

# ***Modelo bioexperimental de indução de proliferação neointimal vascular em suínos***

JOICE CRISTIANE BENETTI<sup>1</sup>

ALCIDES JOSÉ ZAGO<sup>2</sup>

ALEXANDRE DO CANTO ZAGO<sup>2</sup>

PAULO RICARDO CENTENO RODRIGUES<sup>3</sup>

BEATRIZ GUILHEMBERNARD KOSACHENCO<sup>3</sup>

MARCO AURÉLIO GHILOSSO BORTOLINI<sup>4</sup>

SANDRO P. RAMOS<sup>4</sup>

JOSÉ JESUS CASCO RAUDALES<sup>5</sup>

## **RESUMO**

*O objetivo do presente trabalho foi desenvolver um modelo experimental de indução de proliferação neointimal vascular (reestenose) em suínos, fenômeno frequentemente observado após a realização de intervenções coronarianas percutâneas em humanos (angioplastia e implante de stents). Para isso foi criado um laboratório de hemodinâmica experimental no Hospital Veterinário da ULBRA com o intuito de desenvolver e implementar tal modelo, visando a criação de técnicas de lesão vascular simuladores de reestenose, através do implante de endopróteses (stents) sobre-dimensionados. Concomitante a esse objetivo o modelo servirá para desenvolver métodos e técnicas para tratar, prevenir ou até mesmo impedir a reestenose. Na fase inicial foram operados 7 suínos jovens, implantando pelo menos dois stents em cada*

---

<sup>1</sup>Acadêmica do Curso de Enfermagem/ULBRA

(CPC)/ULBRA

<sup>2</sup>Professor do Curso de Medicina/ULBRA, médico cardiologista intervencionista

<sup>5</sup>Professor - Orientador do Curso de Medicina e Coordenador do Centro de Pesquisa Cardiovascular (CPC) da ULBRA (jose.raudaes@ulbra.br)

<sup>3</sup>Professor do Curso de Medicina Veterinária/ULBRA

<sup>4</sup>Pesquisadores do Centro de Pesquisa Cardiovascular

animal, seguido de re-intervenção em 28 dias com avaliação ultrasonográfica e por histologia virtual e teste de algumas drogas anti-proliferativas. O índice de reestenose assim obtido foi de 93,3%.

**Palavras-chave:** reestenose, angioplastia coronária, stents, ultra-som.

## ABSTRACT

The aim of this research was to create an experimental porcine model of induced vascular neointimal hyperproliferation (restenosis), an adverse event frequently observed after percutaneous coronary interventions (angioplasty and stent deployment) in human beings. For this reason an experimental hemodynamic laboratory at the Veterinarian Hospital of ULBRA was built, looking for the development and application of such model to cause vascular lesions that could simulate restenosis through oversized stent placement. Besides, we also intend to test some techniques for treating, preventing and even stopping restenosis development. In the initial phase, seven young pigs underwent at least, two oversized stent placement. The animals were followed by a 28-day periods; by this time ultrasound and virtual histology evaluation were done; some drugs with anti-proliferative properties were tested too. The overall restenosis rate was 93.3%.

**Key words:** restenosis, coronary angioplasty, stents, ultrasound.

## INTRODUÇÃO

A proliferação neointimal vascular (reestenose) é um fenômeno freqüentemente observado após a realização de intervenções coronarianas percutâneas em humanos (angioplastia e implante de stents). O objetivo do presente trabalho foi desenvolver um modelo experimental *in-vivo* de indução de proliferação neointimal vascular (reestenose) em suínos. De fato, dos múltiplos modelos experimentais em animais (canino, murino, ovino, e suíno), o modelo suíno apresenta características anátomo-morfo-funcionais mais correlatas com as características humanas. Assim, inúmeros estudos bioexperimentais têm demonstrado que a resposta hiperproliferativa caracterizada pela formação de neointima decorrente de lesão do endotélio vascular em suínos é histologicamente

similar àquela observada na reestenose intravascular humana.

O modelo suíno foi descrito originalmente em 1990 por Schwartz et al. (1990) usando stents metálicos sobredimensionados implantados nas artérias coronárias (isentas de lesões obstrutivas) de suínos jovens, observando a formação de neointima espessa em 28 dias. Uma resposta celular trifásica, tempo-dependente acontece:

1. Trombose mural focal induzida pelo stent, evidente nas primeiras 24 h.
2. Infiltrado celular inflamatório, com pico aos 7 dias, mas ainda evidente aos 28 dias. Este infiltrado consiste de trombo organizado de fibrina, células musculares lisas (SMC's), neutrófilos e macrófagos, contribuindo na formação

de neointima que já é evidente nesta fase.

3. A fase proliferativa, formada basicamente por SMC's, monócitos e macrófagos. O pico máximo de proliferação é de até 7 dias, mas esta continua até os 28 dias.

De igual maneira, as artérias coronárias suínas são bastantes similares às humanas, no entanto apresentam menos circulação colateral. O tronco da coronária esquerda bifurca, originando as artérias descendente anterior esquerda e circunflexa, esses vasos têm diâmetro similar às coronárias humanas (2 – 4 mm). A artéria coronária direita é de calibre similar à humana, porém menos dominante.

Este trabalho objetivou desenvolver e implementar modelo bioexperimental de indução de hiperproliferação neointimal em suínos visando a criação de técnicas de lesão vascular simuladores de reestenose; desenvolver métodos e/ou técnicas para tratar, prevenir ou até mesmo impedir essa complicação, frequentemente observada após a realização de intervenções coronarianas; estudar o impacto das endopróteses intra-coronárias na interfase endotélio/superfície biocompatível e estudar o efeito de drogas inibidoras da reestenose (novas ou de uso comum).

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados suínos jovens da raça Large White, com peso aproximado inicial de 40 a 45 kg, todos adquiridos preferencialmente no mesmo local. Após de seguido o protocolo de lesão vascular (Seção e.) os animais foram observa-

dos (período de recuperação) durante pelo menos 04 semanas (28 dias), tempo suficiente para o desenvolvimento da neointima no local da injúria vascular. No período de recuperação, os animais foram mantidos em biotério e alimentados normalmente. Todos os procedimentos foram realizados respeitando-se as normas gerais de assepsia e anti-sepsia e guiando-se pelos protocolos de pesquisa animal. Devido ao fato de implantarmos próteses dentro do leito vascular, se fez necessário o uso de drogas antiplaquetárias e antitrombóticas: ácido acetilsalicílico (AAS, 100 mg/dia) e clopidogrel (Plavix® ou Iscover® 37,5 mg/dia).

Os suínos foram estudados novamente por ultra-som intracoronário (IVUS) com histologia virtual 28 dias após o implante das próteses intracoronárias. Nesta nova intervenção também foi realizada angioplastia convencional (para tratamento da reestenose) e aplicada droga experimental. Após outros 28 dias foi realizado novo ultra-som intracoronário com histologia virtual e análise histológica da artéria coronária (salientamos que por ocasião desta publicação nem todos os animais tinham completado os períodos do estudo).

A pré-anestesia foi realizada com acepromazina (0,1 mg/kg IM); midazolam (0,5 mg/kg IM), azaperone (2 mg/kg IM) e atropina (0,044 mg/kg IM). A indução foi feita com uma solução comercial de tiletamina e zolazepam 10% (4 mg/kg IV), seguida de intubação endotraqueal e ventilação mecânica com O<sub>2</sub>. A anestesia geral foi mantida com isoflurano via vaporizador universal ao efeito. A partir deste momento, o animal foi monitorado através de monitor modulado programável (pressão invasiva, ECG de superfície, temperatura e oximetria de pulso).

A abordagem vascular foi realizada através de incisão cirúrgica por planos nas regiões femoral ou cervical escolhidas, seguida de dissecação vascular (arteriotomia) das artérias femorais comuns ou carótidas externas (direita ou esquerda). Uma vez exposta a artéria, esta foi puncionada pela técnica de Seldinger modificada, seguida da colocação de uma bainha arterial 7F. Conseguindo o acesso vascular, procedeu-se à administração sistêmica de heparina, na dosagem de 100 – 200 UI/kg IV, repetindo a dose se necessário. A equipe médica adotou também o uso profilático de antiarrítmicos (amiodarona 3 - 6 mg/kg IV) e antibióticos (cefalotina 1 g IV). Após finalizado o procedimento planejado, a artéria foi suturada, os planos anatômicos foram fechados e a pele fechada com sutura subcutânea (pela dificuldade da retirada de pontos com a sutura convencional em animal não-anestesiado).

Para o protocolo de cateterismo foi utilizado equipamento diagnóstico e terapêutico de uso humano de forma bastante adequada em suínos; de igual maneira, foram utilizados os mesmos protocolos e princípios do cateterismo cardíaco e da intervenção percutânea terapêutica em humanos. Para realizar as angiografias coronárias, os implantes de stents e as angioplastias, bem como a colocação dos cateteres de ultra-som e histologia virtual, utilizamos um aparelho de cineangiografia (hemodinâmica) da marca Phillips modelo Angio Diagnost 5; para as análises ultrasonográficas e de histologia virtual foi utilizado um aparelho da Volcano Therapeutic Inc. As imagens foram gravadas e digitalizadas, sendo posteriormente armazenadas em discos compactos (CD's). Em geral, quando a abordagem planejada foi pela artéria femoral, utilizamos cateteres do tipo JR4, alternativamente usamos

algumas curvas especiais como AL1.75, AR1 e SR, este último quase que foi o cateter de escolha na maioria dos procedimentos, em função das características anatômicas particulares do arco aórtico dos suínos.

Para gerar quantidades comparáveis de placa (reestenose) nos tecidos suínos sadios, se faz necessária a sobredistensão vascular em torno de 30% a 50% (ECKHARD et al., 2000). Por esse motivo, o protocolo de lesão vascular exigiu o uso de um stent maior que o diâmetro de referência do vaso, isto significa uma relação 1,4:1 entre o dispositivo e o vaso. O protocolo utilizado foi o seguinte:

- 1 O diâmetro do dispositivo implantado (stent) foi de 40% a 50% maior do que o diâmetro de referência do vaso (3,0 a 3,5 mm), com 16 a 20 mm de comprimento
- 2 Número de insuflações: 2
- 3 Tempo de cada insuflação: 35 seg
- 4 Pressão utilizada: 16 a 25 atm
- 5 Intervalo entre as insuflações: 30 seg

Caso a eutanásia fosse indicada ou necessária para os fins da bioexperimentação, esta foi realizada através da injeção de pentobarbital sódico (60 mg/kg IV) ou de Sleepway® 10 ml IV em veia periférica.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

De Agosto de 2006 a Novembro de 2006, sete suínos foram incluídos no estudo. Os animais foram anestesiados, cateterizados e

produzida a lesão vascular conforme o protocolo de pesquisa (Vide Material e méto-

dos). Os resultados iniciais foram os seguintes (Tabela 1):

**Tabela 1** - Resultados iniciais

<i>Identificação</i>	<i>Procedimentos</i>	<i>Stents</i>	<i>IVUS*</i>	<i>ACTP**</i>	<i>Droga</i>	<i>Desfecho</i>
Brinco 57	02	02	02	02	Sim	Óbito***
Brinco 58	03	02	03	02	Sim	Vivo
Brinco 59	02	03	02	03	Sim	Sacrificado <sup>†</sup>
Brinco 60	02	02	0	02	Não	Óbito <sup>‡</sup>
Brinco 62	03	02	03	02	Sim	Vivo
Brinco 63	03	02	03	02	Sim	Vivo
Brinco 121	02	02	02	02	Sim	Vivo
<b>Total</b>	<b>17</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>9</b>	

\*IVUS denota ultra-som intravascular

\*\*ACTP denota angioplastia coronária transluminal percutânea

\*\*\*Óbito na 3 intervenção X peritonite

<sup>†</sup>Sacrificado para análise histo-química

<sup>‡</sup>Óbito na 2 intervenção X arritmia

Nos sete animais foram realizadas intervenções múltiplas que incluíram implante de stents (n=15), análise por IVUS (n=15), angioplastia convencional por cateter balão (n=15) e infusão local de drogas experimentais (n=9). Dois suínos foram à óbito: um por apresentar peritonite aguda por ocasião da terceira intervenção (a causa não foi determinada) e outro por arritmia ventricular maligna sem resposta ao tratamento convencional (provável embolia ou trombose intra-coronária). Um terceiro animal foi sacrificado para realizar análise histo-química das artérias coronárias.

No seguimento aos 28 dias, foram realizadas angioplastias com cateter balão convencional para o tratamento da reestenose, seguidas de avaliação pelo IVUS para quantificar o resultado final. Também foram testadas algumas drogas experimentais para avaliar seus possíveis efeitos anti-proliferativos. As análises por angiografia coronária e pelo ultra-som intravascular demonstraram que em 14 dos 15 stents implantados, houve crescimento neointimal significativo (reestenose), perfazendo assim uma taxa de reestenose global de 93,3 %.

A implementação deste modelo foi um grande desafio para todos os membros da equipe de pesquisa, pois houve a necessidade de adaptar ou modificar as técnicas de cateterismo cardíaco e intervenção em humanos para poderem ser aplicadas satisfatoriamente no modelo animal, também houve uma adaptação recíproca da equipe de veterinários para trabalhar com este tipo de intervenção (percutânea). Embora o modelo mostrou ser funcionalmente adequado para criar e tratar a reestenose, a técnica experimental é mais complexa e de mais alto custo se comparada com o modelo humano, principalmente em três pontos: 1) Os equipamentos, aparelhos e materiais utilizados são os mesmos de uso humano (não existindo equivalentes comerciais para uso veterinário); 2) Nos suínos se faz necessário o uso de anestesia geral enquanto que, em humanos os procedimentos são executados com anestesia local e; 3) O modelo animal exige a dissecação vascular no local de entrada (artéria profunda e dificuldade de compressão vascular após de realizado o procedimento), já em sujeitos humanos a simples punção vascular (sem a necessidade de reparo cirúrgico) é suficiente.

## CONCLUSÕES

O modelo experimental foi bem sucedido, pois obtivemos índices de reestenose de 93,3%. Embora o modelo funcione adequadamente, a técnica experimental é mais complexa e de mais alto custo se comparada com a equivalente humana (já que foram utilizados aparelhos, equipamentos e materiais de uso humano e a necessidade tanto de anestesia geral como de dissecação vascular nos suínos versus anestesia local e punção vascular em humanos, de custos bem menores). Finalmente, como o objetivo principal do projeto era desenvolver modelo bioexperimental de reestenose, os efeitos das drogas anti-proliferativas testadas serão divul-

gados em trabalhos posteriores, por encontrarse estes ainda em fase de análise.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ECKHARD, A, et al. Inhibition of neointimal formation after experimental coronary artery stenting. **Circulation**, v.101, p.1453-1458, 2000.

SCHWARTZ, R.S.; MURPHY, J.; EDWARDS WD. et al. Restenosis after balloon angioplasty: a practical proliferative model in porcine coronary arteries. **Circulation**, v. 82, p. 2190-2200, 1990.