

**RADIOLOGIA
BRASILEIRA**

RIB

ÓRGÃO CIENTÍFICO DO COLÉGIO
■ BRASILEIRO DE RADIOLOGIA ■

Indução de aneurisma em aorta abdominal de rato

Alex Lederman¹, Gerd Schreen¹, Maria de Fátima M. Ribeiro², Léa Maria Macruz Ferreira da Silva³, Giovanni Guido Cerri⁴, Eduardo Toledo de Aguiar⁵

O objetivo do trabalho foi criar um modelo experimental animal de indução de aneurisma em aorta abdominal, identificando qual a droga e técnica de escolha, para a pesquisa de patogenia e tempo de desenvolvimento do aneurisma. Foram utilizados 48 ratos Wistar machos adultos, que foram submetidos a laparotomia mediana com aplicação das drogas de forma intraluminal ou periarterial. As drogas utilizadas foram cloreto de cálcio a 0,9 ou 5,0 molar (M) e cloreto de sódio 0,9% ou 7,5%. O trabalho foi realizado em duas etapas, nas quais se procurou identificar a melhor droga na primeira etapa e a melhor técnica na segunda. Vinte e sete ratos foram divididos em grupos de três animais cada, variando a droga e a metodologia de aplicação na primeira etapa. Na segunda etapa utilizaram-se dois grupos com dez animais em cada, usando-se a solução de cloreto de cálcio a 5,0M com aplicação periarterial ou intraluminal. Em ambas as fases os ratos foram submetidos a exames de mapeamento ultra-sonográfico dúplex (doppler colorido) para controle. Na primeira etapa os animais foram sacrificados após 30, 45 ou 60 dias e na segunda, após 90 dias, quando retirou-se a aorta abdominal infra-renal para estudo anatomopatológico. Os resultados obtidos na primeira etapa indicaram ser o cloreto de cálcio a melhor droga para induzir aneurismas. Na segunda etapa observou-se que até o 60º dia de pós-operatório havia dilatação do vaso, identificando, ainda, a aplicação intraluminal como o melhor método. Assim, concluímos que a solução de cloreto de cálcio destrói a camada elástica, favorecendo o aparecimento de aneurisma macroscopicamente visível com 60 dias de pós-operatório. *Unitermos: Aneurisma. Aorta. Ultra-som.*

Lederman A, Schreen G, Ribeiro MFM, Silva LMMF, Cerri GG, Aguiar ET. Indução de aneurisma em aorta abdominal de rato. *Radiol Bras* 1996;29:189-193.

INTRODUÇÃO

Aneurisma é a dilatação anormal de uma artéria. Na parede do aneurisma verifica-se que a camada elástica e muscular arterial é substituída por uma camada de colágeno e, com frequência, são encontradas lesões ateroscleróticas calcificadas. Essa parede é delgada e pouco resistente. A face interna da parede do aneurisma é revestida por trombo laminado, cujo depósito concêntrico deixa a luz de calibre quase igual ao do vaso normal por onde corre o fluxo sanguíneo⁽¹⁾. À medida que dilatam, os aneurismas se alongam, o que os faz ficar tortuosos e arqueados. Além dos aspectos morfológicos, são relatadas alterações bioquímicas nas paredes de aneurismas humanos, tais como quantidades reduzidas de elastina e colágeno na parede vascular⁽²⁾. As propriedades mecânicas desses tecidos conjuntivos determinam as características de distensibilidade das artérias íntegras⁽³⁻⁵⁾.

Os aneurismas de aorta abdominal constituem a 13ª causa de morte nos EUA, sendo responsáveis por aproximadamente 15.000 óbitos por ano⁽⁶⁾. É válido mencionar que a incidência está aumentando, assim como o índice de mortalidade associado. Melton e cols. observaram aumento de sete vezes, de 1951 a 1980, em uma comunidade de Minnesota⁽⁷⁾. Provavelmente, parte desse aumento deve-se a melhores recursos diagnósticos porque foi visto maior aumento nos pequenos aneurismas assintomáticos, e parte pode ser secundária ao envelhecimento da população.

Estudos recentes documentaram forte componente genético para essa doença. Foram observadas alterações bioquímicas que permitem o aparecimento dos aneurismas aórticos, incluindo elastólise e colagenólise. No momento, permanece ainda imprecisa a etiopatogenia exata da doença aneurismática⁽⁸⁾, o que justifica o desenvolvimento de modelos experimentais para o estudo dessa patologia.

Vários modelos de indução são citados na bibliografia⁽⁹⁻¹¹⁾. Entre os principais métodos encontram-se os aneurismas induzidos por transplantes alográficos, por lesões à túnica média através de traumas mecânicos e químicos (aplicação periarterial de cloreto de cálcio a 0,5M ou o uso de enzimas), ou mesmo por meio de traumas pelo uso de laser. Porém, os modelos utilizando drogas para a indução são os métodos menos invasivos, com bons resultados⁽⁹⁾. Em nosso estudo optamos por utilizar drogas de fácil obtenção e de baixo custo, com resultado já

1. Acadêmicos da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) - SP.

2. Bióloga da Unidade do Fígado do Hospital das Clínicas da FMUSP.

3. Patologista do Instituto do Coração do HC-FMUSP.

4. Chefe do Departamento de Diagnóstico por Imagem do Instituto do Coração do HC-FMUSP.

5. Professor Doutor da Disciplina de Cirurgia Vascular do Departamento de Cirurgia da FMUSP.

Endereço para correspondência: Dr. Alex Lederman. Rua José Maria Lisboa, 480, apto. 171, Jd. Paulista. 01423-908 São Paulo - SP.

Recebido para publicação em 2/4/1996. Aceito em 22/4/1996.

referido na bibliografia, comparando o método já descrito com a aplicação intraluminal do cloreto de cálcio e de outras drogas.

Objetivo

Criação de um modelo animal experimental de indução e desenvolvimento de aneurismas arteriais em aorta abdominal de ratos, identificando qual a droga e técnica de escolha, para a pesquisa de patogenia e tempo de desenvolvimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 48 ratos Wistar machos, adultos, de peso variando entre 320 e 480 g. As drogas utilizadas foram cloreto de sódio (NaCl) a 0,9% e 7,5% e cloreto de cálcio (CaCl_2) a 0,9 e 5,0M.

O agente anestésico utilizado em todo o procedimento foi o éter etílico. Inicialmente o rato foi colocado numa cuba de vidro com tampa contendo um chumaço de gaze embebida em éter, onde permaneceu por cerca de 15 minutos, até ficar imóvel. Retirado rapidamente, o rato foi pesado e levado à mesa de cirurgia. Colocado em decúbito dorsal, foi posicionado o "capacete" plástico contendo outro chumaço de gaze com éter para mantê-lo anestesiado. Em seguida, as patas foram fixadas e foi feita a tricotomia abdominal.

Com uma incisão longitudinal mediana de 8 cm a partir do apêndice xifóide, foram rebatidos lateralmente os intestinos para melhor visualização do campo de trabalho. Localizada a aorta, fez-se a dissecação e isolamento desta entre a artéria renal esquerda e a bifurcação das artérias ilíacas. As drogas foram aplicadas dentro da luz do vaso (intraluminal) ou ao redor do vaso (periarterial).

Nos grupos intraluminais (1,2,3,4, o primeiro rato do grupo 9 e os ratos de 29 a 32 e de 37 a 42), após a dissecação e isolamento, a aorta foi clampeada logo abaixo da artéria renal esquerda e acima das artérias ilíacas. Foi injetado 0,03 ml da droga para cada grupo e mantido assim por 15 minutos. Ao se retirar a agulha do ponto de injeção, foram soltos os "clamps", havendo sangramento controlado por compressão digital.

Para os grupos periarteriais (5,6,7,8, os dois últimos ratos do grupo 9 e os ratos de 33 a 36 e de 43 a 48), foi desenvolvida uma cuba de imersão de plástico com 11 mm de diâmetro. Após o isolamento e clampeamento arterial, a cuba foi colocada com um pouco de algodão por debaixo da artéria e gotejado 0,05 ml da droga de cada grupo por cima e mantido assim por 15 minutos. Após esse tempo, retirou-se a cuba e soltaram-se os "clamps".

Os ratos foram fechados após reposicionamento dos intestinos com sutura contínua de fio de algodão 2-0 em plano único, e após a operação foram mantidos em biotério com temperatura e umidade ambientes, em gaiolas individuais com água e comida *ad libitum*.

A distribuição dos ratos foi feita de acordo com a seguinte divisão:

- Na primeira etapa do trabalho, segundo os grupos:
- 1 – três ratos (1, 2 e 3) com aplicação intraluminal de CaCl_2 à concentração de 0,9M;
 - 2 – três ratos (4, 5 e 6) com aplicação intraluminal de CaCl_2 à concentração de 5,0M;
 - 3 – três ratos (7, 8 e 9) com aplicação intraluminal de NaCl à concentração de 0,9%;
 - 4 – três ratos (10, 11 e 12) com aplicação intraluminal de NaCl à concentração de 7,5%;
 - 5 – três ratos (13, 14 e 15) com aplicação periarterial de CaCl_2 0,9M;
 - 6 – três ratos (16, 17 e 18) com aplicação periarterial de CaCl_2 5,0M;
 - 7 – três ratos (19, 20 e 21) com aplicação periarterial de NaCl 0,9%;
 - 8 – três ratos (22, 23 e 24) com aplicação periarterial de NaCl 7,5%;
 - 9 – três ratos (25, 26 e 27) como controles, nos quais foi feito todo o procedimento cirúrgico, porém sem aplicação de drogas.

O rato de número 28 foi utilizado como rato de controle radiológico e anatomopatológico, não sendo manipulado.

Na segunda etapa do trabalho, a divisão foi feita em dois grupos com dez animais em cada. Utilizou-se somente a solução de CaCl_2 a 5,0M. Nos ratos 29, 30, 31, 32, 37, 38, 39, 40, 41 e 42, utilizou-se a aplicação intraluminal. Nos ratos 33, 34, 35, 36, 43, 44, 45, 46, 47 e 48, utilizou-se a aplicação periarterial.

O acompanhamento da evolução foi feito com exames de mapeamento ultra-sonográfico dúplex (doppler colorido), por meio do qual puderam ser identificadas alterações na parede e no calibre da aorta dos animais, indicando o desenvolvimento do aneurisma. Os exames ultra-sonográficos foram realizados com intervalos de aproximadamente 15 dias durante a primeira etapa, e com 60, 75 e 90 dias de pós-operatório na segunda etapa.

Na primeira etapa, um rato de cada grupo foi sacrificado após 30 (± 3) dias, outro após 45 (± 3) dias e o último de cada grupo com 60 (± 5) dias após a operação. Na segunda etapa, foram sacrificados os animais com 90 (± 4) dias. Uma amostra da aorta abdominal de cada animal foi retirada para análise anatomopatológica. O espécime foi fixado em solução de formol a 10%, no míni-

mo durante 24 horas, sendo posteriormente incluído em parafina, e realizados cortes histológicos de 4 μ m de espessura. As lâminas foram coradas pelo método da hematoxilina-eosina e pelo método de Verhoeff, este último específico para a demonstração de fibras elásticas.

RESULTADOS

Os resultados da primeira etapa foram:

Com o acompanhamento feito pelo mapeamento ultrasonográfico dúplex observou-se "discreta saculação" arterial em três dos 27 casos (11,1%) – ratos 2, 15 e 18 – e espessamento de parede que variava em tamanho e espessura quanto ao tipo de droga, via de contato e período de pós-operatório em todos os ratos:

rato 2 – CaCl_2 0,9M, IL, aos 64 dias;

rato 15 – CaCl_2 0,9M, PA, aos 65 dias;

rato 18 – CaCl_2 5,0M, PA, aos 33 dias.

Durante a dissecação para a retirada da porção arterial observaram-se alterações significativas nos seguintes ratos:

rato 1 – CaCl_2 0,9M, IL, 52 dias \Rightarrow parede arterial esbranquiçada;

rato 2 – CaCl_2 0,9M, IL, 65 dias \Rightarrow visível saculação arterial; parede arterial esbranquiçada; elasticidade alterada com resistência ao toque;

rato 3 – CaCl_2 0,9M, IL, 31 dias \Rightarrow veia cava inferior dilatada;

rato 4 – CaCl_2 5,0M, IL, 45 dias \Rightarrow parede esbranquiçada; resistente ao toque;

rato 5 – CaCl_2 5,0M, IL, 30 dias \Rightarrow artéria rompeu-se dorsalmente à dissecação, com parede esbranquiçada; resistente ao toque e corte;

rato 6 – CaCl_2 5,0M, IL, 64 dias \Rightarrow parede esbranquiçada; resistente ao toque;

rato 8 – NaCl 0,9%, IL, 46 dias \Rightarrow parede esbranquiçada;

rato 9 – NaCl 0,9%, IL, 61 dias \Rightarrow parede esbranquiçada; ao cortá-la longitudinalmente observaram-se irregularidades na face interna;

rato 12 – NaCl 7,5%, IL, 63 dias \Rightarrow artéria esbranquiçada;

rato 16 – CaCl_2 5,0M, PA, 63 dias \Rightarrow artéria esbranquiçada;

rato 17 – CaCl_2 5,0M, PA, 51 dias \Rightarrow artéria espessa com crostas endurecidas ao toque; ao retirar-se a porção arterial, observou-se tubo calcificado internamente;

rato 18 – CaCl_2 5,0M, PA, 33 dias \Rightarrow artéria rompeu-se ao deslocamento lateral dos intestinos, com sangramento em jato; após coagulação por compressão digital, continuou-se a dissecação e no final houve outro sangramento; a parede arterial estava muito delgada, com presença de placas duras e pequenos pontos brancos na parede externa.

Com a avaliação anatomopatológica podem-se observar dois grupos de resposta:

No primeiro, as amostras se apresentaram com a camada elástica preservada (EP):

rato 7 – NaCl 0,9%, IL, 33 dias \Rightarrow EP;

ratos 10, 11 – NaCl 7,5%, IL, 32 dias, 48 dias \Rightarrow EP;

rato 14 – NaCl 0,9%, IL, 51 dias \Rightarrow EP;

ratos 20, 21 – NaCl 0,9%, PA, 45 dias, 34 dias \Rightarrow EP;

ratos 23, 24 – NaCl 7,5%, PA, 43 dias, 30 dias \Rightarrow EP;

rato 25 – sem droga, com manipulação cirúrgica, IL, 51 dias \Rightarrow EP;

ratos 26, 27 – sem droga, com manipulação cirúrgica, PA, 31 dias, 65 dias \Rightarrow EP;

rato 28 – normal, sem manipulação cirúrgica, 0 dia \Rightarrow EP.

No segundo grupo as amostras apresentaram ruptura da camada elástica (RE) e espessamento fibroso intimal (EI).

rato 1 – CaCl_2 0,9M, IL, 52 dias \Rightarrow RE/EI;

rato 2 – CaCl_2 0,9M, IL, 64 dias \Rightarrow RE/EI (* com saculação);

rato 3 – CaCl_2 0,9M, IL, 31 dias \Rightarrow RE/EI;

rato 4 – CaCl_2 5,0M, IL, 45 dias \Rightarrow EI com calcificação na íntima e média;

rato 5 – CaCl_2 5,0M, IL, 30 dias \Rightarrow EI;

rato 6 – CaCl_2 5,0M, IL, 62 dias \Rightarrow RE/EI com fibrose na camada média;

rato 8 – NaCl 0,9%, IL, 46 dias \Rightarrow RE com fibrose na camada média;

rato 9 – NaCl 0,9%, IL, 61 dias \Rightarrow RE/EI com fibrose na camada média;

rato 12 – NaCl 7,5%, IL, 63 dias \Rightarrow RE discreto;

rato 13 – CaCl_2 0,9M, PA, 31 dias \Rightarrow RE/EI;

rato 15 – CaCl_2 0,9M, PA, 65 dias \Rightarrow RE/EI discreto com congestão vascular da adventícia e presença de célula gigante tipo corpo estranho (* com saculação);

rato 16 – CaCl_2 5,0M, PA, 63 dias \Rightarrow EI;

rato 17 – CaCl_2 5,0M, PA, 51 dias \Rightarrow RE/EI com fibrose na média e calcificação na íntima;

rato 18 – CaCl_2 5,0M, PA, 33 dias \Rightarrow RE (* com saculação);

rato 19 – NaCl 0,9%, PA, 65 dias \Rightarrow EI.

Com base nos resultados da primeira etapa, optou-se por realizar uma segunda etapa, utilizando apenas a droga de melhor resultado, e observá-la por um período mais longo. Optou-se por utilizar o CaCl_2 a 5,0M, observando os animais por um período de 90 dias, uma vez que se notou a ocorrência de saculação, rompimento arterial e pontos de calcificação com essa droga.

Ao estudo ultra-sonográfico observou-se dilatação em todos os animais, sendo visível a alteração do fluxo ao

doppler, com lentificação da circulação na periferia do vaso, na porção manipulada e dilatada. Observaram-se diâmetros médios de 2,0 mm nas aortas tratadas intraluminalmente e de 2,2 mm nas aplicações periarteriais de CaCl_2 5,0M (normal: $1,2 \pm 0,2$ mm).

Apenas três ratos (30, 45 e 46) apresentaram camada elástica preservada, sendo que nos demais animais (85%) dessa etapa houve certo grau de rompimento das fibras elásticas dessa camada. Em sete animais observou-se calcificação da parede arterial (ratos 29, 31, 32, 33, 34, 35, 36). Resposta inflamatória com fibrose foi observada em 15 (75%) dos animais (ratos 29 e de 31 a 44).

DISCUSSÃO

A necessidade de um modelo experimental de aneurisma arterial se impõe a cada dia, tanto para o estudo da etiopatogenia da moléstia quanto para o estudo da terapêutica. Como foi mencionado a princípio, o aneurisma da aorta abdominal é importante causa de óbito na população acima de 50 anos⁽⁶⁾. É possível impedir a ruptura? Quais os fatores que favorecem a ruptura? Qual o tratamento mais eficaz e de menor mortalidade e morbidade? Essas perguntas ainda não têm resposta adequada e muito conhecimento pode ser obtido no laboratório.

É sabido que é possível criar aneurisma em animais de experimentação⁽⁹⁻¹¹⁾, mas ainda não temos notícia de que tenha sido feito em nosso meio. Vários métodos para a criação de aneurismas em animais de experimentação foram propostos: mecânicos, enzimáticos e por meio do cloreto de cálcio⁽⁹⁻¹¹⁾.

Este estudo demonstra que aplicando-se cloreto de cálcio 5,0M na luz da aorta é possível obter o aneurisma após aproximadamente 60 dias, o que está de acordo com a literatura^(10,11). Os métodos enzimáticos pelo uso de elastase e colagenase são bons, segundo os relatos, mas de custo muito mais alto.

Outro achado deste estudo é que a dilatação de aorta pode ser acompanhada por meio de mapeamento ultrasonográfico dúplex, o que facilita a avaliação de ensaios terapêuticos e da influência da hipertensão, por exemplo, na velocidade de crescimento e na ocorrência de ruptura.

Os exames anatomopatológicos sugerem que existe relação entre a continuidade da fibra elástica e a integridade da parede da aorta. Em todos os casos de aneurisma obtidos havia destruição da camada elástica, o que também já foi descrito por outros autores^(2,3,12).

Assim sendo, acreditamos ter conseguido, através de um método fácil, barato e útil, um modelo experimental

de aneurisma de aorta abdominal que muito pode contribuir para o conhecimento dessa doença.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que a indução do aneurisma pode ser feita experimentalmente. A droga de escolha para essa indução é o cloreto de cálcio a 5,0M. O resultado obtido independe do método de aplicação da droga, porém melhores resultados foram obtidos com aplicações periarteriais. O fator tempo de observação não alterou significativamente os resultados, uma vez que as dilatações estabilizaram por volta do 60^º pós-operatório.

Abstract. *Experimental model of aortic aneurysm in rats.*

This study's objective was to create an experimental model of aneurysm induction in laboratory rats, identifying the best drug and method used for this purpose (in terms of time and pathogeny). Forty-eight adult male Wistar rats were submitted to laparotomy, isolation of the abdominal aorta's infrarenal portion and either intraluminal or perivascular drug administration to this segment. Drugs used were sodium chloride (0.9% and 7.5%) and calcium chloride (0.9 and 5.0 molar (M)). The study was carried out in two steps: identification of the best aneurysm induction drug followed by this drug's best method of administration. In step 1, 27 rats were divided into groups of three where drug and administration method varied, whereas step 2 involved dividing the rats into two groups of 10 and comparing the results of perivascular and intraluminal administration of 5.0M CaCl_2 solution. All rats were examined using Doppler ultrasonography, being sacrificed after 30, 45 and 60 days in step 1 and after 60 days in step 2. The manipulated aortic segment of each rat was then extracted and sent for pathological analysis. Step 1 results showed that CaCl_2 was the best aneurysm formation inducer; step 2 demonstrated that the best administration method was periarterially, observing also increase of aortic diameter until 60 days after surgery. Concluding, this study shows that CaCl_2 destroys the artery's elastic layer, making macroscopically stable aneurysm development possible after 60 days.

Key words: Aneurysm. Aorta. Ultrasound.

REFERÊNCIAS

1. Glagov S. Pathology of large arteries. In: Abramson DI, Dobrin PB, eds. Blood vessels and lymphatics organ systems. New York: Academic Press, 1984:39-53.
2. Sumner DS, Hokanson DE, Strandness DE Jr. Stress-strain characteristics and collagen-elastin content of abdominal aortic aneurysms. *Surg Gynecol Obstet* 1970;130:459-66.
3. Bergel DH. The static elastic properties of the arterial wall. *J Physiol* 1961;156:445-7.
4. Dobrin PB, Canfield TR. Elastase, collagenase, and the biaxial elastic properties of dog carotid artery. *Am J Physiol* 247:H123-H131.
5. Roach MR, Burton AC. The reason for the shape of the distensibility curves of arteries. *Can J Biochem Physiol* 1957;35:681-90.
6. Silverberg E, Lubera J. Cancer statistics, 1983. New York: American Cancer Society, 1983.

7. Melton L, Bickerstaff L, Hollier L, et al. Changing incidence of abdominal aortic aneurysms: a population based study. *Am J Epidemiol* 1984;120:379-86.
8. Reilly JM, Tilson MD. Incidência e etiologia dos aneurismas da aorta abdominal. *Clín Cir Am Norte* 1989;4/89:761-8.
9. Powell J. Models of arterial aneurysm: for the investigation of pathogenesis and pharmacotherapy. A review. *Arteriosclerosis* 1991;87:93-102.
10. Gertz SD, Kurgan A, Eisenberg D. Aneurysm of the rabbit common

carotid artery induced by periarterial application of calcium chloride in vivo. *J Clin Invest* 1988;81:649-56.

11. Yapor W, Jafar J, Crowell RM. One-stage construction of giant experimental aneurysm in dogs. *Surg Neurol* 1991;36:426-30.
12. Dobrin PB. Fisiopatologia e patogenia dos aneurismas aórticos. *Clin Cir Am Norte* 1989;4/58:741-59.

Agradecimentos. Agradecemos aos professores doutores Silvano Raia, Sérgio Mies e André Beer, que cederam o laboratório para a realização deste trabalho.