

Efeito da L-arginina na Neoproliferação Intimal e no Remodelamento Arterial após Lesão por Balão, em Ilíacas de Coelhos Hipercolesterolêmicos

The Effect of L-arginine on Neointimal Proliferation and Artery Remodeling on an Iliac Artery Lesion Caused by a Balloon Catheter in Hypercholesterolemic Rabbits

José Knopfholz, Dalton B. Prêcoma, Paulo Roberto S. Brofman, Gabriela Elisete Bier, Ruy Fernando Kuenzer C. da Silva, Anna Paula Kuchnir Silva, Ana Carolina Lemos, Priscila de Oliveira Silva, Jacqueline Domsin de Moraes

Pontifícia Universidade Católica do Paraná - Curitiba, PR

Objetivo: A neoproliferação intimal e o remodelamento têm sido implicados como os maiores fatores causadores de reestenose. O objetivo deste trabalho é estudar a ação da L-arginina por via oral, nesses dois fatores, após lesão por balão, em artérias ilíacas de coelhos hipercolesterolêmicos.

Métodos: Foram utilizados dezenove coelhos, que foram divididos em dois grupos: controle (GC) e arginina (GA), respectivamente com dezenove e dezessete artérias estudadas. Os animais foram submetidos a lesão por balão de angioplastia, em suas artérias ilíacas, quinze dias após início de dieta hipercolesterolêmica a 2%. A seguir, os animais do GA passaram a receber uma solução de L-arginina, por via oral, na dose de 1 g/kg/dia. Após o sacrifício, no 15º dia após a lesão por balão, procedeu-se a cortes histológicos das artérias, as quais foram coradas e fixadas. Utilizou-se como representativa do desenvolvimento da lesão a razão da área da neointima (em mm²) pela camada média (em mm²). Por sua vez, a razão da área total do vaso em sua porção medial (de maior contato com o balão) pela área total do vaso no segmento referencial (de menor contato com o balão) foi a definidora do remodelamento.

Resultados: A média do espessamento neointimal (NI/M) foi de 0,8151±0,2201 no GC e de 0,3296±0,1133 no GA. Não houve diferença entre os tipos de remodelamento entre os dois grupos estudados.

Conclusão: No modelo experimental utilizado, a L-arginina foi capaz de reduzir o espessamento intimal em coelhos hipercolesterolêmicos e não teve ação sobre o remodelamento arterial.

Palavras-chave: Reestenose, neoproliferação intimal, remodelamento, óxido nítrico.

Objective: It has been implied that neointimal proliferation and remodeling are the major causes of restenosis. The objective of this study is to assess the effect of orally administered L-arginine on these two factors in hypercholesterolemic rabbits that had suffered an injury to their iliac arteries caused by a catheter balloon.

Methods: The study included nineteen rabbits that were divided in two groups: control (CG) and arginine (AG). There were 19 arteries studied from the control group and 17 in the arginine group. The animals were placed on a 2% hypercholesterolemic diet for 15 days and then submitted to a balloon angioplasty in order to produce a lesion in their iliac arteries. Next, the AG animals were given a 1g/kg/day oral dose of a L-arginine solution. The animals were sacrificed 15 days after the angioplasty procedure and histological artery sections were prepared, stained and fixed. The ratio between the neointimal area (in mm²) and the media layer (in mm²) was used to represent lesion development. In order to determine remodeling, the ratio between the total area of the medial portion of the vessel (greater balloon contact) and the total area of the reference segment of the vessel (less balloon contact) was used.

Results: Mean neointimal thickness (NI/M) was 0.8151±0.2201 in CG and 0.3296±0.1133 in AG. Remodeling patterns for the two groups studied were similar.

Conclusion: In the experimental model used, L-arginine was able to reduce intimal tissue thickness in hypercholesterolemic rabbits but did not act on artery remodeling.

Key words: Restenosis, neointimal proliferation, remodeling, nitric oxide.

O espessamento neointimal do vaso tem sido amplamente valorizado, pois sua presença está ligada a várias complicações de intervenções terapêuticas. Em enxertos venosos implantados na circulação arterial, esse fator está implicado na gênese em reoclusões no pós-operatório¹. Na vasculopatia relacionada ao coração transplantado, esse fenômeno tem mostrado papel decisivo², e a reestenose após angioplastia com *stent* é quase exclusivamente explicada pela hiperplasia neointimal³.

A formação da neointima difere da placa aterosclerótica, pois essa é formada fundamentalmente por células musculares lisas (CML) e matriz extracelular. Essas células migram da camada média para a íntima em diferentes momentos desse fenômeno⁴. Tal fato pode sofrer inibição por mecanismos mediados pelo óxido nítrico (NO)⁵. O conhecimento dos fatores estimuladores e limitadores de crescimento neointimal precisa ser aprofundado e, nesse contexto, precursores do NO podem ter seu papel na intervenção sobre esse fator.

São alguns os estudos com a L-arginina, precursora do óxido nítrico, que, além de um custo acessível, é bem tolerada e disponível comercialmente⁶. Há, entretanto, alguma divergência nos trabalhos publicados, havendo benefício bem estabelecido quando se utiliza o agente em forma de aplicação local (intravascular)^{7,8}. É válido ressaltar que pesquisas experimentais concluíram haver maior expressão vascular no óxido nítrico, com alguns tipos de exercícios físicos, ocorrendo, inclusive, benefício na hiperplasia neointimal e na adesão plaquetária em angioplastia com *stent*, em ratos⁹.

Métodos

Antes de sua realização, o experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais.

Foram utilizados dezenove coelhos machos albinos (*Oryctolagus cuniculus*) da linhagem New Zealand, provenientes do biotério da PUCPR, com a média de seis meses de idade, os quais foram divididos em dois grupos: grupo controle (GC) (n = 10) e grupo arginina (GA) (n = 9). De cada coelho foram consideradas duas artérias que, para efeito das variáveis deste estudo, foram tidas como observações independentes. Dessa forma, essa análise foi feita com base nos resultados obtidos em dezenove artérias do grupo controle (uma artéria foi perdida por problemas técnicos) e dezessete artérias do grupo arginina (uma artéria foi perdida por problemas técnicos).

Para a alimentação dos animais, foi preparada uma dieta hipercolesterolêmica. Para tal, foram utilizados 200 g de colesterol (Sigma-Aldrich®), dissolvidos em 800 ml de clorofórmio (Biotec®), distribuídos em 10 kg de ração Nuvital®, constituindo uma alimentação hipercolesterolêmica a 2%. O colesterol dissolvido foi distribuído com auxílio de pulverizador sobre a ração, a qual era colocada num recipiente plano e raso. Após as 24 horas exigidas para adequada evaporação do clorofórmio, a ração foi distribuída para os animais. A lesão arterial foi induzida no 15º dia após o início da dieta, e a utilização dessa dieta se deu até o sacrifício dos animais.

Os coelhos foram anestesiados com Xilazina (Coopazine®-Coopers) na dose de 5 mg/kg e Ketamina (Vetanarcol® König) na dose de 3,5 mg/kg, por via

intramuscular, na coxa. Foi, então, colhida amostra de sangue para dosagem de colesterol total. Após indução anestésica, foram realizadas tricotomias nas regiões inferior do abdome e inguinal, seguidas de limpeza adequada do local, assepsia e antisepsia. Procedeu-se, então, à incisão na pele com 2 a 3 cm de extensão no sentido longitudinal na prega inguinal, para exposição das artérias femoral direita e esquerda, as quais foram reparadas com fio de algodão 3-0. Em seguida, realizou-se pequena arteriotomia transversal, através da qual introduziu-se uma guia metálica número 0, 014, pela qual adentrava o cateter-balão de 3,0 mm de diâmetro por 20 mm de comprimento (raio balão/artéria de 2,5:1), que foi inserido no lúmen da artéria ilíaca direita (AID) e artéria ilíaca esquerda (AIE). Em cada artéria, o cateter-balão foi insuflado pelo tempo de cinco minutos, na pressão de 5 atm, levando a distensão da parede arterial. Após desinsuflação do balão, procedeu-se à ligadura das artérias, para contenção do fluxo, em ponto imediatamente acima do orifício de entrada do sistema cateter-balão, com fio de algodão 3-0. Por fim, a pele foi suturada com fio de Vicryl 3-0. Foram administrados analgésicos e antibióticos para ambos os grupos.

Vinte e quatro horas após a realização da lesão arterial, iniciou-se a administração de L-arginina para o grupo arginina, na dose de 1 g/kg/dia. Esta substância foi administrada na forma de solução, previamente homogeneizada, preparada na concentração de 3g/10 mL de solução. A mesma foi retirada através de seringa graduada, a qual foi inserida na cavidade oral do animal e teve o êmbolo pressionado lentamente para não haver perda da solução. Enquanto este procedimento era realizado, o coelho se encontrava em uma caixa com orifício adequado para sua cabeça, que limitava seus movimentos e facilitava a aceitação da droga.

No 15º dia após a lesão arterial, cada animal foi novamente pesado e anestesiado e, após procedimentos de antisepsia e colocação de campos estéreis, foi realizada uma incisão longitudinal, que se estendia desde a transição toracoabdominal até a região pélvica, a partir da qual era prolongada até as regiões inguinais direita e esquerda. Foram visualizadas e reparadas as artérias femorais, ilíacas e aorta. Após sacrifício com dose letal de barbitúrico, as artérias foram lavadas e fixadas com formaldeído a 10%, tamponado com fosfato (pH = 7,6), pelo período de dez minutos. Realizou-se, a seguir, a remoção do bloco envolvendo parte da aorta e ilíacas. Para identificação, a AID foi armazenada com um ponto na porção distal.

Para análise histológica e morfométrica, os espécimes arteriais, constituídos pelo segmento distal da aorta até as artérias ilíacas, foram fixados em formalina, por 24 horas, e processados para a confecção dos cortes histológicos. As artérias foram submetidas a cortes transversais, com 2 a 3 mm de espessura cada. As amostras foram colocadas em cápsulas histológicas identificadas, separando o segmento medial, de maior contato com o balão, do referencial (distal e proximal ao balão). As amostras foram identificadas com anotação do número do coelho e o lado da artéria ilíaca em uma das extremidades da lâmina, seguidos pelo registro do local dos cortes.

Para efeito de análise morfológica e de remodelamento, foram consideradas as seguintes variáveis: área neointimal, área da camada média e área total do vaso, expressas em mm². O espessamento intimal foi avaliado pela relação da área neointimal pela área da camada média, para que fosse levado em conta o tamanho da artéria a ser analisada. Utilizou-se, portanto, como representativa do desenvolvimento da lesão, a área neointimal que foi relativizada de acordo com a dimensão de cada vaso, ou seja, mediou-se o valor porcentual da neointima em relação à área da camada média. Por sua vez, a razão da área total do vaso em sua porção medial, pela área total do vaso no segmento referencial, expressa em porcentagem, foi a definidora do remodelamento. Esse era considerado positivo quando a área relativa do segmento medial (de interesse) fosse 10% maior do que a área referencial, e era dito negativo, quando a área do segmento medial fosse 10% menor do que a área referencial.

Os resultados das variáveis NI/M, área do vaso e remodelamento foram expressos por média e desvio-padrão, enquanto os resultados da variável remodelamento foram expressos por freqüências e percentuais. Para comparar os dois grupos: controle e arginina em relação às médias das variáveis NI/M, área do vaso e remodelamento, foi usado o teste t de Student para amostras independentes, levando-se em consideração a homogeneidade das variâncias. Para a comparação dos locais medial e referencial, dentro de cada grupo, foi usado o teste t de Student para amostras pareadas. A condição de normalidade foi verificada pelo

teste de *Shapiro-Wilks*. Nos casos de não-normalidade, foi aplicada uma transformação logarítmica aos dados. Para a comparação dos grupos em relação à distribuição do tipo de remodelamento foi usado o teste de Qui-Quadrado. Em todos os testes, valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Resultados

Peso e dosagem de colesterol dos animais - O peso dos animais, aferido no início do fornecimento da dieta e no dia do sacrifício, está demonstrado na tabela 1. Não houve diferença estatística entre o grupo controle e o grupo arginina. Os níveis de colesterol em amostras colhidas no momento da lesão por balão foram estatisticamente semelhantes e elevados em ambos os grupos, conforme demonstrado na tabela 1.

Espessamento intimal - A comparação do grau de crescimento intimal, comparando-se o grupo controle e o grupo arginina, está representada na tabela 2. Houve diferença significativa entre o grupo tratado e o grupo não-tratado com o agente do estudo. Na figura 1 demonstra-se um corte de artérias de ambos os grupos.

Tipos de remodelamento - Os resultados encontrados são apresentados na tabela 3.

Discussão

A inibição da formação neointimal tem sido objetivada para resolução da reestenose na era *pós-stent*. A diferença

| Variável | Grupo controle (n = 10) | Grupo arginina (n = 9) | Valor de p |
|--------------------|-------------------------|------------------------|------------|
| | Média ± dp | Média ± dp | |
| Peso1 (kg) | 2.480,00 ± 477,96 | 2.466,67 ± 526,78 | 0,9545 |
| Peso2 (kg) | 2.750,00 ± 344,00 | 2.644,44 ± 415,67 | 0,5528 |
| Colesterol (mg/dl) | 1.255,50 ± 207,59 | 1.242,89 ± 234,58 | 0,9025 |

Peso1 = peso dos animais no início do fornecimento da dieta; Peso2 = peso dos animais no dia do sacrifício; Colesterol = dosagem de colesterol total.

Tabela 1 - Peso e dosagem de colesterol nos animais

| Variável | Artérias controle (n = 19) | Artérias arginina (n = 17) | Valor de p |
|-----------------------|----------------------------|----------------------------|------------|
| | Média ± dp | Média ± dp | |
| NI (mm ²) | 0,33 ± 0,19 | 0,17 ± 0,09 | 0,0000 |
| M (mm ²) | 0,42 ± 0,22 | 0,56 ± 0,36 | NS |
| NI/M | 0,8151 ± 0,2201 | 0,3296 ± 0,1133 | 0,0000 |
| NI/M medial | 0,6969 ± 0,4107 | 0,2764 ± 0,1392 | 0,0004 |
| NI/M referencial | 0,8655 ± 0,2189 | 0,3556 ± 0,1357 | 0,0000 |

NI - área da neointima; M - área da camada média; NS - não-significativo; NI/M medial = relação da área neointimal pela área da camada média; NI/M referencial = relação da área neointimal pela área da camada média, no segmento referencial da artéria.

Tabela 2 - Espessamento intimal (comparativa entre o grupo controle e o grupo arginina)

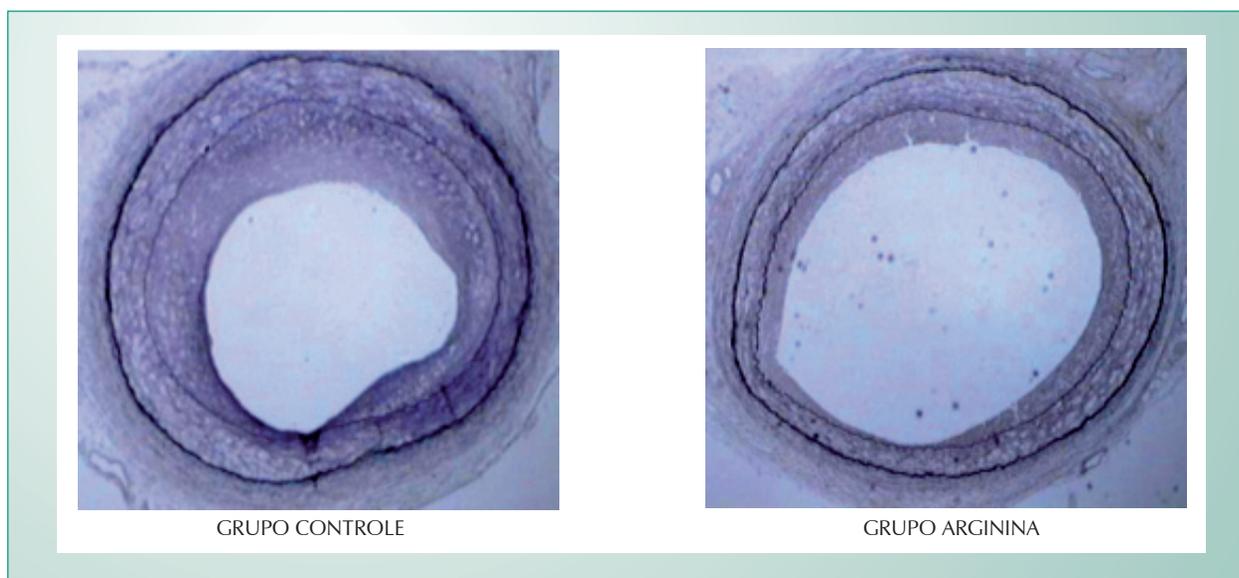


Fig. 1 - Cortes de artérias do grupo controle e do grupo arginina.

| Tipo de remodelamento | Artérias controle | Artérias arginina |
|-----------------------|-------------------|-------------------|
| Positivo | 9 (47,37%) | 6 (35,29%) |
| Indiferente | 6 (31,58%) | 5 (29,41%) |
| Negativo | 4 (21,05%) | 6 (35,29%) |
| Total | 19 | 17 |

O resultado do teste estatístico indicou semelhança no remodelamento entre os grupos, no nível de significância de 5% ($p = 0,6118$).

Tabela 3 - Tipos de remodelamento no grupo controle e no grupo arginina

estatística importante detectada neste estudo sugere que a L-arginina é capaz de inibir a neoproliferação intimal no modelo experimental em questão. Tais resultados foram semelhantes aos encontrados por Le Tourneau e cols.¹⁰ em experimento com coelhos hipercolesterolêmicos.

Alguns estudos de L-arginina em seres humanos não demonstraram efeitos favoráveis na taxa de reestenose. Dudek e cols.^{11,12} aplicaram o agente de maneira intravascular, seguido de administração oral de 6 g/dia, por quatorze dias, após a angioplastia. Apesar de não ter havido diferença na taxa de reoclusão e na neoproliferação intimal, essa dose é bem mais baixa do que a utilizada no presente trabalho. Mesmo não havendo possibilidade de se extrapolar a dose experimental para seres humanos, trabalhos demonstraram segurança com a utilização desse aminoácido em doses de 12 g/dia¹³. Há pouca literatura, entretanto, sobre o uso da L-arginina por via oral, na espécie humana. Por este trabalho acredita-se haver possibilidade de reconsiderar a questão.

A relação do NO com o remodelamento pode ter seu fundo fisiopatogênico na inibição do espessamento intimal, na produção de metaloproteínases e na apoptose das células

musculares lisas⁵. A ativação da matriz de metaloproteínases é necessária para que o remodelamento adaptativo arterial ocorra, e um dos fatores capazes de levar a essa produção é o NO, pois ele é capaz de regular a expressão dessas, bem como de mediar fatores inibitórios das metaloproteínases. Em estudo feito *ex vivo*, sugeriu-se que as deficiências de NO alteram a homeostase entre os fatores formadores e inibidores, favorecendo a degradação da matriz extracelular¹⁴.

Apesar da grande redução da espessura neointimal obtida neste estudo, não houve diferença no remodelamento. Tal fato pode ser explicado, pois o modelo experimental utilizado apresenta limitações para o estudo desse fenômeno. A utilização de artérias sem fixação com pressão sistêmica tem sido apontada como uma metodologia que superestima os valores reais desse fator¹⁵. Além disso, a retração do tecido, após o sacrifício, pode levar a falhas no dimensionamento do remodelamento.

Em um dos poucos trabalhos sobre o tema, Le Tourneau e cols.¹⁰ notaram ausência de remodelamento favorável (alargamento do vaso) no grupo de animais tratados com L-arginina, fato que não ocorreu no grupo controle. Esses autores sugerem, portanto, que esse agente teria efeito inibitório no remodelamento favorável. Nesse estudo, o sacrifício dos animais ocorreu em quatro semanas. Isso pode significar que a ação do óxido nítrico no remodelamento ocorre entre duas e quatro semanas após a angioplastia. É importante ressaltar algumas diferenças, entretanto, entre o trabalho desses autores e o presente estudo. Naquele trabalho, a L-arginina foi acrescentada na água dos animais, fato que se considera pouco eficiente, pois não há controle sobre a adequada ingestão do aminoácido e a dose real desse. Além disso, no trabalho de Le Tourneau e cols.¹⁰, a lesão foi desenvolvida numa fase inicial, através de um cateter de Fogarty e a angioplastia foi realizada seis semanas após esse procedimento¹⁶. Portanto, o modelo experimental foi diferente. Finalmente, no presente trabalho, foi considerada para análise histológica a média dos cortes arteriais que tiveram contato com o balão. No

estudo desses autores, considerou-se apenas o corte de menor diâmetro luminal, fato que pode aumentar a margem de erro.

Diante do exposto, a possibilidade da L-arginina ter seu papel na prevenção do espessamento neointimal surge em um momento no qual a função endotelial normal está cada vez mais sendo valorizada, sendo a doença do endotélio responsabilizada pela doença coronariana em geral. Independentemente do aspecto terapêutico, os resultados deste trabalho evidenciam a necessidade de melhor conhecimento fisiopatológico da formação neointimal e, mais do que isso, ressaltam o papel do óxido nítrico nesse fenômeno. Portanto, a aplicabilidade da L-arginina pode ser aperfeiçoada, melhorada ou até substituída, desde que se conheçam os mecanismos pelos quais ela inibe o crescimento da neointima.

O resultado encontrado neste estudo difere do que havia na literatura até a presente data, pois a L-arginina agiu

positivamente na neoproliferação intimal e de forma neutra no remodelamento. Levando-se em conta sua baixa toxicidade, esse agente poderia ser uma opção isolada ou associada a demais estratégias de inibição da formação neointimal, após novos estudos e, ainda, abrir caminhos para novas estratégias terapêuticas.

Por este trabalho é possível concluir que, no modelo experimental utilizado, a L-arginina foi capaz de reduzir a neoproliferação intimal em coelhos hipercolesterolêmicos, e não teve ação sobre o remodelamento arterial¹⁷.

Agradecimentos

Agradecemos ao Prof. Dr. João Carlos Repka por sua fundamental contribuição.

Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflitos de interesses pertinentes.

Referências

- Fulton GJ, Davies MG, Barber L, Gray JL, Svendsen E, Hagen PO. Local effects of nitric oxide supplementation and suppression in the development of intimal hyperplasia in experimental vein grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1998; 15: 279-89.
- Perrault LP, Malo O, Bidouard JP, Villeneuve N, Vilaine JP, Vanhoutte PM. Inhibiting the NO pathway with intracoronary L-NAME infusion increases endothelial dysfunction and intimal hyperplasia after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2003; 22: 439-51.
- Mintz G, Popma JJ, Richard AD. Arterial remodeling after coronary angioplasty: a serial intravascular ultrasound study. *Circulation* 1996; 94: 35-43.
- Schwartz SM, deBlois D, O'Brien ER. The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ Res* 1995; 77: 445-65.
- Ignarro L. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ Res* 1989; 65: 1-21.
- Chan AW, Chew DP, Lincoff M. Update on Pharmacology for Restenosis. *Current Int Card Rep* 2001; 3: 149-55.
- Kalinowski M, Alfke H, Bergen S, Klose KJ, Barry JJ, Wagner HJ. Comparative trial of local pharmacotherapy with L-arginine, r-hirudin, and molsidomine to reduce restenosis after balloon angioplasty of stenotic rabbit iliac arteries. *Radiology* 2000; 219: 716-20.
- Niebauer J, Schwarzwacher SP, Hayase M, et al. Local L-arginine delivery after balloon angioplasty reduces monocyte binding and induces apoptosis. *Circulation* 1999; 100: 1830-5.
- Indolfi C, Torella D, Coppola C, et al. Physical training increases eNOS vascular expression and activity and reduces restenosis after balloon angioplasty or arterial stenting in rats. *Circ Res* 2002; 91: 1190-7.
- Le Tourneau T, Van Belle E, Corseaux D, et al. Role of nitric oxide in restenosis after experimental balloon angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit: effects on neo-intimal hyperplasia and vascular remodeling. *J Am Coll Cardiol* 1999; 33: 876-82.
- Dudek D, Heba G, Bartus S, et al. Effects of L-arginine supplementation on endothelial function after stent implantation. *Kardiologia Pol* 2002; 57: 389-97.
- Dudek D, Legutko J, Heba G, et al. L-Arginine supplementation does not inhibit neo-intimal formation after coronary stenting in human beings: an intravascular ultrasound study. *Am Heart J* 2004; 147: E12.
- West SG, Likos-Krick A, Brown P, Mariotti F. Oral L-arginine improves hemodynamic responses to stress and reduces plasma homocysteine in hypercholesterolemic men. *J Nutr* 2005; 212-7.
- Eagleon MJ, Peterson DA, Sullivan VV, et al. Nitric oxide inhibition increases aortic wall matrix metalloproteinase-9 expression. *J Surg Res* 2002; 104: 15-21.
- Kobs RW, Muvarak NE, Eickhoff JC, Chesler NC. Linked mechanical and biological aspects of remodeling in mouse pulmonary arteries with hypoxia-induced hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288: 1209-17.
- Wilensky RL, March KL, Gradus-Pizlo I, et al. Vascular injury, repair, and restenosis after percutaneous transluminal angioplasty in the atherosclerotic rabbit. *Circulation* 1995; 92: 2995-3005.
- Haarer SL, Emig LL, Keiser JA. Vascular remodeling in balloon injured rabbit iliac arteries. *Basic Res Cardiol* 1998; 93: 210-7.