

Modelos de Experimentação Animal e Complicações do Angioplastia Transluminal Coronária

Gilberto L. Nunes
São Paulo, SP

Desde a sua introdução por Andreas Gruentzig em 1977¹, a angioplastia transluminal coronária (ATC) tem experimentado uma notável expansão de suas indicações. Entretanto, a sua utilização ainda é limitada por duas importantes complicações: oclusão aguda e reestenose. A oclusão aguda é um evento precoce, ocorrendo geralmente dentro das primeiras 24 ou 48h após o procedimento e é a principal responsável pela morbimortalidade associada à ATC²⁻⁴. A reestenose é uma complicação mais tardia (sua incidência concentra-se nos primeiros 6 meses após o procedimento), sendo a maior limitação do sucesso a longo prazo da angioplastia coronária^{5,6}.

Várias intervenções mecânicas foram concebidas visando otimizar os resultados da angioplastia. Apesar de inicialmente parecerem promissoras, estas novas tecnologias (como *stents*, atrectomia, laser, etc), de um modo geral, não se mostraram mais eficazes do que a dilatação coronária com cateter-balão na maioria dos pacientes. Desta forma, a taxa de reestenose mantêve-se mais ou menos inalterada⁷⁻¹¹, embora os *stents* tenham mostrado resultados promissores em determinados subgrupos de pacientes¹². Em relação à oclusão aguda, novamente os *stents* mostraram utilidade; entretanto, o seu uso generalizado é limitado pela ocorrência de oclusão subaguda e pela alta incidência de complicações hemorrágicas devido a intensa terapia anticoagulante e antiplaquetária que necessita ser utilizada (heparina, aspirina, dextran e coumáricos).

A pesquisa experimental aplicada à angioplastia tem se concentrado em melhor compreender os mecanismos celulares responsáveis pelo surgimento de suas complicações, buscando, dessa forma, identificar os mediadores destes processos e desenvolver terapias que propiciem o seu controle. Neste contexto, modelos experimentais que produzam com fidelidade as circunstâncias encontradas quando se procede à dilatação arterial com cateter-balão, adquirem grande importância. O emprego de animais de experimentação oferece várias vantagens, como disponibilidade do segmento arterial dilatado para análise (com realização de estudo histopatológico, reações

de imuno-histoquímica, hibridação "in situ", etc) e possibilidade de avaliar a eficácia e a segurança de novos tipos de equipamentos (novos catteres, sistemas de terapia local).

Modelos Animais e Reestenose

A reestenose é caracterizada por proliferação e migração de células musculares lisas da camada média para a camada íntima com subsequente síntese de matriz extracelular e formação de um endotélio regenerado^{13,14}. Encolhimento elástico da artéria dilatada e organização de trombo mural podem, eventualmente, também contribuir para o processo de redução da luz do vaso¹⁴⁻¹⁷.

Vários modelos experimentais têm sido empregados no estudo da reestenose e muito se tem discutido a respeito de qual o modelo animal mais adequado para este propósito. Idealmente, deveria haver uma perfeita similaridade entre o animal de experimentação escolhido e o ser humano, principalmente no que diz respeito a anatomia vascular, metabolismo lipídico, sistema de coagulação e composição da placa aterosclerótica^{14,15,19}. Além disso, o tipo de injúria vascular aplicada deveria ser semelhante a que é observada durante a angioplastia coronária. Obviamente, este modelo ideal não existe. Diferentes modelos animais, entretanto, têm sido empregados para o estudo da reestenose, apesar das limitações inerentes a cada um deles.

Animais de experimentação de pequeno porte, como o rato e o coelho, apresentam uma anatomia vascular diferente da encontrada nos humanos¹⁴. Além disso, as artérias coronárias de ratos e coelhos são de pequeno calibre, tornando difícil a manipulação das mesmas. Como consequência, artérias de maior calibre e mais elásticas do que as coronárias (como as carótidas e as ilíacas) são geralmente utilizadas para experimentação¹⁴. Os roedores são de modo geral resistentes à aterosclerose¹⁴; coelhos desenvolvem lesões ateroscleróticas quando submetidos a dietas com alto teor de colesterol, porém a lesão resultante é constituída basicamente de macrófagos carregados de lipídios (*foam cells*) com rara presença de proliferação de células musculares lisas, ao contrário do observado em lesões reestenóticas humanas^{14,18,19}. Além disso, a maioria dos modelos, utilizando estes animais, emprega a denudação endotelial ou seja, um tipo de injúria vascular superficial e que na maioria dos casos não provoca ruptura da lâmina elástica interna, como ocorre frequentemente

Andreas Gruentzig Cardiovascular Center, Emory University, Atlanta, Georgia, USA

Correspondência: Gilberto L. Nunes - Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
Av Dr Dante Pazzanese, 500
CEP 04012-180 - São Paulo, SP

Recebido para publicação em 20/5/93

Aceito em 23/8/93

te durante a angioplastia coronária^{14,19}. Outra importante limitação deste modelo animal é a modesta resposta proliferativa observada após injúria arterial¹⁴. Os primatas são semelhantes a humanos em termos de anatomia vascular e composição da placa aterosclerótica, além de também desenvolverem aterosclerose espontaneamente¹⁴. Entretanto, a utilização de primatas como animais de experimentação é limitada pelo seu alto custo (tanto de compra quanto de manutenção), dificuldade de manuseio e pela sua susceptibilidade de contrair doenças do ser humano¹⁴. Os suínos apresentam extrema semelhança com o homem em termos de dimensões e anatomia coronária¹⁸⁻²⁰, sistema de coagulação², susceptibilidade à aterosclerose^{20,21} e metabolismo de lipoproteínas¹⁸. Além disso, o seu custo de compra é relativamente baixo e a sua manutenção simples e pouco dispendiosa. Dois tipos de injúria vascular têm sido empregados em suínos: hiperdilatação com cateter-balão ou implante de *stents*. Em ambos os casos, há rompimento da membrana elástica interna com subsequente migração e proliferação de células musculares lisas, resultando em um processo reparativo muito semelhante ao observado em lesões reestenóticas humanas^{18,22}.

Outro aspecto importante a ser considerado diz respeito à reprodutibilidade dos resultados obtidos em experimentos animais. Várias drogas (heparina, bloqueadores de canais de cálcio, inibidores da enzima de conversão, etc) foram testadas em diversos modelos animais, visando o controle da reestenose. É interessante notar que muitas delas foram bem sucedidas em animais de pequeno porte (como o coelho e o rato)²³⁻²⁵ mas falharam quando testadas em animais maiores e com biologia mais semelhante à humana (porco, macaco)^{26,27}. Coincidentemente, estes agentes também não mostraram eficácia quando testados em estudos clínicos²⁸⁻³⁰.

No laboratório de pesquisa experimental do Andreas Gruentzig Center, temos empregado a hiperdilatação das coronárias de suínos com cateter-balão como modelo de experimentação¹⁸. Vários agentes farmacológicos já foram testados neste modelo, sendo que apenas dois, angiopeptina e probocol, mostraram-se eficazes em prevenir a proliferação de células musculares lisas e a consequente hiperplasia da camada íntima^{31,32}. Probucol, um agente utilizado clinicamente como hipolipemiante, possui também importantes efeitos antioxidantes³³. Radicais livres (como ânion superóxido, radicais hidroxil e peróxido de oxigênio) podem estimular a proliferação de células musculares lisas³⁴ e dados iniciais obtidos em nosso laboratório experimental, demonstraram que a produção de radicais livres na parede arterial está significativamente aumentada após a injúria com cateter-balão (fig. 1). A angiopeptina (um análogo sintético da somatostatina) inibe a secreção do hormônio do crescimento e do fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1), um importante mediador da proliferação miointimal³⁵. Devido aos resultados positivos obtidos em modelos experimentais, estas

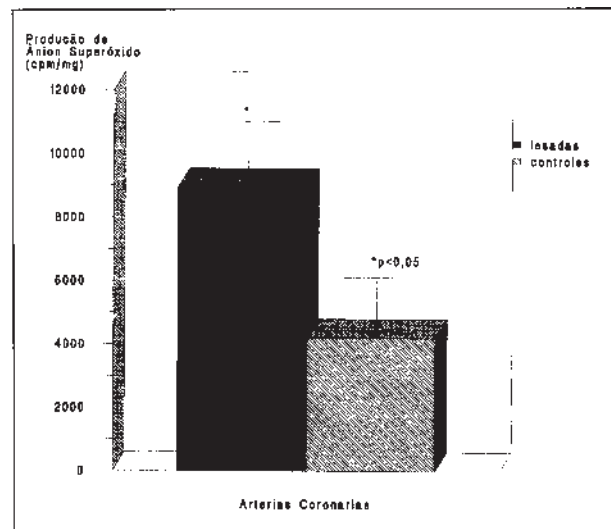


Fig. 1 - Quantificação da produção de ânion superóxido por artérias coronárias através da reação da lucigenina. A produção de radicais livres está significativamente aumentada em artérias submetidas à dilatação com cateter-balão ($p < 0,05$).

duas drogas estão sendo atualmente testadas em estudos clínicos e os resultados deverão ser conhecidos em breve.

Modelos Animais e Trombose

A oclusão aguda pós-angioplastia geralmente é causada pela presença de um grande "flap" oclusivo (causado por dissecação excessiva da parede arterial), com subsequente ativação plaquetária e formação do trombo mural secundário³⁶. Evidências obtidas em modelos animais sugerem que a trombina seja o principal mediador da formação de trombo rico em plaquetas, gerado sob condições de fluxo arterial^{19,37,38}. Dados obtidos a partir de estudos utilizando angioscopia coronária, sugerem que as plaquetas sejam os principais componentes do trombo intracoronário encontrado em pacientes com angina instável³⁹. Além disso, experimentos conduzidos em modelos animais indicam que a geração de trombina e ativação plaquetária provavelmente desempenhem um papel importante na gênese da oclusão aguda pós-angioplastia e também na trombose associada a *stents*^{19,37,40}.

Modelos animais empregando primatas ou suínos são adequados para o estudo da trombose devido à semelhança entre estes animais e o ser humano em termos de anatomia vascular, sistema fibrinolítico e de coagulação e função plaquetária^{19,21,37}. Além disso, é importante que o modelo experimental empregado simule as mesmas condições de fluxo encontradas no sistema arterial, visto que o trombo formado em sistemas de baixo fluxo (como o venoso) é constituído primariamente de fibrina, com menor participação de plaquetas. Isso pode acarretar conclusões

errôneas a respeito da efetividade de agentes farmacológicos na prevenção da trombose, visto que ao contrário do trombo arterial, o venoso é geralmente sensível a anticoagulantes rotineiramente empregados na prática clínica.

Tendo em mente estes conceitos básicos, adaptamos para o porco um modelo de trombose desenvolvido originalmente em primatas por Hanson e col³⁵. Neste modelo, cânulas de teflon-silicone são inseridas cirurgicamente na artéria carótida e na veia jugular externa do animal, formando um *shunt* arterio-venoso crônico⁴¹. O *shunt* crônico é então conectado a uma extensão de tubos feitos de silastic^R na qual está interposto um segmento de dacron medindo 2cm de comprimento (fig. 2). As plaquetas do animal são marcadas com um elemento radiativo (Índio ¹¹¹) e a sua deposição no segmento de dacron é quantificada através de imageamento utilizando uma gama-câmera. Em animais não tratados, a exposição do enxerto de dacron ao fluxo sanguíneo (sob condições de fluxo semelhantes às encontradas em artérias) ocasiona deposição progressiva de plaquetas, atingindo um *plateau* em aproximadamente 60min e resultando freqüentemente em oclusão total do enxerto³⁸. Este modelo experimental de trombose apresenta uma série de vantagens: simulação das condições de fluxo arterial, produção de um trombo constituído basicamente de plaquetas (com participação secundária de fibrina e eritrócitos), alta reprodutibilidade e geração de trombose sob condições controladas de geometria e fluxo^{38,41,42}.

A identificação da trombina como fator importante na geração de trombose arterial tem levado ao desenvolvimento de antitrombinas mais específicas e potentes, uma vez que a terapia sistêmica com heparina (um inibidor não específico) é relativamente ineficiente em prevenir a

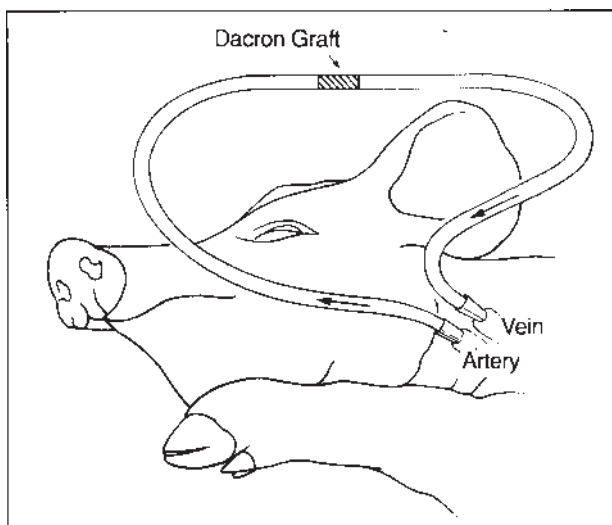


Fig. 2 - Ilustração mostrando o "shunt" crônico implantado em um animal. Cânulas de teflon-silicone inseridas cirurgicamente na artéria carótida ("artery") e na veia jugular externa ("vein") são conectadas a uma extensão de tubos de silastic^R contendo um enxerto de dacron medindo 2cm de comprimento ("dacron graft"). Este segmento é colocado sobre o colimador de uma gama-câmera e imageado continuamente por 2h.

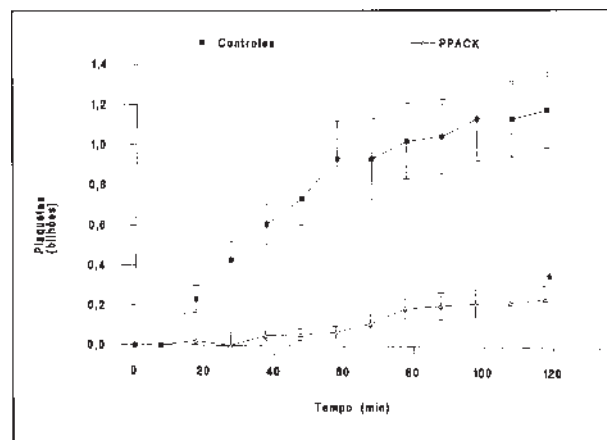


Fig. 3 - Deposição de plaquetas marcadas com Índio¹¹¹ em um enxerto de dacron. Infusão sistêmica de PPACK na dose de 12,5mg/kg/min produz inibição significativa da deposição plaquetária e formação de trombo, quando comparada com controles (*p=0,001).

formação de trombo arterial. Num estudo recente empregando o modelo do *shunt* crônico descrito acima, demonstramos que o peptídeo sintético D-PhePro-Arg clorometil-cetona (PPACK), um inibidor irreversível da trombina, pode bloquear a formação de trombo rico em plaquetas quando administrado sob forma de infusão sistêmica contínua (fig. 3)³⁸. Hera e col⁴³ e Kelly e col⁴⁴, demonstraram resultados semelhantes com administração sistêmica de outro inibidor específico, a hirudina.

Estas novas drogas, entretanto, quando administradas sistemicamente ocasionam importantes alterações dos parâmetros de coagulação. Desta forma, o tempo de sangramento (TS) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) são prolongados, predispondo ao surgimento de complicações hemorrágicas^{38,43,44}. Esta observação tem levado à busca de formas de tratamento local com estes agentes, a fim de se obter altas concentrações da droga no local de formação do trombo mas sem implicar em efeitos sistêmicos indesejáveis. Vários sistemas diferentes de terapia local (como balões perfurados, *stents* recobertos com polímeros, etc) têm sido testados em animais de experimentação⁴⁵⁻⁴⁶. Utilizando um cateter-balão de angioplastia coronária recoberto com um hidrogel de ácido poliacrílico e impregnado com PPACK, demonstramos que a terapia antitrombótica pode ser efetivamente administrada localmente, sem nenhum efeito deletério nos parâmetros de coagulação³⁸. Além disso, recentemente também demonstramos que mesmo antitrombinas menos específicas e potentes (como a heparina) podem ser altamente efetivas quando administradas localmente⁴⁷.

Perspectivas para o Futuro

Várias novas soluções visando o controle das complicações da angioplastia têm sido pesquisadas e os modelos de experimentação animal representam um estágio

importante no processo de desenvolvimento destes novos agentes terapêuticos. Novos compostos antiproliferativos mais potentes e o desenvolvimento de anticorpos contra mitógenos específicos (como fator de crescimento dependente das plaquetas, fator de crescimento dos fibroblastos, interleukina-1, etc) podem ter um impacto significativo na diminuição da resposta proliferativa ocasionada pela dilatação arterial com cateter-balão. Da mesma forma, novas antitrombinas e agentes antiplaquetários podem contribuir para a redução da formação de trombo pós-angioplastia coronária. A ausência de efeitos sistêmicos significativos e a possibilidade de se obter altas concentrações locais, fazem da terapia local uma forma extremamente atraente de administração destes novos agentes. Entretanto, um grande desafio a ser ainda vencido diz respeito ao aperfeiçoamento dos sistemas de terapia local a fim de torná-los clinicamente úteis.

A terapia genética é outra área que tem despertado considerável interesse. Vários protocolos de terapia genética têm sido empregados para a transfecção de células musculares lisas tanto *in vitro* quanto *in vivo* (em artérias periféricas de animais de experimentação) e com resultados promissores^{48,49}. Gens capazes de bloquear determinados sinais de transdução intracelulares talvez possam, no futuro, ser transferidos para a região do vaso submetida à dilatação e, desta forma, bloquear a síntese de mitógenos e inibir a proliferação de células musculares lisas.

Em conclusão, é importante ressaltar que, independente da estratégia empregada, a experimentação em modelos animais continuará desempenhando um papel importante na busca de soluções para os dois maiores problemas associados à angioplastia coronária, reestenose e oclusão aguda. A escolha de modelos animais adequados e com biologia semelhante à humana e, principalmente, a avaliação da eficácia de novos agentes terapêuticos em vários modelos animais diferentes, deve ser uma etapa essencial na seleção de potenciais candidatos a serem testados em estudos clínicos¹⁵.

Referências

- Gruentzig AR - Transluminal dilatation of coronary artery stenosis (letter to the editor). *Lancet*, 1978; 1: 263.
- Ellis SG, Roubin GS, King SB III et al - Angiographic and clinical predictors of acute closure after native vessel coronary angioplasty. *Circulation*, 1988; 77: 372-9.
- Feyter PJ, Brand M, Jaarman G, Domburg R, Serruys PW, Suryapranata H - Acute coronary occlusion during and after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Circulation*, 1991; 83: 927-36.
- Cowley M, Dorros G, Kelsey S, Vam Raden M, Detre KM - Acute coronary events associated with percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am J Cardiol*, 1984; 53: 12C-16C.
- Serruys PW, Luijten HE, Beatt KJ et al - Incidence of restenosis after successful coronary angioplasty: A time-related phenomenon A quantitative angiographic study in 342 consecutive patients at 1,2,3 and 4 months. *Circulation*, 1988; 77: 361-71.
- Nobuyoshi M, Kimura T, Nosaka H et al - Restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty: Serial angiographic follow-up of 229 patients. *J Am Coll Cardiol*, 1988; 12: 616-23.
- Margolis JR, Krauthamer D, Litvack F et al - Six month follow-up of Excimer Laser Coronary Angioplasty Registry Patients. *J Am Coll Cardiol*, 1991; 17(supl A): 218A.
- Mast G, Plokker T, Bal E, Ernest S, Gin MTJ, Ascoop C - Laser balloon angioplasty does not reduce restenosis rate in type A and B coronary lesions. *Circulation*, 1990; 82(supl III): III-313.
- Sketch MH, O'Neil WW, Galichia JP et al - The Duke Multicenter coronary transluminal extraction-endarterectomy registry: Acute and chronic results. *J Am Coll Cardiol*, 1991;17(supl A): 31A.
- The Caveat Investigators. The Coronary Angioplasty Versus Excisional Atherectomy Trial(CAVEAT): Preliminary results. *Circulation*, 1992; 86(supl I): I-374.
- Warth DC, Bertrand M, Buchbinder M, Dietz U, Fourrier JL, Zacca N - Percutaneous transluminal coronary rotational ablation: Six month restenosis rate. *Circulation*, 1991; 84(supl II): II-82.
- Ellis SG, Savage M, Fischman D et al - Restenosis after placement of Palmaz-Schatz stents in native coronary arteries: Initial results of a multicenter experience. *Circulation*, 1992; 86: 1836-44.
- Haudenschild CC - Restenosis-Basic considerations. In: Topol EJ, ed - *Textbook of Interventional Cardiology*. Philadelphia: WB Saunders, 1989; 344-62.
- Muller DWM, Ellis SG, Topol EJ - Experimental models of coronary artery restenosis. *J Am Coll Cardiol*, 1992; 19: 418-32.
- Ferrel M, Fuster V, Gold HK, Chesebro JH - A dilemma for the 1990s: Choosing appropriate experimental animal model for the prevention of restenosis. *Circulation*, 1992; 85: 1630-1.
- Califf RM, Ohman EM, Frid DJ et al - Restenosis: The clinical issues. In: Topol EJ, ed - *Textbook of Interventional Cardiology*. Philadelphia: WB Saunders, 1989: 363-394.
- Ellis SG, Muller DWM - Arterial injury and the enigma of coronary restenosis. *J Am Coll Cardiol*, 1992; 19: 275-7.
- Karas SP, Gravanis MB, Santoian EC, Robinson KA, Anderberg KA, King SB III - Coronary intimal proliferation after balloon injury and stenting in swine: An animal model of restenosis. *J Am Coll Cardiol*, 1992; 20: 467-74.
- Steele PM, Chesebro JH, Stanton AW, Holmes DR Jr, Dewwanjee MK, Badimon L, Fuster V - Balloon angioplasty: Natural history of the pathophysiological response to injury in a pig model. *Circ Res*, 1985; 57: 105-12.
- French JE, Jennings MA, Florey HW - Morphological studies on atherosclerosis in swine. *Ann NY Acad Sci*, 1965; 127: 780-94.
- Fuster V, Fass DN, Kaye MP, Josa, Zimmerman A, Bowie - Arteriosclerosis in normal and von Willenbrandt pigs: long-term prospective study and aortic transplantation study. *Circ Res*, 1982; 51: 587-93.
- Schwartz RS, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vliestra RE, Holmes DR - Restenosis after balloon angioplasty: a practical proliferative model in porcine coronary arteries. *Circulation*, 1990; 82: 2190-200.
- Jackson CL, Bush RC, Bowyer DE - Inhibitory effect of calcium antagonists on balloon catheter-induced arterial smooth muscle cell proliferation and lesion size *Atherosclerosis*, 1988; 69: 115-22.
- Currier JW, Pow TK, Haudenschild CC, Miniham AC, Faxon DP - Low molecular weight heparin (enoxaparen) reduces restenosis after iliac angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit. *J Am Coll Cardiol*, 1991; 17: 118B-125B.
- Powell JS, Clozel J-P, Muller RKM et al - Inhibitors of angiotensin-converting enzyme prevent myointimal proliferation after vascular injury. *Science*; 1989; 245: 186-8.
- Santoian EC, Gravanis MB, Karas SP et al - Enalapril does not inhibit intimal proliferation in a normolipemic swine model of intimal hyperplasia *Circulation*, 1991; 84(supl II): II-591.
- Hanson SR, Powell JS, Dodson T et al - Effects of angiotensin converting enzyme inhibition with cilazapril on intimal hyperplasia in injured arteries and vascular grafts in the baboon. *Hypertension*, 1991; 18(supl II): II-70-II-6.
- Ellis SG, Ronbin GS, Wilentz J, Douglas JS, King SB - Effect of 18-24 hour heparin administration for prevention of restenosis after uncomplicated coronary angioplasty. *Ann Heart J*, 1989; 117: 777-82.
- The MERCATOR Study Group - Does the new angiotensin converting enzyme inhibitor cilazapril prevent restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty? Results of the MERCATOR study: A multicenter, randomized, double-blind placebo-controlled trial. *Circulation*, 1992; 86: 100-10.
- Whitworth HB, Roubin GS, Hollman J et al - Effect of nifedipine on recurrent

- stenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol*, 1986; 8: 1271-6.
31. Santoian EC, Foegh M, Gravanis MB et al - Treatment with angiopeptin inhibits development of smooth muscle cell proliferation in a balloon overstretch swine model of restenosis. *J Am Coll Cardiol*, 1992;19(supl A): A-164.
 32. Schneider JE, Berk BC, Gravanis MB et al - Probucol reduces intimal hyperplasia in a swine model of coronary injury. A possible role for antioxidants in restenosis. *Circulation*, 1993 (no prelo).
 33. Carew TE, Schwenke DC, Steinberg D - Antiatherogenic effect of probucol unrelated to its hypocholesterolemic effect: Evidence that antioxidants in vivo can selectively inhibit low density lipoprotein degradation in macrophage-rich fatty streaks and slow the progression of atherosclerosis in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; 84: 7725-9.
 34. Rao GN, Berk BC - Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res*, 1992; 70: 103-9.
 35. Lundergan CF, Foegh ML, Ramwell PW - Peptide inhibition of myointimal proliferation by angiopeptin, a somastatin analogue. *J Am Coll Cardiol*, 1991; 17: 132B-6B.
 36. Waller BF - "Crackers, breakers, stretchers, drillers, scrapers, busners, welders and melters - the future treatment of atherosclerotic coronary artery disease? *J Am Coll Cardiol*, 1989; 13: 969-87.
 37. Harker LA - Role of platelets and thrombosis in mechanisms of acute occlusion and restenosis after angioplasty. *Am J Cardiol*, 1987; 60: 20B-28B.
 38. Nunes GL, King SB III, Hanson SR, Sabotjian RA, Scott NA - Hydrogel-coated PTCA balloon catheter delivery of an antithrombin inhibits platelet-dependent thrombosis. *Circulation*, 1992; 86(supl I): I-380.
 39. Mizuno K, Satomura K, Miyamoto A et al - Angioscopic evaluation of the character of coronary thrombus in acute coronary syndrome. *N Engl J Med*. 1992; 326: 287-91.
 40. Krupski WC, Bass A, Kelly AB, Marzec UM, Hanson SR, Harker LA - Heparin-resistant thrombus formation by endovascular stents in baboons: interruption by a synthetic antithrombin. *Circulation*, 1990; 81: 570-7.
 41. Hanson SR, Kotze HF, Savage B, Harker LA - Platelet interactions with Dacron vascular grafts: A model of acute thrombosis in baboons. *Arteriosclerosis*, 1985; 5: 595-603.
 42. Harker LA, Kelly AB, Hanson SR - Experimental arterial thrombosis in nonhuman primates. *Circulation*, 1991; 83(supl IV): IV-41-IV-55.
 43. Heras M, Chesebro JH, Penny WJ, Bailey KR, Badimon L, Fuster V - Effects of thrombin inhibition on the development of acute platelet-thrombus deposition during angioplasty in pigs: Heparin versus recombinant hirudin, a specific thrombin inhibitor. *Circulation*, 1989; 79: 657-65.
 44. Kelly AB, Marzec UM, Krupski W et al - Hirudin interruption of heparin resistant thrombus formation in baboons. *Blood*, 1991; 77: 1006-12.
 45. Muller DWM, Topol EJ, Abrams GD, Gallagher KP, Ellis SG - Intramural methotrexate therapy for the prevention of neointimal thickening after balloon angioplasty. *J Am Coll Cardiol*, 1992; 20: 460-6.
 46. Murphy JG, Schwartz RS, Edwards WD, Camrud AR, Vliestra RE, Holmes DR - Percutaneous polymeric stents in porcine coronary arteries: Initial experience with polyethylene terephthalate stents. *Circulation*, 1992; 86: 1596-604.
 47. Nunes GL, Hanson SR, King III SB, Sabatjian RA, Barys JJ, Scon NA - Local heparin delivery with a hydrogel-coated PTCA balloon catheter inhibits platelet-dependent thrombosis. *J Am Coll Cardiol*, 1993; 21(supl A): 117A.
 48. Lynch CM, Clowes MM, Osborne WRA, Clowes AW, Miller AD - Long-term expression of human adenosine deaminase in vascular smooth muscle cell of rats: A model for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; 89: 227-31.
 49. Mazur W, Ali M-N, Finnigan JP et al - Direct gene transfer into the coronary arteries of intact animals via infusion balloon catheters: Comparison of canine and porcine model systems. *J Am Coll Cardiol*, 1993; 21(supl A): 186A.