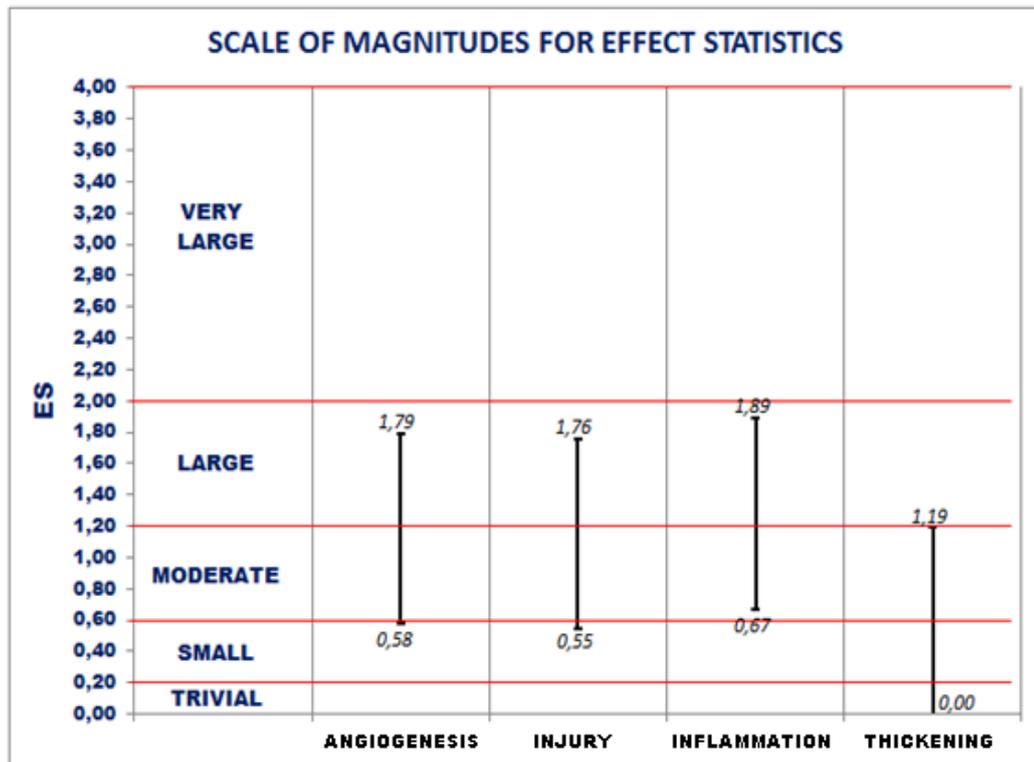
	CONTROL GROUP			TREATMENT GROUP		
	MEAN	SD	95% CI	MEAN	SD	95% CI
ANGIOGENESIS	2.17	0.15	1.89 - 2.49	1.80	0.33	1.25 - 2.59
INJURY	2.17	0.15	1.89 - 2.49	2.00	0.00	2.00 - 2.00
INFLAMMATION	1.00	0.00	1.00 - 1.00	1.20	0.18	0.90 - 1.61
THICKENING	2.00	0.23	1.59 - 2.52	2.00	0.28	1.52 - 2.64

Notation: SD: standard deviation; CI: confidence interval.
Source: author.

Based on data obtained from the Poisson distribution, effect statistics was calculated for each variable: -0.58 (-1.79 to 0.63) for angiogenesis; -0.55 (-1.76 to 0.66) for injury; 0.67 (-0.55 to 1.89) for inflammation; and 0 (-1.19 to 1.19) for intimal thickening. The analysis using the Scale of Magnitudes for Effect Statistics¹¹ showed a trend toward a decrease in angiogenesis and injury and an increase in

inflammation for moderate to large effects, but there was no effect statistic for intimal thickening (Figure 2).

Figure 2: Scale of magnitudes for effect statistics (ES).



Source: author, ¹¹.

DISCUSSION

The similarities between pigs and humans regarding their anatomy, physiology, and pathophysiology are widely established, particularly with regard to the cardiovascular anatomy, vascular response to injury, and clotting and fibrinolytic system, thus supporting the choice of pigs as the experimental animal model for this study^{7, 12, 13}.

The mechanical injury to the artery by itself induces an angiogenic response and intimal thickening^{14, 15}. Intimal thickening would worsen arterial wall hypoxia,

hindering the supply of nutrients to the inner layers of the tunica media. Previous studies in the aorta of dogs also indicate that interruption of VV flow produces acute changes in distensibility and structural changes in the aortic wall, supporting this concept^{16, 17}. Angouras et al.⁸, in a study in pigs subjected to resection of the adventitia associated with intercostal artery ligation and coating of the aorta with PVC, reported that, after 15 days, interruption of VV flow resulted in ischemic necrosis of the outer layers of the tunica media, with loss of elastin and collagen fiber architecture. Fagundes et al.⁷, in an experimental study in pigs, concluded that removal of the aortic adventitia led to degenerative changes in the media, resulting in loss of the aortic wall structure.

This experimental design, differently from others described in the literature, investigates the effects of arterial wall hypoxia of the thoracic aorta by ligating the intercostal arteries without removing the adventitia so that injury is minimized and does not interfere with histological findings and the effects of systemically administered antiangiogenic therapy. Because peri-aortic tissue may adhere to the dissected area and contribute to neovascularization, this factor was controlled by coating the aorta with a PVC membrane.

Therefore, we could observe that angiogenesis, injury, inflammation and intimal thickening showed a marked development after intercostal artery ligation even without direct injury to any layer of the aortic wall, leading to early formation (2 weeks) of new vessels in the tunica media. Arterial wall hypoxia was sufficient to degrade the elastic fibers in the outer third of the tunica media in all specimens, which is consistent with previous findings^{7, 16, 18, 19}.

In recent years, an increasing number of antiangiogenic therapies have been proposed aiming to interfere with the modulation of neovascularization and its

consequences for diseases such as cancer and macular degeneration. Knowledge of the mechanisms responsible for vascular adventitial proliferation and their extension into the intima is required for the study of antiangiogenic therapies applicable to atherosclerosis^{6, 20}.

Neovascularization is mainly mediated by VEGF, which is a potent regulator of the pathophysiology of angiogenesis. Inhibition of plaque neovascularization is a potential therapeutic target. Bevacizumab, a recombinant monoclonal antibody against VEGF, has been used recently in the form drug-eluting stents to treat restenosis in coronary arteries with safety and minimal neointimal hyperplasia^{6, 19, 21}.

In vivo studies have shown that blocking the formation of new vessels can significantly reduce intimal plaque size²⁰. Moulton et al.²² demonstrated that two angiogenesis inhibitors, endostatin and TNP-470, reduced the formation of new vessels and intimal plaque growth in the aorta of mice. Stefanadis et al.²³ showed that the use of antibodies specific for VEGF resulted in a significant reduction in neovascular growth and neointimal thickening after 4 weeks in rabbits on an atherogenic diet. Gossl et al.²⁴ reported that inhibition of VV neovascularization using thalidomide in pigs on a high-cholesterol diet significantly reduced neointimal thickening and plaque development. Mollmark et al.²⁵ demonstrated that the antiangiogenic activity of rPAI-123 (a truncated plasminogen activator inhibitor-1 protein) induces VV collapse and significantly reduces cholesterol and plaque size in hypercholesterolemic mice. Kampshulte et al.²⁶ conducted an experimental study in mice fed a western diet with and without thalidomide for 29 weeks, using nano-CT for evaluation of the descending aortas, and showed that the cross-sectional area of the adventitial VV was significantly decreased in mice treated with thalidomide, accompanied by a decrease in the total number of VV per cross-sectional image,

demonstrating a significant reduction in atherosclerotic plaque area. However, none of the studies mentioned above tested the action of the drug on arteries subjected to ischemia of the wall by decreased VV flow as established in this experiment.

The pathophysiological concepts that the inner layers of the atherosclerotic plaque undergo a process of ischemia, which induces the formation of new vessels from the VV, and that this process induces the influx of a greater number of inflammatory cells into the arterial wall are well defined in the literature^{3, 5, 20}. The purpose of this study was to investigate the action of a recombinant monoclonal antibody against VEGF (bevacizumab) and test the hypothesis that the use of antiangiogenic therapy would reduce histological changes secondary to hypoxia induced by interruption of VV flow in the descending aorta of pigs by assessing vascular proliferation and the degree of injury, inflammation, and intimal thickening.

The pigs were found to be very sensitive to the adverse effects of bevacizumab. All animals in the treatment group required special care intra- and postoperatively for the adverse effects of this medication. All six pigs in the treatment group showed hypotension during drug administration and increased bleeding, requiring aggressive fluid resuscitation with crystalloids and colloids and, in two cases, intraoperative vasopressor use.

Postoperatively, the first and second pigs in the treatment group had vomiting, diarrhea with melena, hematuria, anorexia, and abdominal pain, and treatment was started with cimetidine, sucralfate, ondansetron, and metoclopramide. Abdominal ultrasound showed free fluid in the cavity. The first pig died on postoperative day 3 despite treatment, and necropsy revealed a perforated gastric ulcer with peritonitis, this animal was excluded from the study. The second pig progressed favorably. At the time of euthanasia, which was the date scheduled for specimen collection, this

pig also showed a gastric ulcer at necropsy. A protocol for gastric protection with pre- and postoperative administration of the above-mentioned drugs was established and the use of anti-inflammatory drugs was contraindicated, achieving acceptable control of these postoperative adverse effects in the next four pigs operated on in this group.

Statistical significance, for the variables analyzed, was not reached due to the sample size. Samples size calculation was based on studies on the same topic, but the experimental model used in the present study has unique features and no parallel in the literature; therefore, there are no objective data to serve as a basis for calculation. Based on the statistical trend observed in this study, a sample of 18 pigs per group would be required to reach statistical significance. However, the non-equivalence between statistical significance and clinical importance is well recognized. A note of caution is therefore in order not to make the error of interpretation that there is no difference between groups²⁷.

Based on the present findings, the magnitude of the effect statistics¹¹ was determined for each variable. The analysis of the results showed a trend toward a reduction in angiogenesis and in the degree of injury to the vessel wall with the use of bevacizumab, with statistical effect close to moderate. Conversely, there was a trend toward worsening of the degree of inflammation with the use of this monoclonal antibody, also with a moderate statistical effect, which is in contrast to the findings of some studies that antiangiogenic therapy would reduce this response and, consequently, delay or reduce the atherosclerotic process^{4, 14, 20}.

However, there was no change in intimal thickening in either group despite the differences reported in other variables, with a statistical effect equal to zero for this variable (Figure 2). Therefore, angiogenesis induced by arterial wall hypoxia, at an early stage, appears to be a secondary phenomenon in this process and thus unable

to reduce intimal thickening. These findings raise the question that, perhaps, the potential to stabilize or reduce complex plaques induced by anti-angiogenic agents is limited only to the ability to reduce the risk of intraplaque hemorrhage, showing no influence on reducing the degree of inflammation or intimal hyperplasia.

The role of neovascularization in the response to arterial wall hypoxia still lacks a conclusive definition. Rather, it is an intricate process that requires further study of the physiological effects at different stages of arterial injury.

CONCLUSION

In this study, systemic bevacizumab use in a porcine model of aortic wall injury, subjected to hypoxia, showed a trend toward reduced angiogenesis and vessel wall injury. However, there was no reduction in inflammation or intimal thickening of the arterial wall with the antiangiogenic therapy applied. Finally, bevacizumab showed toxicity in this animal model as evidenced by hemodynamic changes, blood dyscrasia, and severe gastric lesions, with visceral perforation requiring intra- and postoperative intensive care.

FINANCING SOURCE

Project carried out with FIPE resources and the author himself, no conflict of interest.

REFERENCES

- ¹ PEREIRA, A.H. Ruptura dos Vasa Vasorum e Hematoma Intramural da Aorta: Um Paradigma em Mudança. **J Vasc Bras**, Salvador, v. 9, n. 2, p. 57-60, jun. 2010.
- ² MORENO, P.R. et al. Neovascularization in Human Atherosclerosis. **Circulation**, Hagerstown, v. 113, n. 18, p. 2245-52, may. 2006.
- ³ MORENO, P.R. et al. Plaque Neovascularization Is Increased in Ruptured Atherosclerotic Lesions of Human Aorta. Implications for Plaque Vulnerability. **Circulation**, Hagerstown, v. 110, n. 14; p. 2032-8, oct. 2004.
- ⁴ MOULTON, K. S. et al. Inhibition of Plaque Neovascularization Reduces Macrophage Accumulation and Progression of Advanced Atherosclerosis. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 100. n. 8, p. 4736–41, 15 apr. 2003.
- ⁵ DRINANE, M. et al. The Anti-Angiogenic Activity of rPAI-1₂₃ Inhibits Vasa Vasorum and Growth of Atherosclerotic Plaque. **Circ Res**, Baltimore, v. 104, n. 3, p. 337-45, 13 feb. 2009.
- ⁶ JUNYAN XU; XIAOTONG LU; GUO-PING SHI. Vasa Vasorum in Atherosclerosis and Clinical Significance. **Int J Mol Sci**, Basel, v. 16, n. 5, p. 11574-608, may. 2015.
- ⁷ FAGUNDES, A. et al. Efeitos da Remoção da Túnica Adventícia da Aorta Descendente em Suínos. **Rev Col Bras Cir**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 2, p. 133-8, mar./abr. 2012.
- ⁸ ANGOURAS, D. et al. Effect of Impaired Vasa Vasorum Flow on the Structure and Mechanics of the Thoracic Aorta: Implications for the Pathogenesis of Aortic Dissection. **Eur J Cardiothorac Surg**, Kidlington, v. 17, p. 468-73, apr. 2000.
- ⁹ SCHWARTZ, R.S.; EDELMAN, E.R. Drug-Eluting Stents in Preclinical Studies: Recommended Evaluation from a Consensus Group. **Circulation**. v. 106, n. 14, p. 1867-73, 2002.
- ¹⁰ SUZUKI T. et al. Stent-based delivery of sirolimus reduces neointimal formation in a porcine coronary model. **Circulation**. v. 104, n. 10, p. 1188-93, 2001.

- ¹¹ HOPKINS, W.G. [Internet]. A New View of Statistics – A Scale of Magnitudes for Effect Statistics. 2002. Available from: <<http://www.sportsci.org/resource/stats/effectmag.html>>. Cited jan. 06, 2016.
- ¹² CASTRO, C. J.; PEREIRA, A. H.; PASA, M. B. Morphometric Analysis of the Intimal Reaction After Stent Implantation in Iliac Arteries Submitted to Angioplasty in Pigs. **Acta Cir Bras**, São Paulo, v. 21, n. 3, p. 139-43, may. 2006.
- ¹³ MARIANO, M. Animais de Laboratório - Minisuíno (Minipig) na Pesquisa Biomédica Experimental: o Minipig br1. **Acta Cir. Bras.** São Paulo, v.18, n.5, p. 387-91, sep./oct. 2003.
- ¹⁴ KHURANA, R. et al. Angiogenesis-Dependent and Independent Phases of Intimal Hyperplasia. **Circulation**, Hagerstown, v. 110, n. 16, p. 2436-43, 19 oct. 2004.
- ¹⁵ RITMAN, E.L.; LERMANN, A. The Dynamic Vasa Vasorum. **Cardiovasc Res**, Oxford, v. 75, n. 4, p. 649-58, sep. 2007.
- ¹⁶ MULLIGAN-KEHOE, M.J. Anti-angiogenic Activity of rPAI-123 and Vasa Vasorum Regression. **Trends Cardiovasc Med**, New York, v. 23, n. 4, p. 114-20, may. 2013.
- ¹⁷ SCOTLAND, R.S.; VALLANCE, P.J.; AHLUWALIA, A. Endogenous Factors Involved in Regulation of Tone of Arterial Vasa Vasorum: Implications for Conduit Vessel Physiology. **Cardiovasc Res**, Oxford, v. 46, n 3; p. 403-11, jun. 2000.
- ¹⁸ FISCHER, E.I.C. La Adventicia: Estado Actual Del Conocimiento. **Rev Argent Cardiol**, Buenos Aires, v. 76, n. 1, p. 58-63, ene./feb. 2008.
- ¹⁹ STEFANADIS, C. et al. First-in-Man Study with Bevacizumab-Eluting Stent: a New Approach for the Inhibition of Atheromatic Plaque Neovascularization. **EuroIntervention**, Toulouse, v. 3, n. 4, p. 460-4, jan. 2008.
- ²⁰ SLEVIN, M.; KRUPINSKI, J.; BADIMON, L. Controlling the Angiogenic Switch in Developing Atherosclerotic Plaques: Possible Targets for Therapeutic Intervention. **J Angiogenes Res**, London, v. 1, n. 1, p. 4, sep. 2009.
- ²¹ STEFANADIS, C. et al. Avastin-Eluting Stent: Long-Term Angiographic and Clinical Follow Up. **Hellenic J Cardiol**, Athens, v. 49, n. 3, p. 188-90, may./jun. 2008.

- ²² MOULTON, K. S. et al. Angiogenesis Inhibitors Endostatin or TNP-470 Reduce Intimal Neovascularization and Plaque Growth in Apolipoprotein E-Deficient Mice. **Circulation**, Hagerstown, v. 99, n. 13, p. 1726–32, apr. 1999.
- ²³ STEFANADIS, C. et al. Inhibition of Plaque Neovascularization and Intimal Hyperplasia by Specific Targeting Vascular Endothelial Growth Factor with Bevacizumab-Eluting Stent: an Experimental Study. **Atherosclerosis**, Limerick, v. 195, n. 2, p. 269-76, dec. 2007.
- ²⁴ GOSSL, M. et al. Prevention of Vasa Vasorum Neovascularization Attenuates Early Neointima Formation in Experimental Hypercholesterolemia. **Basic Res Cardiol**, Darmstadt, v. 104, n. 6, p. 695-706, nov. 2009.
- ²⁵ MOLLMARK, J. et al. Antiangiogenic Activity of rPAI-123 Promotes Vasa Vasorum Regression in Hypercholesterolemic Mice Through a Plasmin-Dependent Mechanism. **Circ Res**, Baltimore, v. 108, n. 12, p. 1419–28, 10 jun. 2011.
- ²⁶ KAMPSCHULTE, M. et al. Thalidomide Influences Atherogenesis in Aortas of ApoE(-/-)/LDLR (-/-) Double Knockout Mice: a Nano-CT Study. **Int J Cardiovasc Imaging**, Boston, v. 30, n. 4, p. 795-802, apr. 2014.
- ²⁷ ALTMAN, D.G.; BLAND, J.M. Absence of Evidence is not Evidence of Absence. **BMJ**. 311:485, aug. 19, 1995.

ANEXOS

FIGURAS

Figuras 3 e 4 - Suíno da raça mista *Large White* x *Landrace*. Baia para alojamento dos suínos no pós-operatório, no Centro de Pesquisa Experimental do HCPA – UFRGS.



Fonte: autor.

Figuras 5, 6 e 7 - Sala de cirurgia do Bloco Cirúrgico Experimental do HCPA - UFRGS. Equipamento de anestesia e monitorização.



Fonte: autor.

Figuras 8 e 9: Indução anestésica e venóclise veia marginal da orelha.



Fonte: autor.

Figuras 10 e 11 - Intubação oro-traqueal, monitorização pressórica e sondagem naso-gástrica.



Fonte: autor.

Figuras 12 e 13 - Tricotomia, assepsia e antissepsia com álcool iodado.



Fonte: autor.

Figuras 14 e 15 - Mesa, material cirúrgico e colocação de campos estéreis.



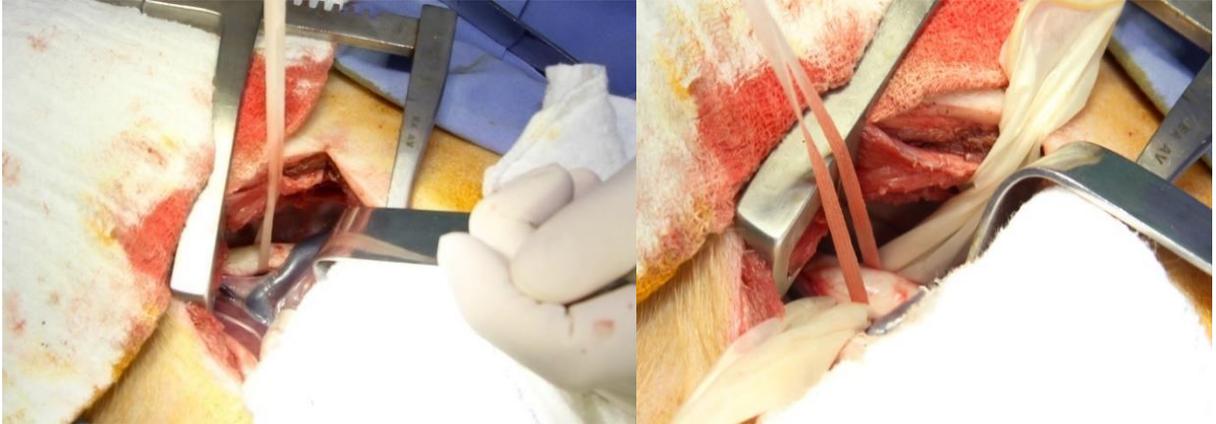
Fonte: autor.

Figuras 16 e 17 - Toracotomia lateral esquerda em 6º EIC, abertura por planos, desinsuflação do pulmão esquerdo e visualização da aorta torácica.



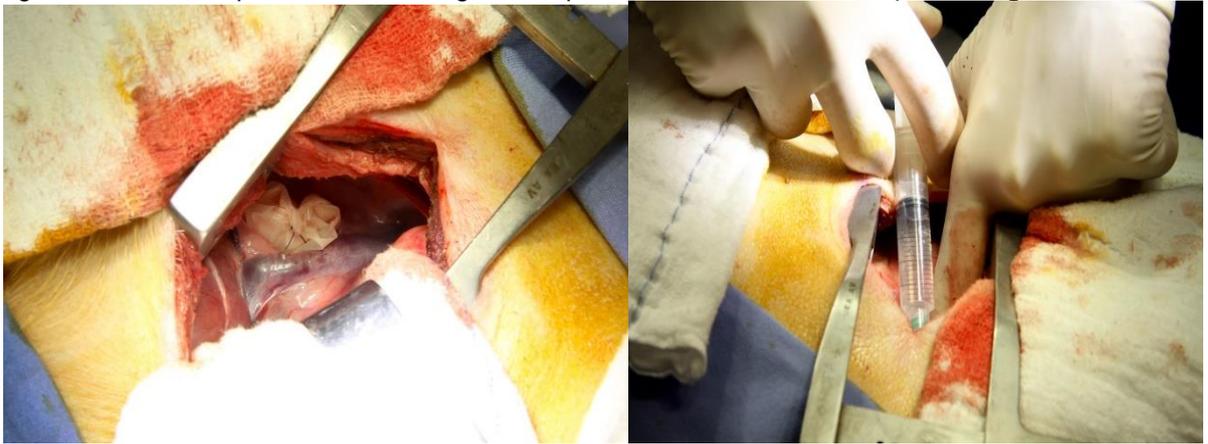
Fonte: autor.

Figuras 18 e 19 - Dissecção, domínio da aorta torácica descendente, ligadura dos ramos intercostais, proteção da área dissecada com polivinil.



Fonte: autor.

Figuras 20 e 21 - Aspecto final da cirurgia e bloqueio anestésico intercostal para analgesia.



Fonte: autor.

Figuras 22 e 23 - Drenagem do tórax, fechamento por planos e sutura cutânea.



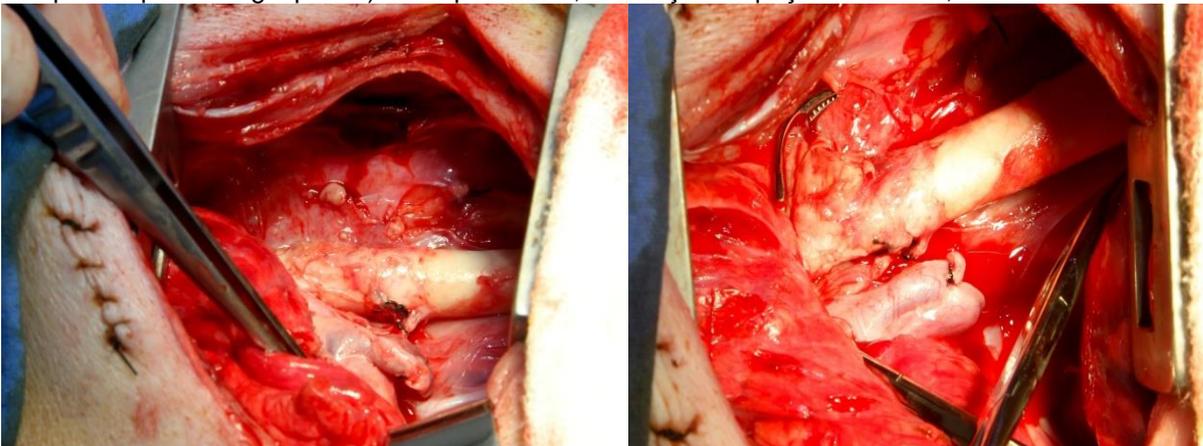
Fonte: autor.

Figuras 24 e 25 - Preparo para a 2ª fase, toracotomia abaixo da incisão prévia, abertura por planos, liberação de aderências evidenciando a área dissecada da aorta torácica descendente.



Fonte: autor.

Figuras 26 e 27 - Dissecção da aorta torácica descendente até o diafragma (áreas manipulada e não manipulada pela cirurgia prévia). Clampeamento, ressecção da peça em estudo, eutanásia.



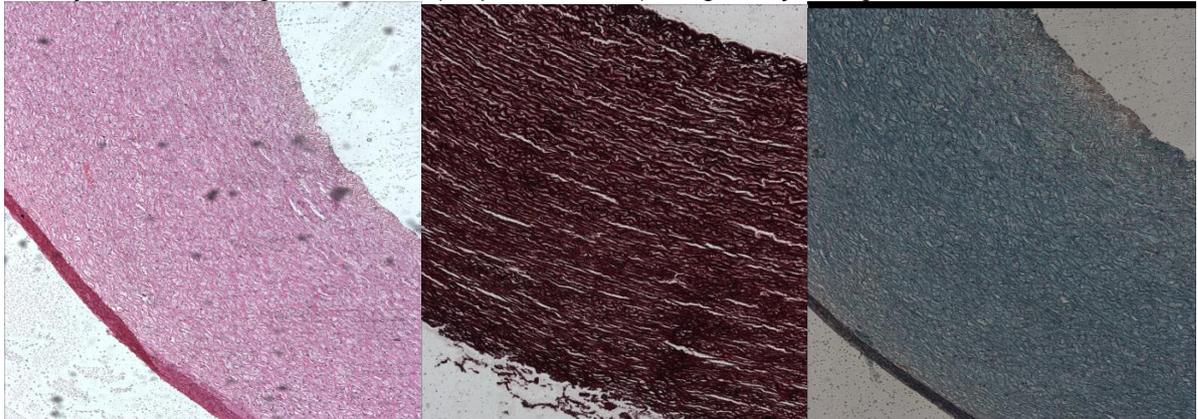
Fonte: autor.

Figuras 28 e 29 - Preparo, limpeza e conservação da peça cirúrgica em solução de formol.



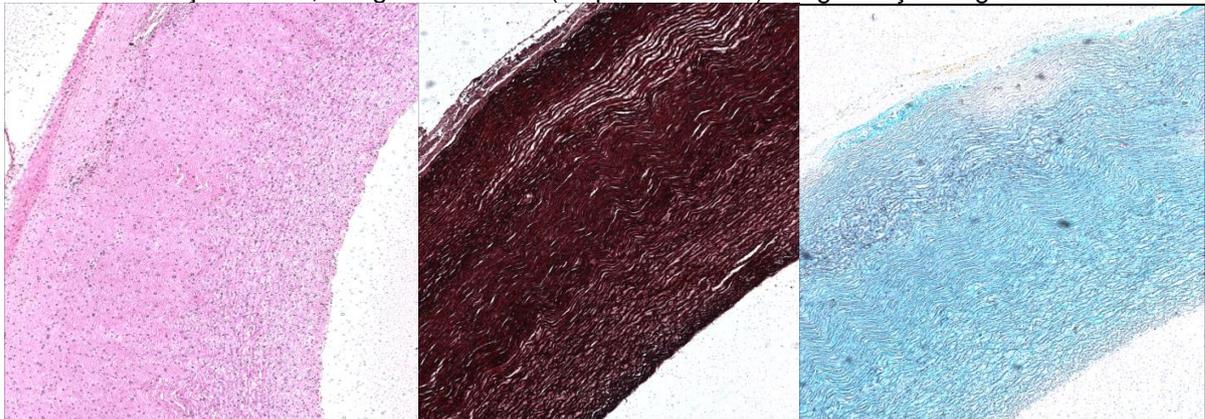
Fonte: autor.

Figuras 30, 31 e 32 - Fotomicrografia da aorta (parcial), não submetida à manipulação cirúrgica. Coloração de HE, Weigert e Masson (respectivamente). Magnificação original 8x.



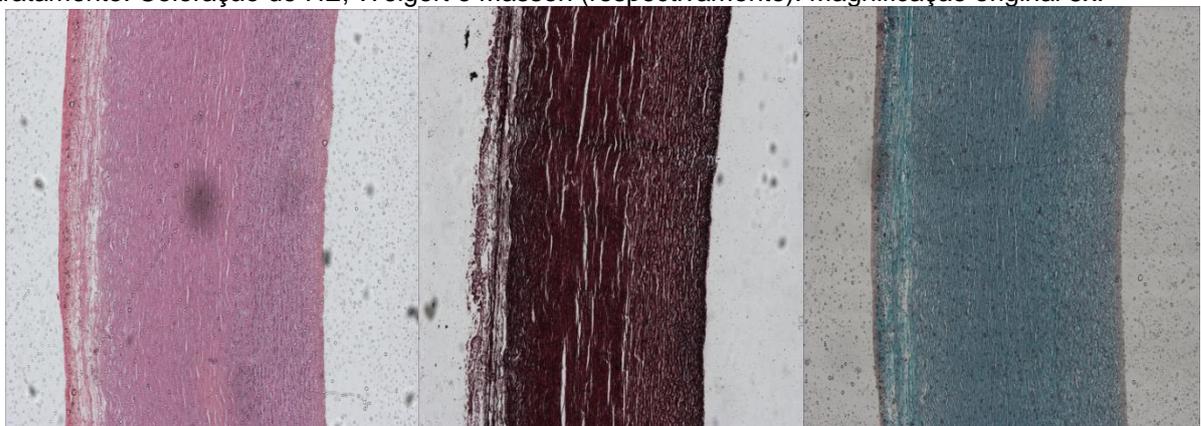
Fonte: autor.

Figuras 33, 34 e 35 - Fotomicrografia da aorta (parcial), submetida à manipulação cirúrgica no grupo controle. Coloração de HE, Weigert e Masson (respectivamente). Magnificação original 8x.



Fonte: autor.

Figuras 36, 37 e 38 - Fotomicrografia da aorta (parcial), submetida à manipulação cirúrgica no grupo tratamento. Coloração de HE, Weigert e Masson (respectivamente). Magnificação original 8x.



Fonte: autor.

TABELAS

Tabela 1 - Média e desvio padrão da contagem dos escores.

	GRUPO CONTROLE		GRUPO TRATAMENTO		p
	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	
ANGIOGÊNESE	2,17	0,41	1,80	0,84	0,338
INJÚRIA	2,17	0,41	2,00	0,00	0,361
INFLAMAÇÃO	1,00	0,00	1,20	0,45	0,273
ESPESSAMENTO	2,00	0,00	2,00	0,71	0,99

Notação: DP: desvio padrão; p: nível de significância estatística.

Fonte: autor.

Tabela 2 - Distribuição de Poisson - média, desvio padrão e intervalo de confiança.

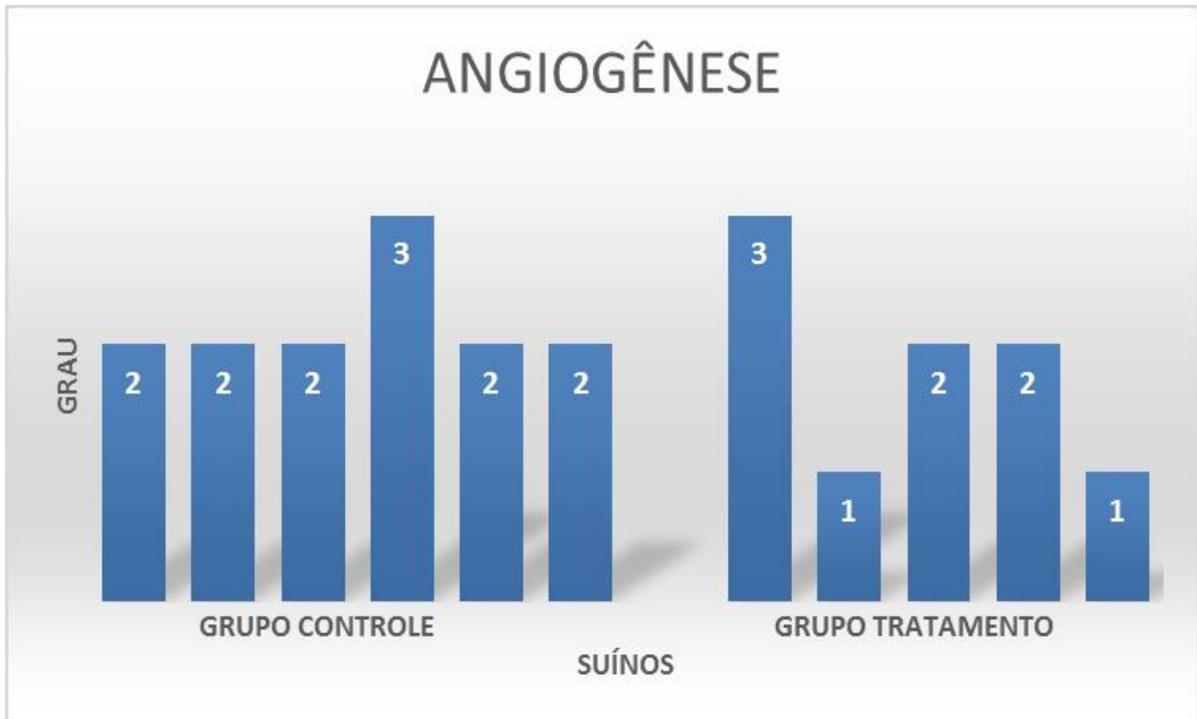
	GRUPO CONTROLE			GRUPO TRATAMENTO		
	MÉDIA	DP	95% IC	MÉDIA	DP	95% IC
ANGIOGÊNESE	2,17	0,15	1,89 - 2,49	1,80	0,33	1,25 - 2,59
INJÚRIA	2,17	0,15	1,89 - 2,49	2,00	0,00	2,00 - 2,00
INFLAMAÇÃO	1,00	0,00	1,00 - 1,00	1,20	0,18	0,90 - 1,61
ESPESSAMENTO	2,00	0,23	1,59 - 2,52	2,00	0,28	1,52 - 2,64

Notação: DP: desvio padrão; IC: intervalo de confiança.

Fonte: autor.

GRÁFICOS

Gráfico 1 - Graduação das alterações histológicas relativas à angiogênese.



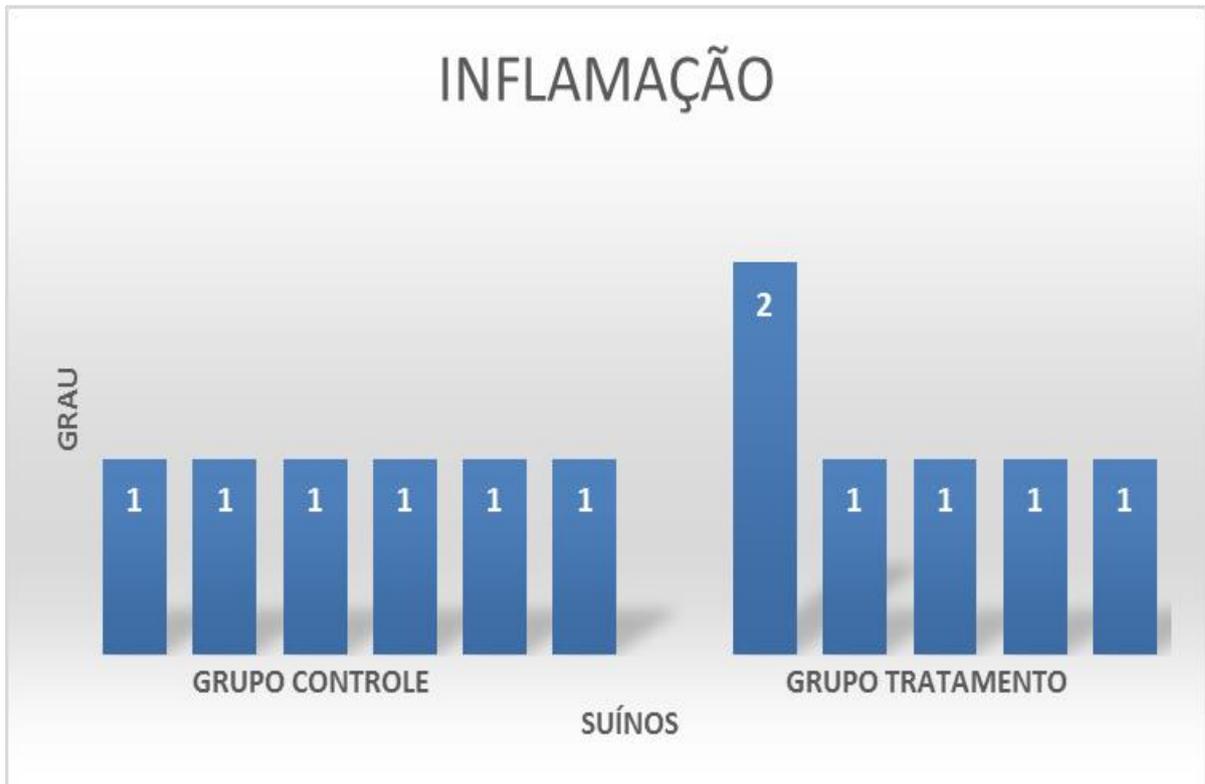
Fonte: autor.

Gráfico 2 - Graduação das alterações histológicas relativas à injúria.



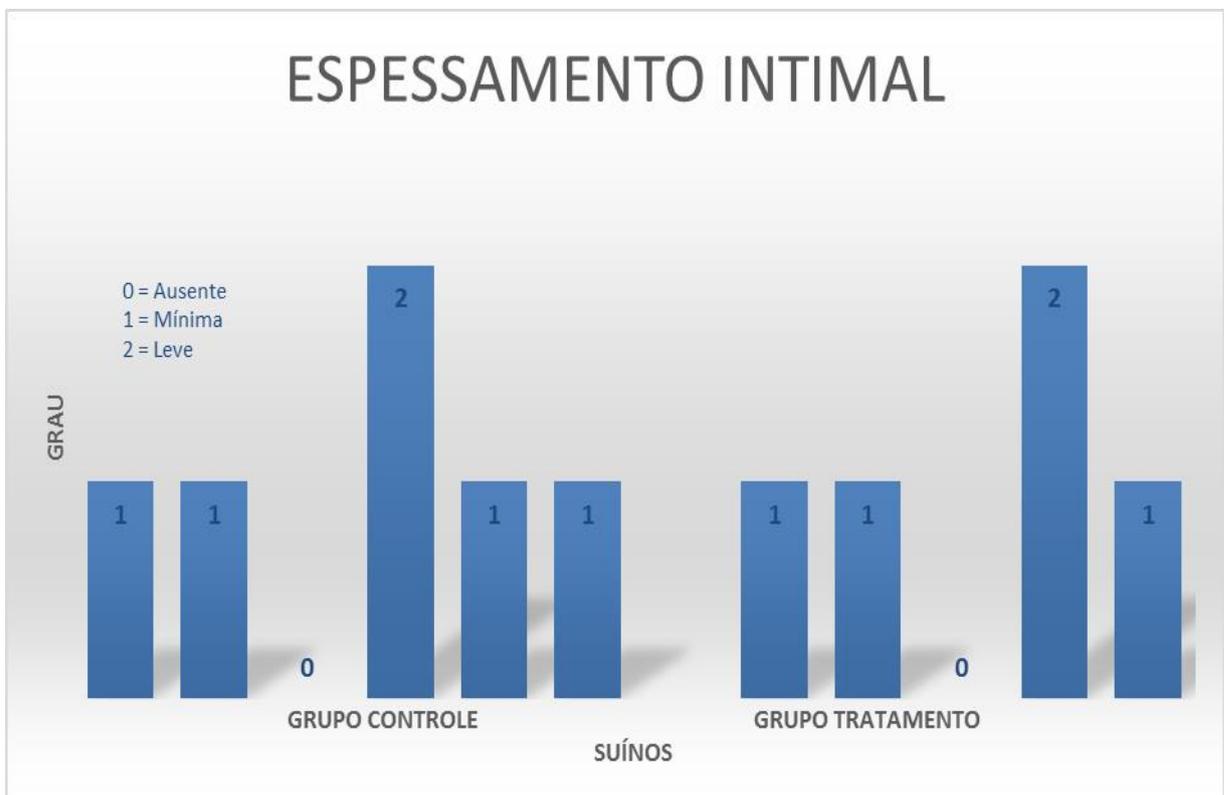
Fonte: autor.

Gráfico 3 - Gradação das alterações histológicas relativas à inflamação.



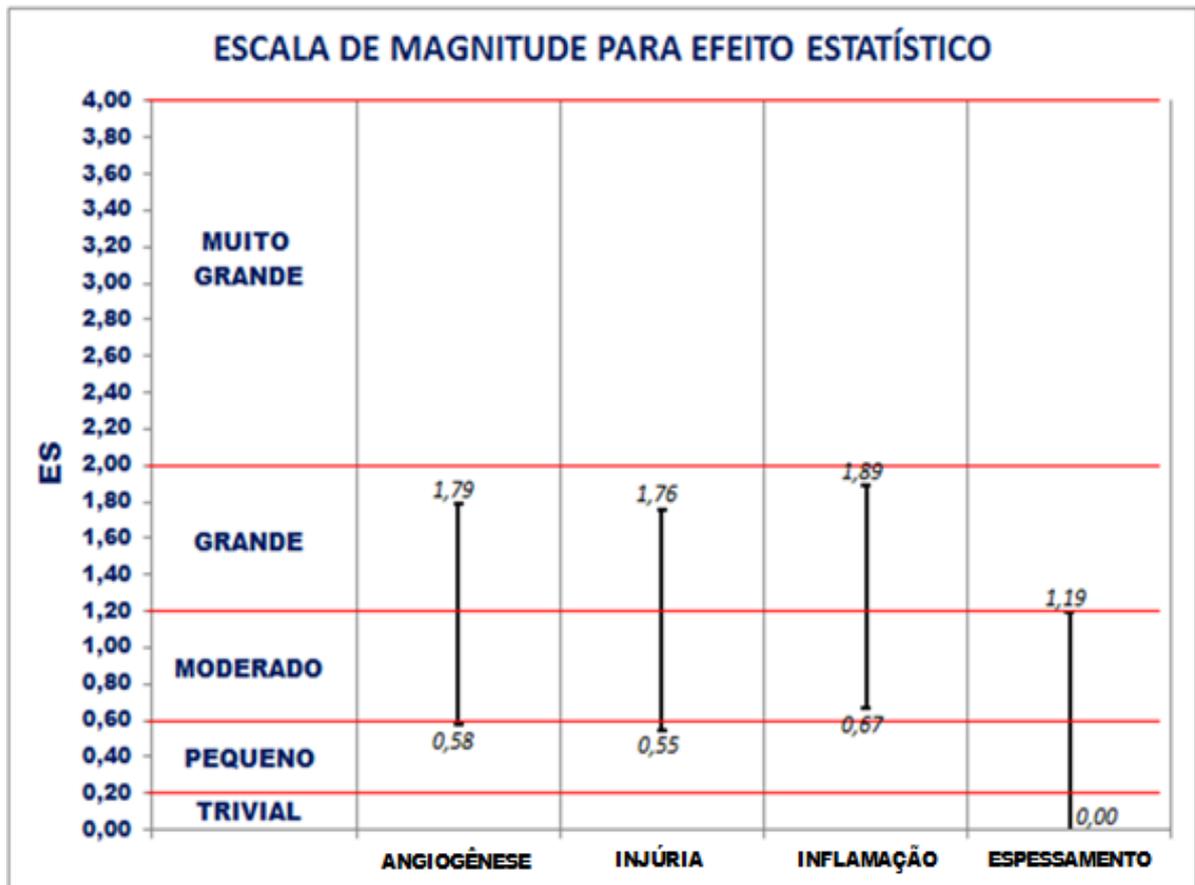
Fonte: autor.

Gráfico 4 - Gradação das alterações histológicas relativas ao espessamento intimal.



Fonte: autor.

Gráfico 5 – Escala de magnitude para efeito estatístico (ES).



Fonte: autor.