

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas

ANEURISMA DE AORTA TORÁCICA:
UM MODELO EXPERIMENTAL EM SUÍNOS

RODRIGO ARGENTA

Orientador: Prof. Dr. Adamastor Humberto Pereira

Dissertação de Mestrado

2008

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas

ANEURISMA DE AORTA TORÁCICA:
UM MODELO EXPERIMENTAL EM SUÍNOS

RODRIGO ARGENTA

Orientador: Prof. Dr. Adamastor Humberto Pereira

Dissertação de Mestrado

2008

Se podes olhar, vê. Se podes ver, repara.

Livro dos Conselhos

Aos meus pais, Ivanir e Jurema, pelo amor incondicional e por acreditarem em meus sonhos.

À Daniele, minha esposa, minha cúmplice, por compartilhar os mesmos sonhos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Adamastor Humberto Pereira, pelas diretrizes seguras durante a realização deste trabalho, pelos ensinamentos transmitidos, pelo incentivo, pela oportunidade, pela confiança e pela amizade;

Aos colegas e amigos Dr. Sílvio César Perini e Dr. Celso Curcio Aveline, pelo companheirismo, generosidade e desprendimento. Sem a ajuda de vocês, o caminho seria muito difícil;

A toda a equipe do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Unidade de Experimentação Animal, pelo profissionalismo, presteza e boa vontade;

Ao Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, especialmente a Profa. Dra. Maria Isabel Edelweiss, pelo desprendimento e auxílio;

Ao Laboratório de Patologia AnatPat, do Hospital Moinhos de Vento, especialmente a Dra. Maria Francisca Torres Lopes, pela generosidade e competência no preparo das lâminas histológicas;

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela orientação e auxílio no desenvolvimento do projeto;

Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo apoio financeiro;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, especialmente a Sra. Estela Maris Araripe, pelo auxílio constante.

A todos os que estiveram envolvidos direta ou indiretamente da execução deste trabalho;

Aos amigos verdadeiros e à família, fundamentais em todas as caminhadas.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	4
AGRADECIMENTOS	5
LISTA DE ABREVIATURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	11
INTRODUÇÃO	12
1. REVISÃO DA LITERATURA	14
1.1. MODELOS ANIMAIS DE ANEURISMA DA AORTA	14
1.1.1. CARACTERÍSTICAS DOS ANIMAIS	14
1.1.2. MODELOS DE ANEURISMAS	17
1.1.3. REMENDO NA PAREDE ARTERIAL	18
1.1.4. INTERPOSIÇÃO DE ENXERTO	21
1.1.5. INDUÇÃO POR ELASTASE	21
1.1.6. DILATAÇÃO TRANSLUMINAL	22
1.1.7. TENTATIVAS INFRUTÍFERAS	23
1.2. IN VITRO	24
1.3. A BUSCA DO MODELO IDEAL	24
2. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA	26
3. OBJETIVOS	33
3.1. OBJETIVO GERAL	33
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4. ARTIGO CIENTÍFICO EM INGLÊS	34
ABSTRACT	36
INTRODUCTION	38

	8
MATERIALS AND METHODS	39
RESULTS	43
DISCUSSION	45
AKNOWLEDGMENTS	49
REFERENCES	50
TABLES	55
FIGURES	56
FIGURE LEGENDS	62
5. ARTIGO CIENTÍFICO EM PORTUGUÊS	63
RESUMO	65
INTRODUÇÃO	67
MATERIAL E MÉTODOS	69
RESULTADOS	74
DISCUSSÃO	77
AGRADECIMENTOS	82
REFERÊNCIAS	83
TABELAS	88
FIGURAS	89
LEGENDAS DAS FIGURAS	95
6. ANEXOS	96

LISTA DE ABREVIATURAS

AAT	Aneurisma de aorta torácica
DEAC-glicosamina	Poli-N-acetil-glicosamina deacetilada
PTFE	Poli-tetra-fluoretileno expandido
HE	Coloração histológica hematoxilina e eosina
HHF35	Clone específico para coloração imunohistoquímica anti-actina humana

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Diâmetros dos aneurismas e evolução do peso dos animais (1)

Números entre parênteses correspondem à numeração encontrada no artigo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A) Posicionamento do animal. B) Exposição da aorta torácica. C) Bolsa de pericárdio bovino. D) Aneurisma após a liberação do pinçamento (1)

Figura 2. Aorta torácica descendente com o aneurisma e aortografia de controle (2)

Figura 3. Ganho ponderal durante o seguimento. Diferença entre os grupos, Teste t de Student para amostras pareadas ($p < 0,05$) (3)

Figura 4. Aneurisma após conservação em formalina tamponada (4)

Figura 5. Coloração Hematoxilina-Eosina. A) Trombo mural 100x. B) Calcificação na linha de sutura 250x (5)

Figura 6. A) Processo cicatricial na parede do aneurisma, Masson, 250x. B) Miofibroblastos periadventiciais, positivos para actina, clone HHF35, 400x (6)

Números entre parênteses correspondem à numeração encontrada no artigo.

INTRODUÇÃO

O tratamento endovascular do aneurisma da aorta torácica, introduzido na década de noventa ¹, produziu impacto significativo sobre esta patologia. Suas indicações e resultados foram e continuam sendo motivo de debate ².

A rápida evolução observada nos materiais empregados e na engenharia de construção das endopróteses possibilitou seu emprego em maior variedade de configurações anatômicas o que aumentou o número de pacientes que podem se beneficiar deste método.

Estes novos dispositivos necessitam de testes de segurança e eficiência antes de sua real utilização clínica. Modelos animais têm seu lugar neste ponto do desenvolvimento das novas tecnologias. Podemos contar com modelos que representam de forma fidedigna alguns aspectos específicos da patologia, mas não encontramos modelo que represente todas as características do aneurisma da aorta observado em humanos ¹.

Além da utilização do modelo experimental no desenvolvimento de novos dispositivos, sua aplicação no treinamento dos cirurgiões tem se mostrado bastante efetiva. A transferência das habilidades adquiridas durante o treinamento em modelos experimentais pode ser aferida e já é documentada ⁴.

Um modelo ideal permitiria realizar todos os passos de um procedimento endovascular, quais sejam: punção e cateterização de artéria periférica, realização da angiografia, localização da lesão, instalação do dispositivo endovascular, controle arteriográfico pós-procedimento e finalização do mesmo.

Sabemos que a eficácia da exclusão endovascular dos aneurismas é influenciada por diversos fatores, entre eles podemos destacar as alterações na conformação tridimensional sofridas pelo saco aneurismático excluído, as forças a que o dispositivo endovascular estará constantemente submetido e o efeito dos vazamentos (endoleaks). Neste aspecto, tanto a anatomia do aneurisma antes de sua exclusão quanto a composição histológica do mesmo são fatores de grande importância.

Por se tratar de uma patologia multifatorial, a reprodução de um cenário idêntico ao observado no aneurisma aórtico humano é muito difícil. Observamos diversos modelos experimentais de aneurisma de aorta abdominal, cada um mimetizando apenas alguns aspectos semelhantes aos encontrados nos aneurismas humanos. Entre os modelos experimentais descritos, os que reúnem maior número de características de interesse são os que empregam remendos (patch) na aorta ⁴. Chama atenção o fato de somente um modelo de aneurisma de aorta torácica em animal de grande porte ter sido observado. Neste experimento, Formicci *et al* produziram um aneurisma de aorta torácica descendente em cães através de sutura de remendo sintético ⁶.

Nosso objetivo foi produzir um modelo experimental inédito de aneurisma de aorta torácica descendente em suínos, com características que possibilitem seu uso no desenvolvimento de dispositivos endovasculares e no treinamento de novos cirurgiões.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. MODELOS ANIMAIS DE ANEURISMA DA AORTA

1.1.1. CARACTERÍSTICAS DOS ANIMAIS

O objetivo primordial de um modelo experimental de aneurisma é imitar as características fisiopatológicas do aneurisma observado em humanos, quais sejam: aterosclerose, presença de trombo intra-mural, camada elástica apresentando quebras, infiltrado inflamatório nas camadas adventícia e média, além de aumento da atividade proteolítica na parede do aneurisma.

Um animal que apresentasse aneurisma degenerativo da aorta poderia ser observado e usado em testes terapêuticos, entretanto, entre as espécies animais, a ocorrência natural de doença aneurismática é muito rara. Ruptura de aorta em decorrência de aneurisma e dissecção foi observada em algumas linhagens de perus e foi descrita por Gresham ⁷. Estes animais também apresentavam formação precoce de placa de ateroma e hipertensão arterial. Isto reforça a idéia de que, para se estudar qualquer intervenção em aneurismas de animais experimentais, é preciso primeiro produzir um aneurisma.

A indução genética de aneurismas em roedores (blotchy mouse), baseado na deficiência das ligações cruzadas de elastina e colágeno produz um aneurisma que tem semelhanças histopatológicas ao observado em humanos, com fragmentação das fibras elásticas e infiltração inflamatória nas camadas média e adventícia ⁸.

Aneurismas também podem ser produzidos através da depleção homozigótica do gene para apolipoproteína E em roedores (knockout mice), resultando em formação de placa aterosclerótica e fragmentação de fibras elásticas⁹.

Animais experimentais de dimensões reduzidas, como é o caso dos roedores ou mesmo dos perus não se prestam para experimentos cirúrgicos ou endovasculares por razões bem claras, quais sejam, a escala dos materiais e a grande diferença da fisiologia cardiovascular destas espécies. Estes dois pontos parecem contrapor as semelhanças histológicas observadas.

A escolha do animal experimental é de crucial importância, pois além das características inerentes às espécies, no que diz respeito ao manejo, ganho ponderal, tamanho e custo. As respostas à lesão vascular também são diferentes entre as espécies, assim como seus sistemas de fibrinólise e coagulação. Deste modo, vieses importantes podem ser gerados se estas características não forem observadas. Estudos comparativos demonstraram que o sistema fibrinolítico e de coagulação de primatas não-humanos tem mais similaridade com o humano quando comparado com o de cães e suínos¹⁰. No entanto, a utilização de primatas em experimentação tem se tornado difícil em função de entraves éticos.

Os animais utilizados com maior frequência para a criação de modelos de aneurismas arteriais são os suínos, cães e, raramente, ovinos.

Os cães são os animais utilizados na maior parte dos experimentos. Fatores como a facilidade para realizar testes repetidos não invasivos, o crescimento limitado e a adequação das dimensões de artérias periféricas são características que certamente influenciaram nesta escolha. Além disso, o “Ad

Hoc Committee of the Joint Councils of the Society for Vascular Surgery and the International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter” recomendou a utilização dos caninos nos estudos pré-clínicos de próteses vasculares. Na avaliação do comitê, os cães apresentam duas características importantes: endotelização pobre de superfícies prostéticas e tendência não-previsível a hipercoagulabilidade. Tais características seriam importantes no teste de trombogenicidade de novos dispositivos¹¹. Por outro lado, o sistema fibrinolítico do cão é muito eficiente, podendo interferir no resultado do experimento¹⁰. Além disso, a crescente resistência da sociedade contra a utilização de animais domésticos em experimentação tem tornado mais complexa sua utilização.

Embora os suínos e ovinos não sejam a melhor opção quando se pretende realizar medições repetidas, seu custo é mais competitivo que o dos cães. Os modelos ovinos são menos utilizados, muito embora suas artérias sejam relativamente grandes e seu sistema de coagulação similar ao humano.

Quando avaliamos os suínos, observamos que a morfologia arterial é similar à humana, apresentam tendência a hipercoagulabilidade e seu sistema fibrinolítico não é tão eficiente quanto o dos cães. Os suínos apresentam artérias periféricas com tamanho adequado para introdução de dispositivos endovasculares. Em suínos da raça Landrace, entre 10 e 12 semanas, a artéria femoral comum varia de 3 a 5 mm de diâmetro, a aorta abdominal apresenta diâmetro aproximado de 6 a 12 mm e a aorta torácica descendente apresenta em média 14 mm. Suas artérias apresentam paredes delicadas e a manipulação deve ser cuidadosa, além do que, na região inguinal, são mais profundas. A aorta abdominal deve ser exposta preferencialmente por via

retroperitoneal, uma vez que o volumoso intestino tornará a exposição da aorta difícil e a sutura da parede abdominal sujeita a complicações e igualmente trabalhosa. Por características inerentes à espécie, estas dificuldades não são observadas na exposição transperitoneal da aorta canina³.

A estrutura na neointima é muito similar em humanos, cães e suínos. Tanto no número de células como a composição e matrizes de proteoglicanos, que são essencialmente as mesmas. Entretanto, a resposta à injúria vascular é dramaticamente diferente^{12 13}. Como já foi mencionado anteriormente, a resposta endotelial dos modelos caninos é mais branda, enquanto que nos modelos suínos, a tendência à hipercoagulabilidade e a exagerada hiperplasia pode levar a resultados menos encorajadores¹⁰.

Portanto, a escolha do animal mais apropriado deve levar em conta, não só as suas características, como também os objetivos do experimento e as condições do local de sua realização.

1.1.2. MODELOS DE ANEURISMAS

Os modelos experimentais pretendem imitar a morfologia do aneurisma humano tanto em sua conformação tridimensional (fusiformes ou saculres), quanto em nível histológico (fragmentação das fibras elásticas, trombose mural, endotelização).

Modelos utilizados para avaliação de aspectos técnicos, eficácia e biocompatibilidade de endopróteses já foram descritos. O mais comum é o modelo de remendo ou “patch”.

Inicialmente alguns modelos relativamente simples foram criados, com foco na factibilidade da exclusão do aneurisma por endopróteses. A evolução

do tratamento endovascular estimulou a criação de modelos para o estudo de características específicas do tratamento endovascular, como migração, vazamentos, endotensão e alterações do colo do aneurisma, por exemplo. Alguns modelos muito úteis já foram desenvolvidos, grande parte deles na aorta abdominal.

Entre os fatores que determinam maiores morbidade e mortalidade para os animais de experimentação estão: o pinçamento prolongado da aorta, levando a paraparesia ou paraplegia por isquemia medular; hemorragia severa durante o experimento; e ruptura precoce do aneurisma. Estes fatores são observados de acordo como o tipo de cirurgia proposta e o tipo de aneurisma confeccionado³. Uma análise mais detalhada de cada tipo será feita a seguir.

1.1.2.1. REMENDO NA PAREDE ARTERIAL

Por sua confecção simples, rápida e segura, este modelo é o mais freqüente. Basicamente, a aorta é pinçada e as artérias lombares ou torácicas intercostais são controladas com reparos em dupla laçada. A aortotomia longitudinal é seguida pela sutura do remendo na parede arterial. No caso da exposição abdominal, pode ser utilizada a abordagem transperitoneal ou retroperitoneal. Um período que varia de três a até 12 semanas é necessário para que os animais sejam submetidos a uma intervenção posterior^{6 14 -19}.

Algumas vantagens deste modelo incluem a possibilidade de confeccionar aneurismas de grandes dimensões, permitindo o estudo da resistência às curvaturas da endoprótese no interior do saco aneurismático (kinking). A preservação das artérias lombares ou torácicas intercostais permite

estudar a perfusão do saco aneurismático por fluxo retrógrado (endoleak) e o potencial encolhimento do aneurisma. Os materiais já utilizados nesta técnica são o poliéster ^{14 20}, fásia abdominal ^{14 15} com ou sem peritônio ¹⁶, jejuno ^{9 18}, veia ilíaca ²¹ ou pericárdio bovino ¹⁹. A trombose espontânea ou formação de trombo mural exuberante dos aneurismas não tratados não foi observada neste modelo experimental quando se utilizava poliéster ^{14 20} e jejuno ^{9 18}.

O material sintético - poliéster - foi utilizado na maioria dos casos, tendo sido relatada baixa mortalidade operatória, em torno de 7% . Entretanto, parece haver maior reação periprótese nos cães, resultando em hidronefrose e insuficiência renal por envolvimento ureteral, além de obstrução intestinal ¹⁴. Não foi observado encolhimento do aneurisma após exclusão do mesmo nos casos em que se utilizou material sintético.

Um modelo mais complexo foi descrito por Uflacker. Após a criação do aneurisma pela sutura de bolsa de poliéster na parede anterior da aorta abdominal de suínos Yucatan, o mesmo foi excluído por endoprótese e o saco aneurismático preenchido por um polímero - DEAC-glicosamina. O objetivo era demonstrar a prevenção do endoleak pelo preenchimento do saco aneurismático com o polímero. Dois animais apresentaram paralisia das patas posteriores e o encolhimento do saco aneurismático foi observado somente após seis semanas²².

Os aneurismas criados a partir de remendos de fásia do reto abdominal apresentaram maior morbidade e mortalidade, variando de 11% a 33% ^{14 15 16} ²³. As causas foram paraplegia, hemorragia fatal secundária a defeitos na anastomose ou ruptura do aneurisma, além de hematoma do sítio de retirada do remendo. A ruptura do aneurisma ocorreu em aproximadamente um terço

dos animais num período de três semanas^{14 15 23}. Estes aneurismas tendem a aumentar de tamanho durante o seguimento. Não ocorreu a formação de trombo nestes aneurismas e houve encolhimento quando da exclusão do aneurisma por endopróteses^{15 16 23}. Possivelmente este resultado desfavorável se deve ao fato de que a fásia apresenta fibras dispostas em uma orientação preponderante, determinando dificuldade na sutura do remendo e conseqüente aumento do tempo de pinçamento da artéria.

Estas dificuldades não são relatadas quando se utiliza veia como remendo^{21 24}. Os aneurismas confeccionados a partir de remendos venosos apresentam crescimento em aproximadamente 19% dos casos durante o seguimento. Após a exclusão endovascular da lesão ocorreu redução em 10% do seu diâmetro e, como esperado, uma trombose completa da luz vascular²¹.

Os modelos que utilizam remendo de jejuno apresentam uma maior tendência à ruptura^{9 18}. A maioria dos aneurismas - 88% - rompeu entre 18 horas e onze dias após sua criação. Mesmo após a exclusão, apresentavam alto risco de ruptura na presença de vazamentos. Pelo grande trauma cirúrgico, a morbidade apresentada foi de 45%. Os aneurismas excluídos com sucesso apresentaram grande encolhimento, sendo observado desaparecimento total do saco aneurismático em alguns animais⁹.

O pericárdio bovino também já foi utilizado na criação de um modelo de aneurisma sacular de artéria ilíaca comum¹⁹. A facilidade de manuseio, o baixo custo e a estabilidade do material foram pontos ressaltados pelos autores. Não foram relatadas rupturas. Os aneurismas criados apresentaram endotelização e não foram observados trombos murais.

1.1.2.2. INTERPOSIÇÃO DE ENXERTO

Nestes modelos a idéia básica é substituir um segmento da artéria nativa por enxerto cujo material pode ser poliéster^{25 26}, poliuretano^{27 29 30}, ou mesmo veia autóloga²⁸.

Quando o material utilizado é pré-fabricado, como ocorre com o poliéster ou o poliuretano, as dimensões do aneurisma são pré-determinadas e seu comportamento é relativamente estável. Se o segmento arterial retirado for longo a dificuldade técnica aumenta, assim como a morbidade do procedimento. A mortalidade varia de 12% a 60%, possivelmente devido ao maior tempo de pinçamento arterial, maior sangramento e ligadura de artérias lombares^{25 27 32}.

Estes modelos evoluíram gradativamente com o objetivo de reproduzir situações específicas, especialmente os vazamentos. Nestes casos o vazamento é produzido por defeito na prótese, fluxo retrógrado de ramos ou a partir dos pontos de fixação proximal e distal do dispositivo, mantendo assim a perfusão do saco aneurismático^{32 33}.

1.1.2.3. INDUÇÃO POR ELASTASE

Embora este modelo apresente características semelhantes aos aneurismas encontrados em humanos, sua confecção em animais de maior porte, passíveis de tratamento endovascular, é complexa. A elastase determina o desenvolvimento progressivo de aneurisma fusiforme em consequência da

fragmentação imuno-mediada da elastina. Observa-se destruição da lâmina elástica e infiltração da camada média por células inflamatórias³⁵⁻³⁶.

Um modelo com estas características já foi produzido em cães, infundindo-se solução salina com elastase porcina na aorta abdominal, após a ligadura das artérias lombares e pinçamento, durante uma hora³⁷.

A complexidade deste modelo é desafiadora e as dificuldades foram comprovadas posteriormente, quando outro grupo de pesquisadores não conseguiu reproduzir a técnica, observando trombose da aorta em 67% dos animais³⁸. Mais recentemente, Moláček *et al*³⁹ apresentam um experimento que associa a indução do aneurisma através da infusão de elastase porcina em aortas abdominais com uma estenose proximal, causada por um laço de silicone. Estes autores obtiveram bons resultados e concluem que a associação das lesões causadas pela elastase e o turbilhonamento do fluxo arterial causado pela estenose proximal potencializam o crescimento do aneurisma.

1.1.2.4. DILATAÇÃO TRANSLUMINAL

O trauma cirúrgico mínimo é um atrativo desta modalidade. O primeiro modelo, relatado por Crag *et al*, foi criado de maneira acidental, através de lesão da parede da aorta canina por cateter angiográfico⁴⁰.

Posteriormente, as tentativas se basearam na dilatação exagerada da aorta pela insuflação de balões. Surpreendentemente, a dilatação da aorta torácica em 90% e da aorta abdominal em 110% resultaram somente em aumento de 15% do lúmen da primeira e 40% da segunda. A dilatação causa

ruptura da camada íntima e da média, enquanto que a adventícia, embora apresente pequenas hemorragias, mantém sua estrutura próximo da normalidade. Além disso, a hiperplasia intimal subsequente impede o crescimento da aorta⁴¹.

O modelo de proposto por Hallisey aparentemente soluciona parte do problema causado pela elasticidade da aorta dos animais de experimentação. Em seu modelo, um stent é superdilataado em 200%, criando um aneurisma estável⁴². Embora o resultado angiográfico obtido por esta técnica seja adequado, a estabilidade determinada pelo arcabouço metálico do stent é uma limitação do modelo.

1.1.2.5. TENTATIVAS INFRUTÍFERAS

Alguns autores fizeram uso de técnica elaborada, com grande morbidade e mortalidade e não obtiveram sucesso em produzir aneurismas suficientemente estáveis a ponto de serem úteis em pesquisa.

A abordagem direta da aorta, proposta por Economu *et al*⁴³, provocando lesão mecânica por injeção de agentes tóxicos, CO₂ líquido ou ressecção da adventícia e de 70% da camada média, mostrou-se trabalhosa, de grandes morbidade e mortalidade. Seus resultados não foram reproduzidos posteriormente. Mirich *et al*⁴⁴ descrevem um modelo que emprega duas técnicas. Primeiramente a adventícia e parte da camada média da aorta abdominal são ressecadas. Num segundo momento, para produzir a dilatação aneurismática, faz uso de angioplastia com balão da aorta previamente intervinda.

1.2. IN VITRO

Modelos em que os parâmetros podem ser controlados de forma direta. O modelo é composto de um aneurisma artificial, conectado a um sistema de tubos, onde líquido é bombeado, de forma pulsátil, com pressão e volume controlados.

Nestes modelos, o aneurisma é composto de látex ou PTFE e o sistema recebe transdutores para aferição de pressão e volume. São úteis na investigação da transmissão da pressão através da parede do aneurisma, com exclusão completa ou incompleta do mesmo. O conteúdo do saco aneurismático pode ser substituído por gelfoam ou trombo para investigação do efeito de atenuação da pressão⁴⁵⁻⁴⁸.

Estes modelos podem ser úteis para a compreensão da hidrodinâmica e de outros processos físicos a que o aneurisma é submetido durante a sua exclusão.

1.3. A BUSCA DO MODELO IDEAL

A doença aneurismática é um fenômeno biológico resultante de inúmeras interações. Parece correto afirmar que somente um modelo biológico se aproxime de reproduzir tal fenômeno.

Entre os modelos animais de grande porte, observamos que as tentativas de criar aneurismas semelhantes a nível histológico se mostrou trabalhosa e de maior morbidade.

Os modelos que empregaram técnica relativamente simples mostraram-se mais seguros, conseguem reproduzir, até certo ponto, a conformação anatômica tridimensional, mas não contemplaram a complexa alteração histológica observada nos aneurismas humanos.

Chama atenção o fato de que a grande maioria dos trabalhos procurou produzir aneurismas na aorta abdominal. A aorta torácica foi contemplada apenas no trabalho de Formici *et al*⁶.

A constante evolução das técnicas endovasculares traz consigo a necessidade de avaliação dos materiais e treinamento dos executores. Nos parece lógico que esta necessidade transforma a experimentação animal em ferramenta crucial para o desenvolvimento das técnicas endovasculares.

As limitações e características de cada modelo experimental estudado nesta revisão nos permitem concluir que não existe o modelo ideal de aneurisma de aorta. Entretanto esta observação serve de estímulo para a criação e o desenvolvimento de novos modelos experimentais aplicáveis em nosso contexto, especialmente no território da aorta torácica descendente.

2. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Dake MD, Miller DC, Semba CP, Mitchell RS, Walker PJ, Liddell RP. Transluminal placement of endovascular stent-grafts for the treatment of descending thoracic aortic aneurysms. *NEJM*. 1991; 331: 1729-1734
2. Bavaria EJ, Coselli JS, Curi MA, Eggebrecht H, Elefteriades JA, Erbel R, Gleason TG, Lytle BW, Mitchell RS, Nienaber CA, Roselli EE, Safi H, Shemin RJ, Sicard GA, Sundt TM, Szeto WY, Wheatley III GH. Expert consensus document on the treatment of descending thoracic aortic disease using endovascular stent-grafts. *Ann Thor Surg*. 2008; 85:S1-S41
3. Marty B. Endovascular aneurysm repair from bench to bed. Steinkopff Verlag Darmstadt. 2005.
4. Berry M, Lystig T, Beard J, Klingestierna H, Reznick R, Lönn L. Porcine transfer study: Virtual reality simulator training compared with porcine training in endovascular novices. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2007; 30: 455-461
5. Narayanaswamy M, Wright KC, Kandarpa K. Animal Models for atherosclerosis, restenosis, and endovascular graft research. *J Vasc Interv Radiol*. 2000; 11(1): 5-17.
6. Formichi M, Marois Y, Roby P, Marinov G, Stroman P, King MW, Douville Y, Guidoin R. Endovascular repair of thoracic aortic aneurysm in dogs: Evaluation of a nitinol-polyester self-expanding stent-graft. *J Endovasc Ther*. 2000; 7:47-67

7. Gresham GA, Howard N. Aortic rupture in the turkey. *J Atheroscler Res.* 1961; 1:75-80
8. Andrews EJ, White WJ, Bullock L. Spontaneous aortic aneurysms in blotchy mice. *Am J Pathol.* 1975; 78:199-210
9. Carmeliet P, Moons L, Lijnen R, Baes M, Lemaitre V, Tipping P, Drew A, Eeckhout Z, Shapiro S, Lupu F, Collen D. Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation. *Nat Genet.* 1997; 17:439-444
10. Mason RG, Read MS. Some species differences in fibrinolysis and blood coagulation. *J Biomed Mater Res.* 1971; 5:121-128
11. Abbott WM, Callow A, Moore W, Rutherford R, Veith F, Weinberg S. Evaluation and performance standards for arterial prosthesis. *J Vasc Surg.* 1993; 17:746-756
12. Schwartz RS, Huber KC, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vliestra RE, Holmes DR. Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: Results in a porcine model. *J Am Coll Cardiol.* 1992; 19:262-274
13. Schwartz RS. Neointima and arterial injury: Dogs, rats, pigs, and more. *Labor Invest.* 1994; 71:789-791
14. Verbin C, Donayre C, Kopchok G, Scoccianti M, White RA. Anterior patch aortic aneurysm model for the study of endoluminal grafts. *J Invest Surg.* 1995; 8:381-388
15. Ruiz CE, Zhang HP, Douglas JT, Zuppan CW, Kean CJ. A novel method for the treatment of abdominal aortic aneurysm using percutaneous

- implantation of a newly designed endovascular device. *Circulation*. 1995; 91:2470-2477
16. Palmaz JC, Tio FO, Laborde JC, Clem M, Rivera FJ, Murphy KD, Encarnacion CE. Use of stents covered with polytetrafluorethylene in experimental abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Interv Radiol*. 1995; 6:879-885
17. Criado E, Marston WA, Woosley JT, Ligush J, Chutter TA, Baird C, Suggs CA, Mauro MA, Keagy BA. An aortic aneurysm model for the evaluation of endovascular exclusion prostheses. *J Vasc Surg*. 1995; 22:306-314; discussion 314-315
18. Martson WA, Criado E, Baird CA, Keagy BA. Reduction of aneurysm pressure and wall stress after endovascular repair of abdominal aortic aneurysm in a canine model. *Ann Vasc Surg*. 1996; 10:166-173
19. França LHG, Perini SC, Argenta R, Aveline CC, Pereira AH, Mollerke RO, Soares ME, Nóbrega F, Ferreira MP. Modelo experimental de aneurisma sacular de artéria ilíaca comum com pericárdio bovino em suínos. *J Vasc Br*. 2005; 4:353-356
20. Balko A, Piasecki GJ, Shah DM, Carney WI, Hopkins RW, Jackson BT. Transfemoral placement of intraluminal polyurethane prosthesis for abdominal aneurysm. *J Surg Res*. 1986; 40:305-309
21. Eton D, Warner D, Owens C, McClenic B, Cava R, Ofek B, Borhani M, Baraniewski H, Schuller JJ. Results of endoluminal grafting in an experimental aortic aneurysm model. *J Vasc Surg*. 1996; 23:819-831

22. Uflacker R, Brothers T. Filling of the aneurismal sac with DEAC-glucosamine in an animal model of abdominal aortic aneurysm following stent-graft repair. *J Cardiovasc Surg.* 2006; 47:425-436
23. Benson AE, Palmaz JC, Tio FO, Sprague EA, Encarnacion CE, Josephs SC. Polytetrafluorethylene-encapsulated stent-grafts: Use in experimental abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Interv Radiol.* 1999; 10:605-612
24. Eton D, Warner D, Owens C, Cava R, Borhani M, Farolan MJ, Marboe CC. Histological response to stent graft therapy. *Circulation.* 1996; 94:II182-187
25. Gorin DR, Arbid EJ, D'Agostino R, Yucel K, Solovay KS, Morte WW La, Quist WC, Mulligan N, Menzoian JO. A new generation endovascular graft for repair of abdominal aortic aneurysm. *Am J Surg.* 1997; 173:159-164
26. Laborde JC, Parodi JC, Clem MF, Tio FO, Barone HD, Rivera FJ, Encarnacion CE, Parmaz JC. Intraluminal bypass of abdominal aortic aneurysm: feasibility study. *Radiology.* 1992; 184:185-190
27. Hagen B, Harnoss BM, Trabhardt S, Ladeburg M, Fuhrmann H, Franck C. Self-expandable macroporous nitinol stents for transfemoral exclusion of aortic aneurysms in dogs: Preliminary results. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 1993; 16:399-342
28. Boudghène FP, Sapoval MR, Bonneau M, LeBlanche AF, Lavaste FC, Michel JBL. Abdominal aortic aneurysms in sheep: Prevention of rupture with endoluminal stent-grafts. *Radiology.* 1998; 206:447-454

29. Sanchez LA, Faries PL, Marin ML, Ohki T, Parson RE, Marty B, Soeiro D, Oliveri S, Veith FJ. Chronic intraaneurismal pressure measurement: An experimental method for evaluating the effectiveness of endovascular aortic aneurysm exclusion. *J Vasc Surg.* 1997; 26:222-230
30. Mousa A, Dayal R, Bernheim J, Henderson P, Hollenbeck S, Trocciola S, Prince M, Gordon R, Badimon J, Fuster V, Marin ML, Kent C, Faries P. A canine model to study the significance and hemodynamics of type II endoleaks. *J Surg Res.* 2005; 123:275-283
31. Whitbread T, Birch P, Rogers S, Majeed A, Rochester J, Beard JD, Gaines P. A new animal model for abdominal aortic aneurysm: Initial results using a multiple-wire stent. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1996; 11:90-97
32. Schurink GWH, Aarts NJM, Baalen JM, Kool LJS, Bockel JH. Experimental study of the influence of endoleaks size on pressure in the aneurysm sac and the consequences of thrombosis. *Br J Surg.* 2000; 87:71-78
33. Marty B, Sanchez LA, Ohki T, Wain RA, Faries PL, Cynamom J, Main ML, Veith FJ. Endoleak after endovascular graft repair of experimental aortic aneurysms: does coil embolization with angiographic "seal" lower intraaneurysmal pressure? *J Vasc Surg.* 1998; 27:454-462
34. Martín DE, Nabseth DC, Rowe MI, Gottlieb L, Deterling RA. Production of experimental aneurysms with pancreatic elastase. *Surg Forum.* 1962; 8:237-239

35. Anidjar S, Salzmann JL, Gentric D, Lagneau P, Camilleri JP, Michel JB. Elastase-induced experimental aneurysms in rats. *Circulation*. 1990; 82:973-981
36. Anidjar S, Dobrin PB, Eichorst M, Graham GP, Chejfec G. Correlation of inflammatory infiltrate with the enlargement of experimental aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 1992; 16:139-147
37. Boudghène F, Anidjar S, Allaire E, Osborne-Pellegrin M, Bigot JM, Michel JB. Endovascular grafting in elastase-induced experimental aortic aneurysms in dogs: feasibility and preliminary results. *J Vasc Interv Radiol*. 1993; 4:497-504
38. Marinov GR, Marois Y, Paris E, Roby P, Formichi M, Douville Y, Guidoin R. Can the infusion of elastase in the abdominal aorta of Yucatan miniature swine consistently produce experimental aneurysms? *J Invest Surg*. 1997; 10:129-150
39. Moláček J, Třeška V, Kobr J, Certík B, Skalický T, Kuntscher V, Křížková V. Optimization of the model of abdominal aortic aneurysm – experiment in an animal model. *J Vasc Res* 2009;46:1-5
40. Cragg A, Lund G, Rysavy J, Castaneda F, Castaneda-Zuniga W, Amplatz K. Nonsurgical placement of arterial endoprosthesis: A new technique using nitinol wire. *Radiology*. 1983; 147:261-263
41. Zollikofer CL, Redha FH, Brühlmann WF, Uhlschmid GK, Vlodayer Z, Castaneda-Zuniga WR, Amplatz K. Acute and long-term effects of massive balloon dilation on the aortic wall and vasa vasorum. *Radiology*. 1987; 164: 145-149

42. Hallisey MJ. A transluminary created abdominal aortic aneurysm model. *J Vasc Interv Radiol.* 1997; 8:305-312
43. Economu SG, Yaylor CB, Beattie EJ, Davis CB. Persistent experimental aortic aneurysms in dogs. *Surgery.* 1960; 47(1):21-28
44. Mirich D, Wright KC, Wallace S, Yoshioka T, Lawrence DD, Charnsangavej C, Gianturco C. Percutaneously placed endovascular grafts for aortic aneurysms: feasibility study. *Radiology.* 1989; 170:1033-1037.
45. Parodi JC, Berguer R, Ferreira LM, La Mura R, Schermerhorn ML. Intra-aneurysmal pressure after incomplete endovascular exclusion. *J Vasc Surg.* 2001; 22:909-914
46. Mehta M, Ohki T, Veith FJ, Lipsitz EC. All endoleaks are not the same: A treatment strategy based on an ex-vivo analysis. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2001; 21:541-544
47. Mehta M, Veith FJ, Ohki T, Lipsitz EC, Cayne NS, Darling RC. Significance of endotension, endoleak, and aneurysm pulsatility after endovascular repair. *J Vasc Surg.* 2003; 37:842-846
48. Schurink GH, Aarts NJM, Maina M, Bockel JH. Pulsatile wall motion and blood pressure in aneurysms with open and thrombosed endoleaks - comparison of a wall track system and M-mode ultrasound scanning: an in vitro and animal study. *J Vasc Surg.* 2000; 32:795-803

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Produzir um modelo experimental de aneurisma de aorta torácica descendente estável e suportável em suínos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Observar o impacto da cirurgia sobre o desenvolvimento do animal de experimentação.

3.2.2. Analisar as características histológicas do aneurisma produzido.

4. ARTIGO EM INGLÊS

THORACIC AORTIC ANEURYSM: AN EXPERIMENTAL MODEL IN PIGS

Rodrigo Argenta, MD¹; Sílvio César Perini, MD¹; Adamastor Humberto Pereira, MD, PhD²

¹ Postgraduate Program in Surgical Sciences, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

² Associate Professor, School of Medicine, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil. Head, Vascular Surgery Department, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

Running title: Thoracic aortic aneurysm: an experimental model

Subject category: Vascular.

Address for manuscript correspondence:

Rodrigo Argenta

Rua Dr. Barbosa Gonçalves, 777/1008, Chácara das Pedras

CEP 90330-320 - Porto Alegre, RS, Brazil

E-mail: rodrigoargenta@hotmail.com

Tel: +55-51-8412-9384

Fax: +55-51-2111-1099

ABSTRACT

Background: Continuous development in endovascular intervention techniques has resulted in effective treatments for descendent thoracic aortic aneurysms with low morbidity and mortality. Efforts towards the development of animal models that are ideally suited for testing these new technologies and providing training in them are becoming increasingly important. Our purpose here is to describe an unpublished experimental model of descending thoracic aortic aneurysm in pigs.

Materials and Methods: 10 Landrace female pigs aged 10 to 12 weeks and with initial weights of 17 to 25 kg were anesthetized and their descending thoracic aortas exposed by 5th intercostal space left thoracotomy. The thoracic aorta was isolated. A 2 cm wide x 2 cm long patch of ready-made bovine pericardium was sewn onto the left anterolateral side of the aorta. After 3 weeks' follow-up a control aortography was taken and the animals were euthanized. The segment of thoracic aorta containing the aneurysm and the adherent tissues were explanted en bloc. The specimens were stained for histological examination.

Results: 100% of the animals survived the procedure and after sacrifice a patent aneurysm was observed in all of them. There were no defects on the suture lines.

Weight gain during follow-up was normal. All specimens exhibited intense adventitial reaction with myofibroblasts. There were no complications related to the thoracotomy.

Conclusions: The descending thoracic aortic aneurysms induced experimentally appear to be stable, of easy execution, with null mortality and

with no influence on the animals' normal development. Furthermore, they have similar characteristics to those observed in human degenerative aneurysms.

Keywords: Aneurysm; thoracic aorta; animal models; animal experiments.

Introduction

Experimental animal models have been used for decades in studies of the natural history of arterial aneurysms and in the evaluation of the results of treating them.¹ These models differ in terms of some of their characteristics, such as the size of experimental animal, the manner in which the aneurysm is produced and its location, in addition to other details. Nevertheless, the objective of these models is always the same: to mimic the way that aneurysmatic pathologies appear in humans.

Some models approach this ideal when specimens are analyzed histologically,^{2,3} others when we observe the changes in diameter and the tendency towards rupture^{4,5} and yet others in terms of the dimensions of vessels and aneurysms.^{6,7} However there is no one model with all of the characteristics observed in human arterial aneurysm.^{8,9}

There are several experimental models of aortic abdominal aneurysm,¹⁰ but models for the study of thoracic aortic aneurysms (TAA) are rare.^{11,12}

A murine model has been developed based on induction of TAA using elastase.¹² Although this is an excellent model for studying the histology of aneurysms, the small size of the animal limits its applicability. Another model was developed using dogs, in which a polyester patch was sewn onto the anterior side of the thoracic aorta.¹¹ That study provided a comprehensive investigation of the healing processes associated with the Cragg EndoPro System 1. However, the structure and morphology of the human arterial wall is different from that of dogs, and pathological analysis of the aneurysm was not described.

The superior results obtained with endovascular treatment of pathologies of the descending thoracic aorta, owing to the development of new stent-graft devices and endovascular procedures, mean that in the majority of cases this is the technique of choice for treating TAA in section of the aorta.¹³

This new technology, however, demands particular skills, both from surgeons in training and from those already qualified for some time. Training these people using in vitro or robotic models has not proven to be as realistic as when animal models are employed.^{14,15}

Considering all of the above, we proposed the development of an experimental model of descending TAA in pigs which exhibits anatomic and histopathological characteristics similar to the human aneurysm for use in training surgeons and in the development of new endovascular devices.

Materials and methods

This cross-sectional experimental study was conducted at the Animal Research Center at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. All animals were treated and cared for in accordance with regulations of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals,¹⁶ and all protocols were approved by the Research Ethics Committee at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

We created thoracic aortic aneurysm in 10 female 10 to 12-week-old Landrace pigs and initial weights of 17 to 25 kg, sourced from a local supplier (Agrogen Ltda). The animals were fed with standard diet for their age and underwent a 12-hour fast before the procedure.

One animal was maintained on the regular diet for 3 weeks, without intervention, to enable comparison between its weight gain and development

and that of the animals submitted to the induced TAA. Another animal was submitted to TAA induction and euthanized 24 h later (pilot study).

The 10 pigs with TAA were euthanized 3 weeks after the initial procedure. The thoracic aorta containing the TAA was harvested and fixed in formalin. After setting in paraffin, they were prepared for optical microscopy.

Experimental procedure

After 12 hours' fasting, animals were weighed and given intramuscular sedation with midazolam (1mg/kg). At this point, after disinfection, venous access was obtained by puncture of the marginal vein of the ear with a 16G teflon catheter (Abocath). Hydroelectrolytic replacement and intravenous medications were delivered via this route.

The animals were placed in the supine position and orotracheal intubation performed. Anesthesia was maintained with 2mg intravenous ketamine and 2% isoflurane in combination with oxygen FiO₂ 100%. At this point 2 g of cephazolin was administered intravenously for prophylaxis. During the procedure, hydroelectrolytic balance was maintained with 20 ml/kg/h of 0.9% NaCl 0.9% solution intravenously. Mechanical ventilation was provided by a closed-loop re-inhalation system (Husky Calgimed). The pigs were monitored using pulse oximetry and electrocardiography (Fig 1).

Another team, using an aseptic technique, constructed a pericardium pouch, 2 cm by 2 cm, suturing the lateral edges with polypropylene 6.0 stitches.

After general anesthesia, animals were placed on their right lateral sides and the left hemithorax was prepared in a sterile manner. The 5th intercostal space was infiltrated with bupivacaine at 0.5% as a supplementary anesthetic

(Fig 1).

A thoracotomy was then performed opening onto the pleural cavity. Retraction of the left lung permitted the descending thoracic aorta to be located and isolated and the intercostals arteries to be identified and controlled with vessel loops.

Following an intravenous injection of heparin (100 U/kg), the thoracic aorta was clamped. A 2 cm aortotomy was created and the pericardium pouch was sewn on with a continuous polypropylene monofilament suture. After anastomosis, the clamps were removed and the suture line examined.

After this step, the thoracotomy was closed. During the thoracotomy, the lung was maintained hyperinflated and a rigid silicon drain was located in the pleural cavity. This drain was removed during final closure.

After recovery from the anesthetic, the animals were kept under observation by the veterinary team at the Research Center, analgesia being given as needed. After 24 h, the animals were transferred to a farm and observed for 20 days, with regular diet.

Arteriographic control and euthanasia

After 3 weeks, the animals were weighed and the anesthetic protocol applied. The left hemithorax and left groin were prepared.

After infiltration of bupivacaine at 0.5%, the left common femoral artery was dissected and, under direct view, a valved 5F shaft was fitted. Through the shaft, a diagnostic “pig tail” 5F catheter was placed in the thoracic descending aorta, over a 0.035” metal wire. Conventional aortography was then carried out

after injection of 20 ml of iodated contrast (Hypaque), in order to confirm the patency of the aneurysm (Fig 2).

Anatomopathological analysis

After the thoracotomy and control of the thoracic aorta, as described, a lethal intravenous dose of KCl was administrated and the segment of the descendent thoracic aorta containing the aneurysm was explanted en bloc. The excised aorta and aneurysm were cleaned in saline solution and fixed in 10% neutral buffered formalin.

The specimens were photographed and selected areas were embedded in paraffin. The 5 µm-thick slices were representative of the aneurysm circumference and suture line. These were stained with hematoxylin-eosin, Masson and anti-human actin immunohistochemical (clone HHF35) stains.

Qualitative observation was carried out and the following features recorded if observed: 1) mural thrombus, 2) endothelization, 3) transmural and periadventitial inflammatory reaction, 4) calcification. In the macroscopic evaluation, the integrity of the suture line, surrounding tissue adhesions and patency of the intercostals arteries were all assessed.

Definitions and statistic analysis

Aneurysm was defined as a focal dilation of at least of 50% of the proximal diameter of the adjacent thoracic aorta. It was measured using aortography and confirmed by the measuring the specimen during the macroscopic examination.

To illustrate the animals' development during the study period, their mean initial weight was compared with their mean final weight, at the time of euthanasia. These values were compared with descriptions in specific articles¹⁷⁻¹⁹ and with the control animal.

The sample size was estimated based on an average of similar studies carried out previously.

The results obtained were expressed as mean \pm standard deviation. Student's t test for paired samples was used to compare weight, considering $p < 0.05$ significant.

Results

Experimental model

All 10 animals submitted to the aneurysm induction procedure survived. No major complications such as paraplegia or paraparesis were observed during follow up. Other complications, such as infected wounds, seromas or hematomas were not observed either.

The mean operating time was 46.1 ± 7.6 minutes and the mean clamping time was 11.9 ± 2.3 minutes.

All animals exhibited tachycardia while the thoracic aorta was clamped, but spontaneously recovery occurred after the clamps were released.

After extubation, five animals (50%) suffered airway spasms, also recovering spontaneously within minutes, without compromising oxygen saturation.

All animals presented had patent aneurysms at the time of control aortography.

At the time of euthanasia, the segment of the thoracic aorta containing the aneurysm was firmly attached to the adjacent lung tissue in all the cases and none of the animals exhibited pleural effusion at this point.

All animals gained weight during the 21 days of follow up. The initial mean weight was 19.1 ± 2.2 kg. At euthanasia, mean weight was 26.5 ± 4.1 kg ($p < 0,05$) (Fig 3). The experimental group exhibited a mean daily weight gain of 352 g, varying from 80 g to 523 g. The control animal's weight increased from 19 kg to 28 kg in the same period of time, with a daily gain of 428 g. These results are summarized in table 1.

Macroscopy and histology

Each specimen consisted of a segment of the thoracic aorta containing the aneurysm, the adjacent connective tissue and adhering lung parenchyma (Fig 2 and 4).

The mean diameter of the descending thoracic aorta, proximal to the aneurysm, was 1.1 ± 0.2 cm and the mean of maximum diameter observed at the aneurysms was 3.1 ± 0.2 cm ($p < 0.05$).

All specimens contained patent intercostal arteries adjacent to the aneurysm.

Endothelization occurred in all specimens. In five cases there was complete covering of the aneurysmal sac by endothelium, in the other five, only partial covering. Mural thrombi were observed in eight cases (80%). In one case, with total endothelization, there was no mural thrombus. In four

specimens (40%), intrathrombus calcification occurred and in all cases there was calcification at the suture line (Fig 5).

There were granulomatous reactions in the perianeurysmatic region and also at the native aorta.

Actin-positive smooth cell infiltration occurred at the periadventitial region in all cases. The thickness of this layer was variable, but significant (Fig 6).

Discussion

Thoracic aortic aneurysm and aortic dissection are the principal pathologies related to this artery. Mortality as high as 34% in the first 30 days after intervention.²⁰

A recent publication reported the incidence of these pathologies as being higher than had previously been described,²¹ reaching 16.3 cases per 100,000 males.²⁰

The impact of endovascular intervention on descending aortic aneurysm cases is striking,^{22,23} although comparative studies free from significant bias comparing groups of conventional and endovascular surgery have not been carried out,¹³ and possibly never can be, for ethical reasons. The almost continuous development of the endoprostheses employed has contributed to achieving better results. However, the introduction of these better quality materials must be followed by the development of better skills in those who operate with them.

From this perspective, it is necessary to make available an animal model that offers the possibility both of training professionals and of testing new materials.

Experimental animal models are better than robotic or virtual models for training operators and offer the necessary conditions to simulate all steps of the procedure.^{15,24}

Although there are countless experimental models of abdominal aortic aneurysm, 10 models of thoracic aortic aneurysm are rare.^{11,12}

We chose pigs for this animal experimental model based on the need for ease of handling, low cost and ethical acceptability. We know that the cardiovascular system and coagulation response of these animals are similar to humans.²⁵⁻²⁷ Furthermore, there are no references in the literature to such a model using pigs.

The primary objective was to develop a surgical operation that the experimental animal could tolerate. A highly skilled operation requiring left thoracotomy could cause certain difficulties, from maintaining adequate ventilation, to pneumothorax after thoracotomy, pleural hemorrhage and atelectasis. Another important point to be considered was the possibility that the intervention could interfere with the normal growth curve expected of the animal.

As in the canine experimental model described by Formichi et al.¹¹ there were no deaths or paraplegia among our animals. The survival of all animals allows for the conclusion that this intervention is tolerable. Moreover, the animals gained a mean weight of 352g per day. At this age weight gain for this race is influenced by external factors and has wide limits, with 234 to 451g to be expected per day.¹⁷⁻¹⁹ Three animals had less than expected weight gain during the observation period. All of the others had adequate weight gain, which

means that the intervention was well-tolerated by the majority of the experimental subjects.

While performing the control arteriography, we observed that the animals' femoral arteries were of small diameter and there was intense vasoconstriction making handling difficult. We therefore chose to gain access through the external iliac artery. Although there was still vasoconstriction, here the diameter was sufficient to allow the 5F to be inserted.

The control angiography did not identify the patency of the intercostals arteries because the Animal Experimental Center did not have equipment capable of identifying them. However patency was confirmed during removal of the aorta and macroscopic analysis.

The macroscopic appearance and the arteriographic results were very similar to observations made of an experimental model by Uflacker et al.²⁸ with the exception of two important differences. First - in that model, the location of the induced aneurysm was the abdominal aorta, where hemodynamics are significantly different from at the thoracic aorta. Second- the material used in the study cited was polyester, which has a different behavior from a biological material such as the bovine pericardium used in our study.

There are no references in the literature describing the microscopic characteristics of thoracic aneurysms made in experimental animals before exclusion with endoprotheses.

Complete endothelization of the aneurysm sac was observed in five specimens. In all others, endothelization was incomplete. Some abdominal and iliac aorta models that have been described underwent endothelization,^{29,30} while others had formation of neointima.^{31,32} The different flow characteristics of

the thoracic aorta, the interval between surgical intervention and data collection and the format of the aneurysm may be responsible for this variation. Mural thrombi were observed in eight animals (80%), two of which contained calcification. It is possible that the same reasons that influenced endothelialization of the aneurysms could have caused this, although there did not appear to be any correlation between endothelialization and the formation of mural thrombi in this model.

The intense healing reaction with myofibroblasts in the periadventitial region is similar to the reaction described by Zollhofer et al. with relation to a dog model.³³ This reaction is not observed in degenerative aneurysms in humans and it has not been described in experiments with pigs. A longer observation period is needed to determine how this tissue response develops.

The follow-up period was sufficient for histopathological alterations to be observed in the area of the induced aneurysm. However, a longer follow-up period would permit further observations. However, in such a case, the rapid growth up of the pigs would be a limiting factor. Genetically-modified animals with slower growth could make such a follow-up study feasible.

The model we have described here has characteristics that are observed in human aneurysms, such as preservation of intercostal arteries, presence of mural thrombi, inflammatory vessel wall reactions and calcifications. The model was stable throughout the study and the technique was well-tolerated by the experimental animals. We believe these characteristics are sufficient to make this model a good choice as a tool for the study of new endovascular devices studies and for training in these techniques.

AKNOWLEDGMENTS

Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

REFERENCES

1. Marty B. Endovascular aneurysm repair from bench to bed. Steinkopf Verlag Darmstadt, 2005.
2. Anidjar S, Salzmann JL, Gentric D, Lagneau P, Camilleri JP, Michel JB. Elastase-induced experimental aneurysms in rats. *Circulation* 1990;82:973-981.
3. Anidjar S, Dobrin PB, Eichorst M, Graham GP, Chejfec G. Correlation of inflammatory infiltrate with the enlargement of experimental aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 1992;16:139-147.
4. Criado E, Marston WA, Woosley JT, Ligush J, Chuter TA, Baird C, Suggs CA, Mauro MA, Keagy BA. An aortic aneurysm model for the evaluation of endovascular exclusion prostheses. *J Vasc Surg* 1995;22:306-315; discussion 314-315.
5. Martson WA, Criado E, Baird CA, Keagy BA. Reduction of aneurysm pressure and wall stress after endovascular repair of abdominal aortic aneurysm in a canine model. *Ann Vasc Surg* 1996;10:166-173.
6. Mousa A, Dayal R, Bernheim J, Henderson P, Hollenbeck S, Trocciola S, Prince M, Gordon R, Badimon J, Fuster V, Marin ML, Kent C, Faries PL. A canine model to study the significance and hemodynamics of type II endoleaks. *J Surg Res* 2005;123:275-283.
7. Rhee JY, Trocciola SM, Dayal R, Lin S, Chaer R, Kumar N, Mousa A, Bernheim J, Christos P, Prince M, Marin ML, Gordon R, Badimon J, Fuster V, Kent CK, Faries PL. Treatment of type II endoleaks with a novel polyurethane thrombogenic foam: Induction of endoleak thrombosis and

- elimination of intra-aneurysmal pressure in the canine model. *J Vasc Surg* 2005;42:321-328.
8. Narayanaswamy M, Wright KC, Kandarpa K. Animal models for atherosclerosis, restenosis, and endovascular graft research. *J Vasc Interv Radiol* 2000;11:5-17.
 9. Dobrin PB. Animal models of aneurysms. *Ann Vasc Surg* 1999;13:641-648.
 10. Lee LK, Faries PL. Assessing the effectiveness of endografts: clinical and experimental perspectives. *J Vasc Surg* 2007;45 Suppl A:A123-30.
 11. Formichi M, Marois Y, Roby P, Marinov G, Stroman P, King MW, Douville Y, Guidoin R. Endovascular repair of thoracic aortic aneurysm in dogs: evaluation of a nitinol-polyester self-expanding stent-graft. *J Endovasc Ther* 2000;7:47-67.
 12. Ikonomidis JS, Gibson WC, Gardner J, Sweterlitsch S, Thompson RP, Mukherjee R, Spinale FG. A murine model of thoracic aortic aneurysms. *J Surg Res* 2003;115:157-163.
 13. Svensson LG, Kouchoukos NT, Miller DC, Bavaria EJ, Coselli JS, Curi MA, Eggebrecht H, Elefteriades JA, Erbel R, Gleason TG, Lytle BW, Mitchell RS, Nienaber CA, Roselli EE, Safi HJ, Shemin RJ, Sicard GA, Sundt TM 3rd, Szeto WY, Wheatley GH 3rd, Society of Thoracic Surgeons Endovascular Surgery Task Force. Expert consensus document on the treatment of descending thoracic aortic disease using endovascular stent-grafts. *Ann Thorac Surg* 2008;85 (1 Suppl):S1-S41.
 14. Gould DA, Reekers JA, Kessel DO, Chalmers NC, Sapoval M, Patel AA, Becker GJ, Lee MJ, Stockx L, CIRSE. Simulation devices in interventional radiology: caveat emptor. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2006;29:4-6.

15. Berry M, Lystig T, Beard J, Klingestierna H, Reznick R, Lönn L. Porcine transfer study: Virtual reality simulator training compared with porcine training in endovascular novices. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2007;30:455-461.
16. Institute of laboratory animal resources, Commission on Life Sciences, National Research Council. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington DC: National Academy Press, 1996.
17. Kerr BJ, Yen JT, Nienaber JA, Easter RA. Influences of dietary protein level, amino acid supplementation and environmental temperature on performance, body composition, organ weights and total heat production of growing pigs. *J Anim Sci* 2003;81:1998-2007.
18. Costa ARC, Lopes PS, Torres RA, Regazzi AJ, Silva MA, Euclides RF, Pires AV. Estimação de parâmetros genéticos em características de desempenho de suínos das raças Large White, Landrace e Duroc. *R Bras Zootec* 2001;30:49-55.
19. Manno MC, Oliveira RFM, Donzele JL, Ferreira AS, Oliveira WP, Lima KRS, Vaz RGMV. Efeito da temperatura ambiente sobre o desempenho de suínos dos 15 aos 30 kg. *R Bras Zootec* 2005;34:1963-1970.
20. Olsson C, Thelin S, Stahle E, Ekbohm A, Granath F. Thoracic aortic aneurysm and dissection: increasing prevalence and improved outcomes reported in a nationwide population-based study of more than 14.000 cases from 1987 to 2002. *Circulation* 2006;114:2611-2618.
21. Bieckerstaff LK, Pairolero PC, Hollier LH, Melton LJ, Van Peenen HJ, Cherry KJ, Joyce JW, Lie JT. Thoracic aortic aneurysms: a population-based study. *Surgery* 1982;92:1103-1108.

22. Patel HJ, Shillingford MS, Williams DM, Upchurch GR Jr, Dasika NL, Prager RL, Deeb GM. Survival benefit of endovascular descending thoracic aortic repair for the high-risk patient. *Ann Thorac Surg* 2007;83:1628-1633; discussion 1633-4.
23. Makaroun MS, Dillavou ED, Kee ST, Sicard G, Chaikof E, Bavaria J, Williams D, Cambria RP, Mitchell RS. Endovascular treatment of thoracic aortic aneurysms: results of phase II multicenter trial of the GORE TAG thoracic endoprosthesis. *J Vasc Surg* 2005;41:1-9.
24. Neequaye SK, Aggarwal R, Van Herzeele I, Darzi A, Cheshire NJ. Endovascular skills training and assessment. *J Vasc Surg* 2007;46:1055-1064.
25. Schwartz RS, Huber KC, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vlietstra RE, Holmes DR. Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model. *J Am Coll Cardiol* 1992;19:267-274.
26. Schwartz RS. Neointima and arterial injury: Dogs, rats, pigs, and more. *Labor Invest* 1994;71:789-791.
27. Mason RG, Read MS. Some species differences in fibrinolysis and blood coagulation. *J Biomed Mater Res* 1971;5:121-128.
28. Uflacker R, Brothers T. Filling of the aneurysmal sac with DEAC-glucosamine in an animal model of abdominal aortic aneurysm following stent-graft repair. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 2006;47:425-436.
29. França LHG, Pereira AH, Perini SC, Argenta R, Aveline CC, Mollerke RO, Soares ME, Nóbrega F, Ferreira MP. Modelo experimental de aneurisma

- sacular de artéria ilíaca comum com pericárdio bovino em suínos. *J Vasc Br* 2005;4:353-356.
30. Soula P, Jane d'Othée B, Otal P, Amin C, Khoury JE, Delisle MB, Cérène A, Joffre F, Rousseau H. Macroporous polyester-covered stent in an experimental abdominal aortic aneurysm model. *J Endovasc Ther* 2001;8:390-400.
 31. Wisselink W, Abruzzo FM, Shin CK, Ramirez JR, Rodino W, Kirwin JD, Panetta TF. Endoluminal repair of aneurysms containing ostia of essential branch arteries: an experimental model. *J Endovasc Surg* 1999;6:171-179.
 32. Faries PL, Sanchez LA, Marin ML, Parsons RE, Lyon RT, Oliveri S, Veith FJ. An experimental model for the acute and chronic evaluation of intra-aneurysmal pressure. *J Endovasc Surg* 1997;4:290-297.
 33. Zollikofer CL, Redha FH, Bruhlmann WF, Uhlschmid GK, Vlodayer Z, Castaneda-Zuniga WR, Amplatz K. Acute and long-term effects of massive balloon dilation on the aortic wall and vasa vasorum. *Radiology* 1987; 164: 145-149.

Table 1. Aneurysm diameters and weight gain

Animal	Initial weight in kg	Final weight in kg	Aorta diameter (mm)	Aneurysm diameter (mm)	TAA /aorta ratio
P 1	20	28	12	31	2.6
P 2	18	22	11	28	2.5
P 3	17	26	12	32	2.7
P 4	18	20	9	32	3.5
P 5	18	25	8	29	3.6
P 6	19	30	12	33	2.7
P 7	19	30	11	29	2.6
P 8	19	30	10	32	3.2
P 9	25	32	12	33	2.7
P 10	18	22	12	30	2.5
Control	19	28	12	-	
	19.1 ± 2,2	26.5 ± 4.1*	11 ± 2	31 ± 2*	2.9 ± 0,4

* Mean ± standard deviation, p < 0,05.

Figure 1.

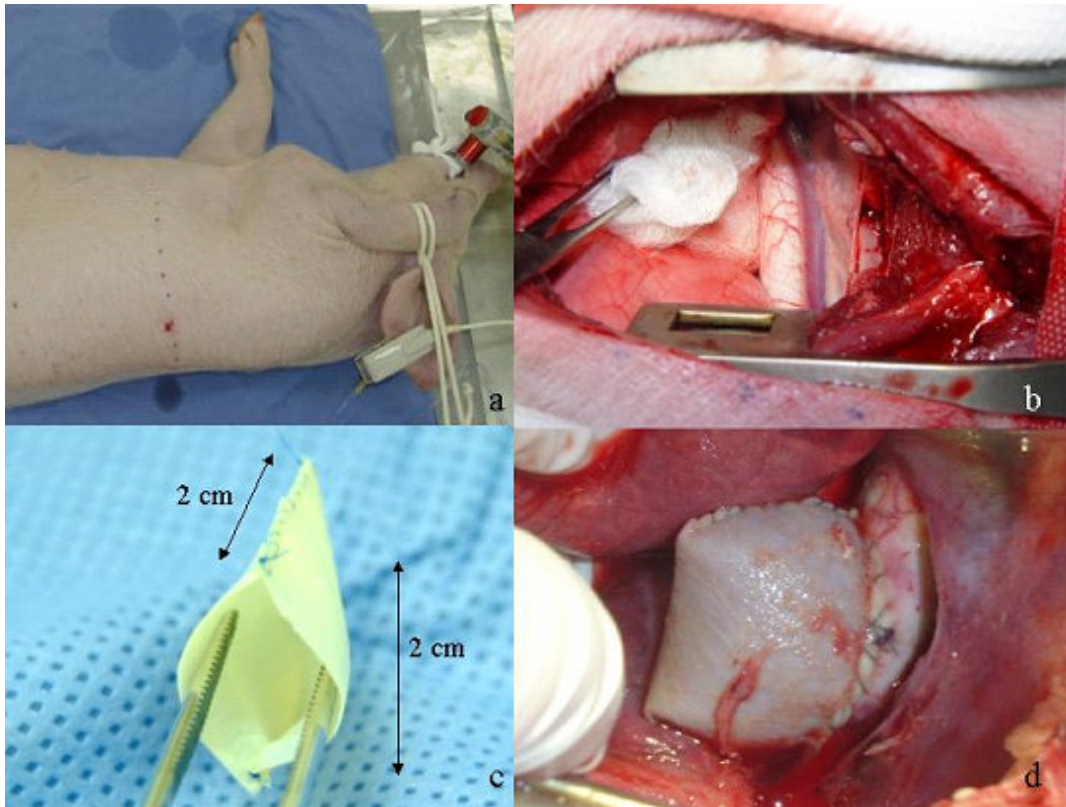


Figure 2.

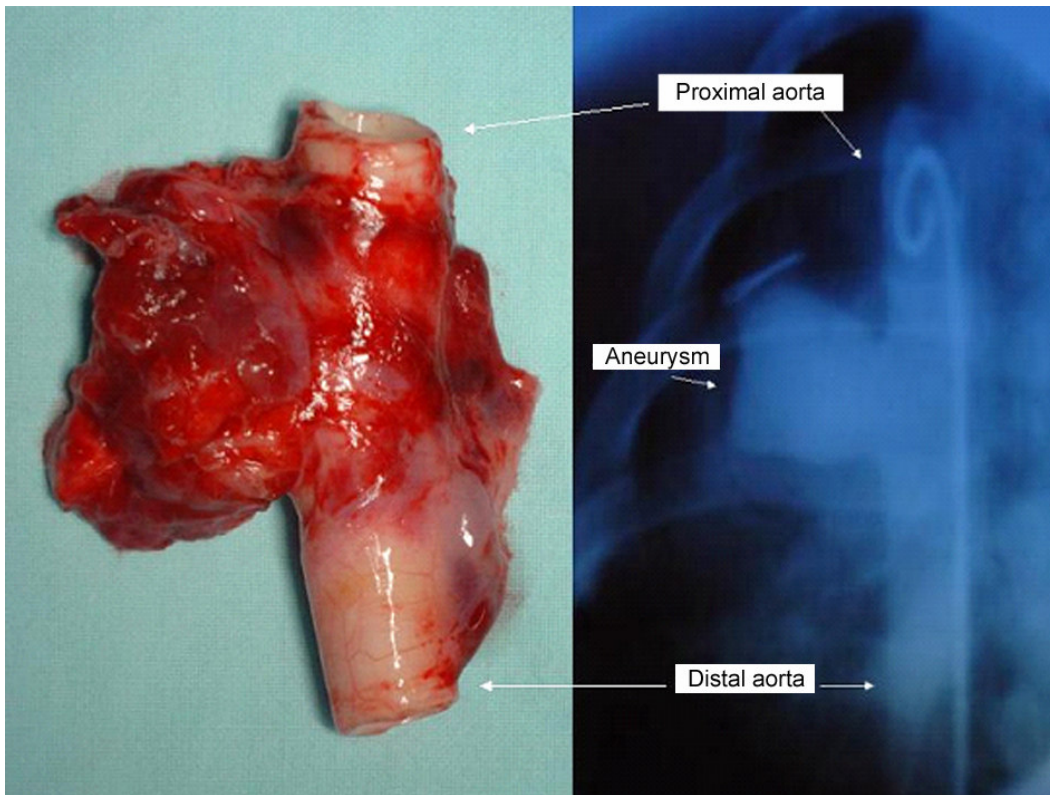


Figure 3.

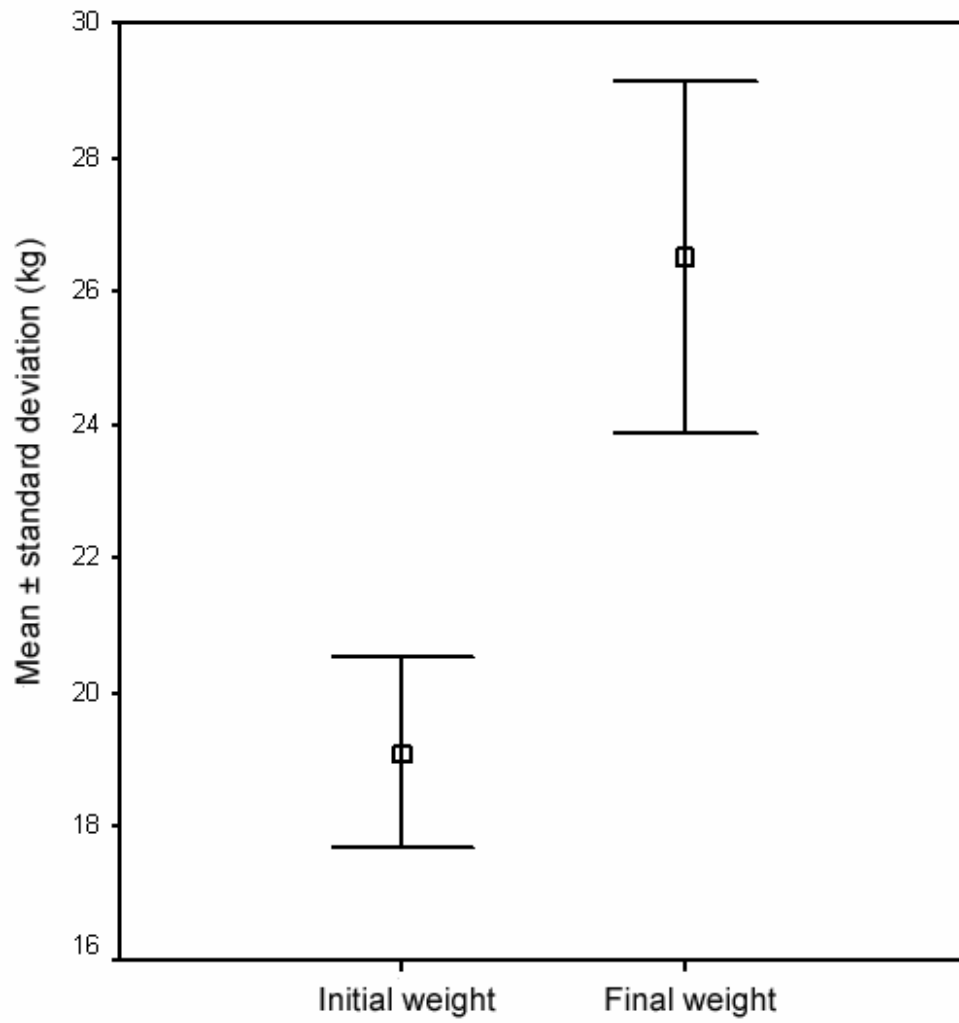


Figure 4.



Figure 5.

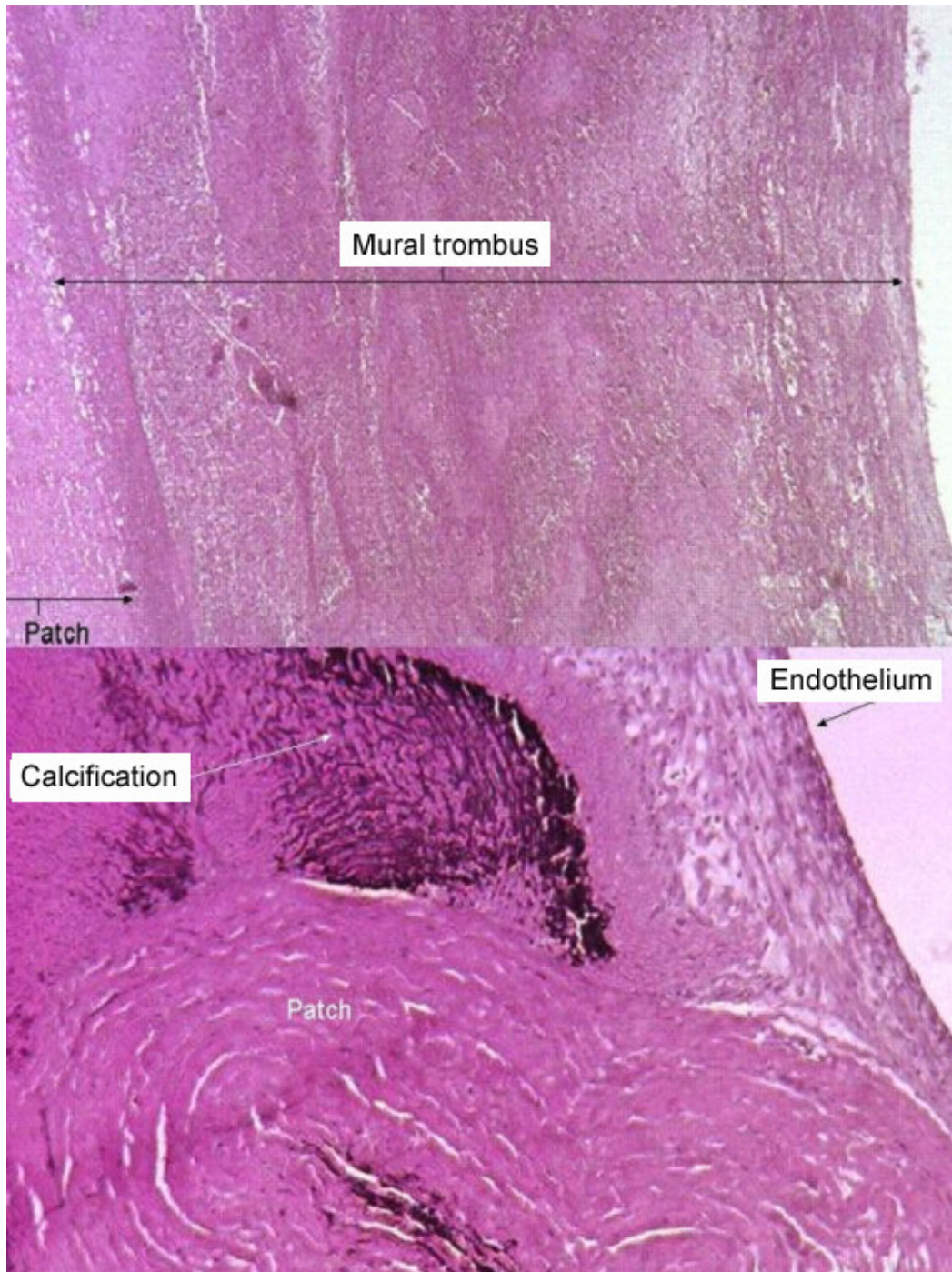


Figure 6.

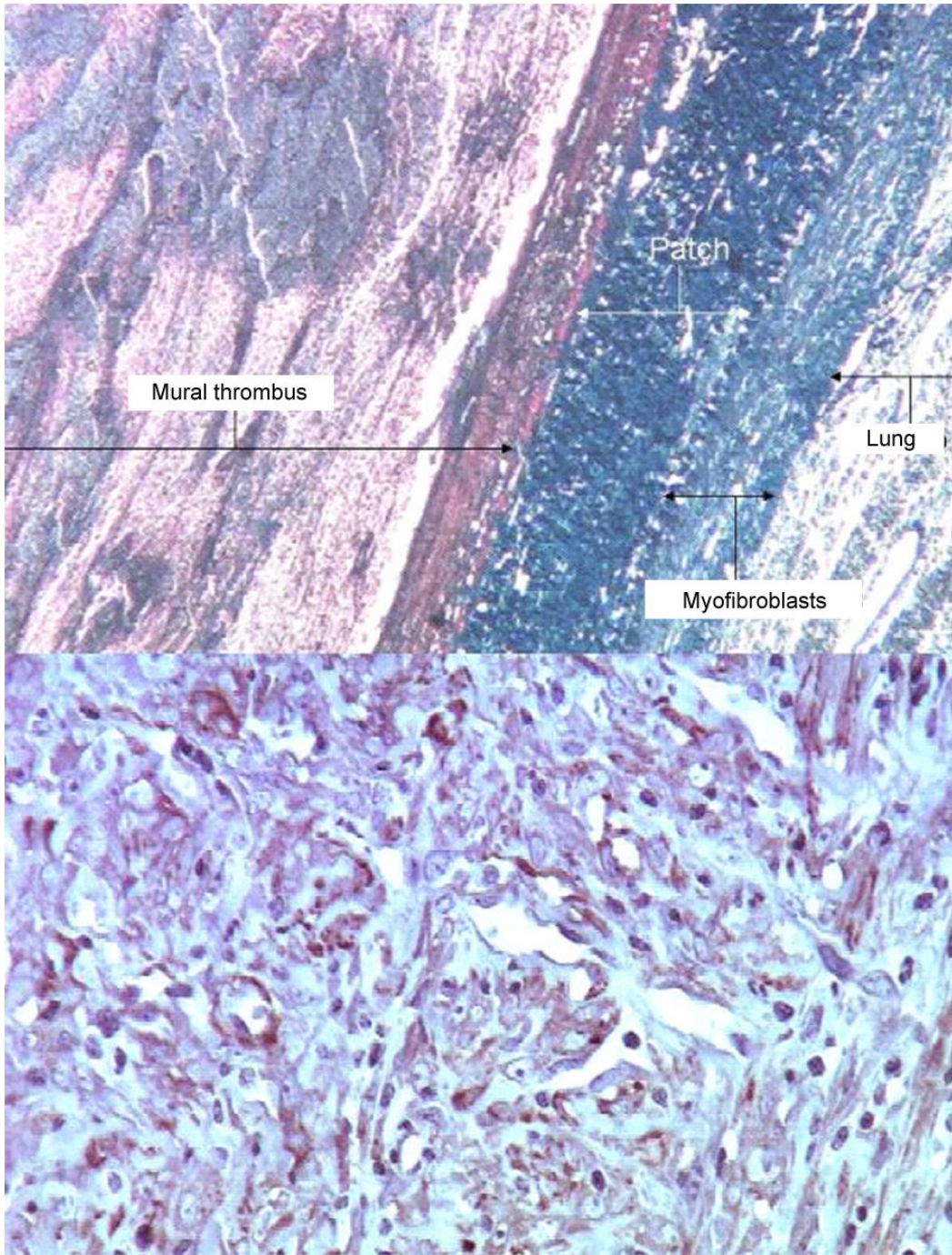


FIGURE LEGENDS

Figure 1. A) Animal positioning. B) Thoracic aorta exposure. C) Bovine pericardium pouch. D) Aneurysm sac after releasing clamps

Figure 2. Descending thoracic aorta with aneurysm and control aortography

Figure 3. Weight gain during follow up. Difference between groups, Student t test for paired samples ($p < 0,05$)

Figure 4. Aneurysm after conservation in buffered formalin

Figure 5. Hematoxilin-Eosin stain. A) Mural thrombus 100x. B) Suture line calcifications 250x

Figure 6. A) Healing process in the aneurysm wall, Masson, 250x. B) Periadventitial myofibroblasts, actin positive, clone HHF35, 400x

5. ARTIGO EM PORTUGÊS

ANEURISMA DE AORTA TORÁCICA: UM MODELO EXPERIMENTAL EM SUÍNOS

Rodrigo Argenta, MD¹; Sílvio César Perini, MD¹; Adamastor Humberto Pereira, MD, PhD²

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

² Professor Adjunto, Faculdade de Medicina, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. Chefe do Serviço de Cirurgia Vascular, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

Título abreviado: Aneurisma de aorta torácica: um modelo experimental

Categoria: Vascular.

Autor para correspondência:

Rodrigo Argenta

Rua Dr. Barbosa Gonçalves, 777/1008, Chácara das Pedras

CEP 90330-320 - Porto Alegre, RS, Brasil

E-mail: rodrigoargenta@hotmail.com

Tel: +55-51-8412-9384

Fax: +55-51-2111-1099

Resumo

Introdução: O desenvolvimento contínuo dos dispositivos endovasculares permite o tratamento dos aneurismas da aorta torácica descendente de forma adequada e com morbidade e mortalidade relativamente baixas. Os esforços no desenvolvimento de modelos animais especialmente criados para teste e treinamento destas novas tecnologias são cada vez mais importantes. Nos propomos a descrever um modelo experimental inédito de aneurisma de aorta torácica descendente em suínos.

Material e método: Dez suínos da raça Landrace, fêmeas, com idade de 10 a 12 semanas, com peso inicial de 17 a 25 kg foram anestesiados e suas aortas torácicas descendentes foram expostas através de toracotomia no 5º espaço intercostal esquerdo. A aorta torácica foi isolada. Uma bolsa de pericárdio bovino pré-confeccionada, de 2 cm por 2 cm foi suturada à parede ântero-lateral da aorta. Ao final da terceira semana de seguimento, foi realizada aortografia de controle. Após eutanásia o segmento da aorta torácica contendo o aneurisma e os tecidos adjacentes foi retirada em bloco único. Foram preparadas lâminas para análise microscópica.

Resultados: Os dez animais sobreviveram ao experimento e todos apresentavam aneurismas pérvios no momento do sacrifício. Não foram observados defeitos nas linhas de sutura. O ganho de peso dos animais durante o seguimento foi normal. Em todas as peças foi observada a formação de intensa reação adventicial, com presença de miofibroblastos. Não foram observadas complicações relacionadas a toracotomia.

Conclusões: O modelo experimental desenvolvido se mostrou estável, de simples realização, com mortalidade nula e com baixa influência no

desenvolvimento dos animais. O aneurisma resultante apresenta características comuns aos aneurismas degenerativos observados em humanos.

Palavras-chave: Aneurisma; aorta torácica; modelos animais; experimentação animal.

Introdução

Os modelos experimentais animais têm sido utilizados há décadas tanto no estudo da história natural dos aneurismas arteriais quanto na avaliação do resultado do tratamento dos mesmos ¹. Algumas características distinguem estes modelos, como o tamanho dos animais de experimentação, a forma de produção do aneurisma, a localização do mesmo, entre outras. Mas o objetivo destes modelos é quase sempre o mesmo, qual seja: imitar a forma com que a patologia aneurismática se apresenta em humanos.

Alguns modelos conseguem se aproximar disso quando se analisa histologicamente a peça ^{1 3}, outros quando se observa a progressão do diâmetro e a tendência a ruptura ^{4 5} e outros nas dimensões dos vasos e do aneurisma ^{6 7}. Entretanto, não se observa modelo que apresente todas as características do aneurisma arterial observado em humanos ^{8 9}.

Os modelos experimentais de aneurisma de aorta abdominal são numerosos ¹⁰, mas os modelos criados para o estudo do aneurisma da aorta torácica (AAT) são raros ^{11 12}.

Um modelo murino foi desenvolvido através da indução do AAT por elastase ¹². Entretanto, as dimensões do animal limitam sua aplicabilidade além da análise histológica. Outro modelo descrito foi desenvolvido em cães, através da sutura de remendo de poliéster na parede anterolateral da aorta torácica ¹¹. Este experimento permitiu um abrangente entendimento do processo de exclusão do aneurisma por endopróteses, entretanto estrutura e morfologia da aorta humana são diferentes da aorta canina, além do que, a análise da parede do aneurisma não excluído não foi relatada.

Os resultados superiores obtidos com o tratamento endovascular das patologias da aorta torácica descendente, em muito decorrentes do desenvolvimento de novos dispositivos endovasculares, permitem que se escolha esta técnica para o tratamento do aneurisma da aorta deste segmento em grande parte dos casos ¹³.

Por outro lado, esta técnica relativamente nova necessita de habilidades especiais do cirurgião, tanto daquele em formação, quanto dos que estão em atividade há mais tempo. O treinamento destes indivíduos em modelos in-vitro ou robóticos não se mostrou tão realístico quanto aquele realizado em modelos animais ^{14 15}.

Levando em consideração os aspectos relacionados acima, propomos o desenvolvimento de um modelo experimental de AAT descendente em suínos que apresente características anatômicas e histopatológicas semelhantes ao aneurisma observado em humanos, para posterior utilização em treinamento e estudo de novos dispositivos endovasculares.

Material e método

Este estudo experimental, transversal, foi realizado no Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O manejo dos animais respeitou as normas do “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”¹⁶. O estudo também obteve autorização pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Foram criados aneurismas de aorta torácica em 10 suínos da raça Landrace, fêmeas, com 10 a 12 semanas e peso variando de 17 a 25 kg, fornecidos por criador local (Agrogen Ltda). Os animais eram alimentados com ração padrão para a idade e submetidos a jejum de 12 horas pré-procedimento.

Um animal foi mantido em dieta normal pelo período de três semanas, sem intervenção, para comparação do desenvolvimento e ganho ponderal com os animais submetidos à criação do aneurisma. Outro animal foi submetido a criação do aneurisma e eutanásia em 24 horas (estudo piloto).

Os dez animais portadores de aneurisma foram submetidos a eutanásia três semanas após o procedimento. A aorta torácica foi retirada em bloco único contendo o aneurisma e conservada em formaldeído. Estas peças foram então incluídas em parafina para a microscopia óptica.

Procedimento experimental

Após jejum de 12 horas os animais eram submetidos a pesagem e sedação com aplicação de midazolam (1mg/Kg) intramuscular. Neste momento, eram higienizados e o acesso venoso era obtido na veia marginal da

orelha, com cateter de teflon (abocath) 16G. Através deste acesso eram administradas as medicações e reposição hidroeletrólítica.

Os animais eram colocados então em posição supina e submetidos a intubação orotraqueal. A anestesia era mantida com ketamina 2mg endovenoso e isofluorano 2%, associado a oxigênio FiO₂ 100%. Antibioticoprofilaxia foi realizada neste momento, com administração de cefazolina 2g endovenoso. A manutenção hidroeletrólítica durante a cirurgia foi realizada pela administração de solução de NaCl 0,9% 20 ml/Kg/h. Os animais permaneciam em ventilação mecânica em aparelho de sistema fechado e reinalação (Husky Calgimed). A monitorização foi realizada com oximetria de pulso e eletrocardiograma (Fig. 1).

Paralelamente, seguindo técnica asséptica, a equipe cirúrgica confecciona bolsa de pericárdio bovino conservado em glutaraldeído, com dimensões de 2 cm por 2 cm, suturando-se as bordas laterais com fio polipropileno 6.0 em pontos contínuos (Fig 1).

Após a anestesia, os animais eram colocados em decúbito lateral direito. O hemitórax esquerdo era preparado com iodoform alcoólico e, seguindo técnica asséptica, os campos estéreis eram colocados. O quinto espaço intercostal esquerdo era infiltrado com 20 ml de bupivacaína 0,5% como complementação anestésica. (Fig 1)

A toracotomia com entrada no espaço pleural foi realizada a seguir. O afastamento do pulmão esquerdo permitiu o acesso à aorta torácica descendente, individualização da mesma, identificação e controle das artérias intercostais com fio seda 3.0, sem ligadura.

Após cinco minutos da administração endovenosa de 100 U/Kg de heparina, procedia-se o pinçamento proximal e distal da aorta, aortotomia longitudinal de aproximadamente 2 cm e sutura da bolsa previamente confeccionada, com fio polipropileno 6.0. Após o término da anastomose a linha de sutura era observada com a intenção de surpreender sangramento ou trombose precoce do aneurisma.

Após a liberação do pinçamento da aorta e do controle das artérias intercostais, o tórax foi suturado por planos. Durante a toracorráfia, o pulmão era mantido em hiperinsuflação e um dreno tubular rígido de silicone era posicionado no espaço pleural, sendo retirado no final do procedimento.

Após a recuperação anestésica os animais permaneciam sob observação de veterinários do próprio Centro de Pesquisas do Hospital, sendo mantida analgesia conforme necessidade e observadas eventuais complicações. No dia seguinte, eram transferidos a um sítio para acompanhamento nos próximos 20 dias, onde eram alimentados com ração regular para a idade.

Controle arteriográfico e eutanásia

Após completar três semanas de seguimento, os animais eram novamente pesados e submetidos ao mesmo protocolo de preparo e anestesia. Além o preparo do hemitórax esquerdo, também era degermada e preparada a região inguinal esquerda.

Na região inguinal esquerda, após infiltração com bupivacaína 0,5%, dissecava-se a artéria femoral comum e, sob visão direta, instalava-se introdutor valvulado 5F. Através deste introdutor, auxiliado por guia metálica, progredia-se um cateter diagnóstico tipo “pig tail” 5F até a aorta torácica. Após heparinização plena, com 100 U/Kg, realizava-se arteriografia convencional, pela injeção de 20 ml de contraste iodado (Hypaque), para confirmar a perviedade do aneurisma. (Fig 2) Eventualmente, o acesso para arteriografia era feito através da artéria ilíaca esquerda.

Análise anatomopatológica

Após realizar toracotomia e controle proximal e distal da aorta torácica conforme o protocolo inicialmente descrito, administrava-se dose letal de KCl endovenoso e procedia-se a retirada da aorta torácica descendente em bloco único. A peça retirada era lavada em solução salina e conservada em solução tamponada de formaldeído a 10%.

Os espécimes retirados foram fotografados, incluídos em parafina e as lâminas obtidas representaram a circunferência total do aneurisma e as linhas de sutura da bolsa de pericárdio bovino na parede arterial. As colorações utilizadas para análise em microscopia óptica foi a hematoxilina-eosina (HE), tricrômio de Masson e imunohistoquímica anti-actina muscular humana, clone HHF35.

Foram observados qualitativamente, os seguintes aspectos: 1) presença de trombo mural, 2) endotelização, 3) reação inflamatória transmural e periadventicial, 4) calcificação. Na avaliação macroscópica foram avaliadas a

integridade da linha de sutura, aderência com tecidos vizinhos e perviedade das artérias intercostais.

Definições e análise estatística

Foi considerado aneurisma a dilatação focal com diâmetro excedendo em 50% o diâmetro da aorta torácica proximal adjacente. Tal resultado era aferido através da arteriografia e confirmado pela medida do espécime durante a macroscopia.

Para demonstrar o crescimento dos animais durante o período de estudo, o peso médio no momento da primeira intervenção cirúrgica foi comparado com o apresentado no momento da eutanásia. Estes valores foram comparados aos descritos em artigos específicos^{17 - 19} e com o animal controle.

O tamanho da amostra foi calculado através de média dos estudos semelhantes já realizados.

Os resultados obtidos foram expressos em média \pm desvio padrão.

Nas comparação da diferença de peso antes e depois da intervenção, foi utilizado o teste t de Student para amostras pareadas, considerando significativo $p < 0,05$.

Resultados

Modelo experimental

Os dez animais submetidos à criação do aneurisma sobreviveram ao experimento.

Não foram observadas complicações maiores, como paraplegia ou paraparesias em nenhum dos animais. Também não foram observadas complicações menores, como infecção de ferida operatória, seromas ou hematomas.

O tempo médio de cirurgia foi de $46,1 \pm 7,6$ minutos e o tempo médio de pinçamento foi de $11,9 \pm 2,3$ minutos.

Durante o pinçamento da aorta torácica observou-se taquicardia em todos os animais, mas em todos os casos houve recuperação após a liberação do pinçamento.

Após a extubação, cinco animais (50%) apresentaram espasmo de vias aéreas, recuperado espontaneamente após alguns minutos, sem comprometimento da saturação de oxigênio.

Todos os animais apresentavam perviedade do saco aneurismático no momento da realização da aortografia de controle

Quando da retirada da aorta torácica, observou-se aderência do tecido pulmonar adjacente ao aneurisma em todos os casos. Nenhum dos animais apresentava derrame pleural.

Foi observado aumento do peso em todos os animais durante os 21 dias de seguimento. O peso médio no início do experimento foi de $19,1 \pm 2,2$ kg e de $26,5 \pm 4,1$ kg no momento da eutanásia ($p < 0,05$) (Fig. 3). O ganho de peso diário dos animais variou de 80 g. a 523 g, com média de 352 g. O animal controle apresentava peso inicial de 19 kg, ao final de três semanas, seu peso era de 28 kg, com ganho diário de 428 g. Os resultados são sumarizados na tabela 1.

Macroscopia e histologia

As peças obtidas consistiram de segmento da aorta torácica que continha a dilatação aneurismática produzida pelo experimento. Também consistia do tecido conjuntivo adjacente, assim como de parênquima pulmonar aderido (Fig 2 e 4).

O diâmetro médio da aorta torácica descendente, proximal ao aneurisma, era de $1,1 \pm 0,2$ cm e o diâmetro médio máximo da área aneurismática foi de $3,1 \pm 0,2$ cm ($p < 0,05$).

Em todas as peças as artérias intercostais adjacentes ao aneurisma estavam pérvias.

Observou-se endotelização em todas as peças sendo que em cinco o endotélio cobria toda a superfície do aneurisma e nas demais, somente parcialmente. A formação de trombo mural foi observada em oito aneurismas (80%). Em um caso, com endotelização total, não ocorreu trombo. Em quatro peças (40%) ocorreu calcificação intra-trombo e em todas as peças observou-se calcificação na região da sutura. (Fig. 5)

Reação granulomatosa ocorreu na periferia do aneurisma, assim como na região da aorta nativa adjacente a ele.

Na região periadventicial, observou-se infiltração de células musculares lisas, positivas para actina, em todas as peças. A espessura desta camada era variável, mas significativa (Fig 6).

Discussão

O aneurisma e a dissecação da aorta torácica são duas das principais patologias que acometem esta artéria. Suas morbidade e mortalidade são extremamente altas, chegando a 34% nos primeiros trinta dias após intervenção²⁰.

A incidência destas patologias, em recente publicação, mostrou-se maior que a anteriormente descrita²¹, chegando a 16,3 casos para cada 100.000 indivíduos do sexo masculino²⁰.

O impacto da intervenção endovascular em casos de aneurisma da aorta descendente é notável^{22 23}, muito embora, a comparação entre grupos de cirurgia convencional versus endovascular ainda não tenha sido feita diretamente sem importantes vieses¹³ e talvez nem possa vir a ser feita, por razões éticas. O desenvolvimento quase contínuo das endopróteses empregadas contribui para que melhores resultados sejam atingidos. Entretanto, a melhor qualidade dos materiais deve ser seguida do desenvolvimento da habilidade dos operadores.

Neste aspecto, a disponibilidade de um modelo experimental que possibilite tanto o treinamento do operador, quanto o teste do novos materiais se faz necessária.

Os modelos experimentais animais se mostraram melhores que os modelos robóticos ou virtuais no treinamento dos operadores, além de fornecerem condições de simular todos os passos do procedimento^{24 15}.

Embora existam inúmeros modelos experimentais de aneurismas de aorta abdominal¹⁰, são raros os modelos de aneurisma de aorta torácica^{11 12}.

A necessidade de desenvolver um modelo experimental em animal de fácil manejo, baixo custo e eticamente viável nos levou a optar pelo suíno como animal de experimentação. Somado a isso, observa-se que o sistema cardiovascular deste animal, assim como a resposta de coagulação são semelhantes aos humanos^{25 - 27}. Não havia na literatura, referência a um modelo semelhante, em suínos.

O objetivo primordial foi produzir uma intervenção cirúrgica que pudesse ser suportada pelo animal de experimentação. Uma cirurgia de grande porte, necessitando de toracotomia esquerda, poderia proporcionar algumas dificuldades, desde a manutenção de adequada ventilação, até a presença de pneumotórax significativo após a toracorráfia, derrame pleural e atelectasias. Outro temor foi a possibilidade de o procedimento interferir na curva de crescimento esperada para o animal.

Assim como no modelo experimental de Formichi *et al*¹¹, em que o animal de experimentação era o cão, não foram observados óbitos ou paraplegia. A sobrevivência de todos os animais de experimentação permite afirmar que a intervenção é suportável. Além disso, os animais apresentaram ganho de peso diário médio de 352 g. Nesta faixa etária, o ganho de peso para a espécie é influenciado por fatores externos, apresentando limites amplos, sendo o normal esperado entre 234 a 451 g/dia^{17 - 19}. Três animais apresentaram ganho de peso diário inferior ao esperado durante o período de observação. Nos demais, o ganho de peso foi adequado, permitindo concluir que a intervenção cirúrgica foi bem tolerada pela maioria dos indivíduos.

No momento da arteriografia de controle observamos que a artéria femoral do animal apresentava diâmetro reduzido e intensa vasoconstrição, dificultando seu manuseio. Optamos por utilizar como via de acesso a artéria ilíaca externa quando a artéria femoral comum se mostrava desfavorável. Embora também ocorresse vasoconstrição, o diâmetro suportava adequadamente o introdutor 5F.

A angiografia de controle não identificou a perviedade das artérias intercostais, uma vez que o Centro de Experimentação Animal não contava com aparelho que permitisse a identificação das mesmas, mas durante a retirada da aorta e a análise macroscópica, sua patência pôde ser confirmada.

O aspecto macroscópico e o resultado arteriográfico são semelhantes aos observados no modelo experimental descrito por Uflacker *et al*²⁸, com duas importantes diferenças: Primeira - no modelo citado, o sítio de confecção do aneurisma foi a aorta abdominal, com comportamento hemodinâmico notadamente diferente da aorta torácica; Segunda – o material utilizado no estudo citado foi o poliéster, com reações diferentes dos materiais biológicos, como é o caso do pericárdio bovino, utilizado em nosso modelo.

Não há na literatura referências quanto às características microscópicas dos aneurismas torácicos confeccionados em modelos experimentais, antes de sua exclusão por endoprótese.

A endotelização completa do saco aneurismático foi observada em cinco peças, as demais apresentavam endotelização incompleta. Quanto a este aspecto, alguns modelos descritos em aorta abdominal e ilíaca demonstravam endotelização^{29 30}, outros demonstravam a formação de neoíntima^{32 32}. As

diferentes características de fluxo da aorta torácica, o tempo entre a intervenção cirúrgica e a aferição do resultado e o formato do aneurisma podem ser responsáveis por esta variação. Trombo mural foi observado em oito animais (80%), sendo que em dois havia calcificação intra-trombo. Possivelmente as razões para estes achados também sejam as mesmas que influenciaram a endotelização dos aneurismas, embora não pareça haver relação entre endotelização e trombo mural neste modelo.

A intensa reação cicatricial, com presença de miofibroblastos na região periadventicial é semelhante à reação descrita anteriormente por Zollikofer *et al* em um modelo experimental em cães ³³. Esta reação não é observada nos aneurismas degenerativos humanos, e também não foi descrita em modelos experimentais suínos. A evolução desta resposta tecidual necessita de maior tempo de observação.

O tempo de seguimento escolhido permitiu observar alterações histopatológicas na área em que foi produzido o aneurisma. Um maior tempo de seguimento possivelmente permitirá observar alterações ainda maiores. Neste aspecto, o crescimento rápido dos suínos certamente será um fator complicador. Animais geneticamente modificados, com crescimento retardado permitiriam este seguimento.

O modelo descrito apresenta características observadas no aneurisma humano, como preservação de intercostais, presença de trombo mural, reação inflamatória da parede e calcificações. Mostrou-se estável durante o período de estudo e a técnica empregada foi bem suportada pelos animais de experimentação. Acreditamos que estas características o credenciam para

utilização como ferramenta de estudo de novos dispositivos endovasculares e de treinamento destas técnicas.

Agradecimentos

Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Referências

1. Marty B. Endovascular aneurysm repair from bench to bed. Steinkopf Verlag Darmstadt, 2005.
2. Anidjar S, Salzmann JL, Gentric D, Lagneau P, Camilleri JP, Michel JB. Elastase-induced experimental aneurysms in rats. *Circulation*. 1990; 82:973-981
3. Anidjar S, Dobrin PB, Eichorst M, Graham GP, Chejfec G. Correlation of inflammatory infiltrate with the enlargement of experimental aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 1992; 16:139-147
4. Criado E, Marston WA, Woosley JT, Ligush J, Chutter TA, Baird C, Suggs CA, Mauro MA, Keagy BA. An aortic aneurysm model for the evaluation of endovascular exclusion prostheses. *J Vasc Surg*. 1995; 22:306-315; discussion 314-315
5. Martson WA, Criado E, Baird CA, Keagy BA. Reduction of aneurysm pressure and wall stress after endovascular repair of abdominal aortic aneurysm in a canine model. *Ann Vasc Surg*. 1996; 10:166-173
6. Mousa A, Dayal R, Bernheim J, Henderson P, Hollenbeck S, Trocciola S, Prince M, Gordon R, Badimon J, Fuster V, Marin ML, Kent C, Faries P. A canine model to study the significance and hemodynamics of type II endoleaks. *J Surg Res*. 2005; 123:275-283
7. Rhee JY, Trocciola SM, Dayal R, Lin S, Chaer R, Kumar N, Mousa A, Bernheim J, Christos P, Prince M, Marin ML, Gordon R, Badimon J, Fuster V, Kent CK, Faries PL. Treatment of type II endoleaks with a novel polyurethane thrombogenic foam: Induction of endoleak

- thrombosis and elimination of intra-aneurysmal pressure in the canine model. *J Vasc Surg.* 2007; 42:321-328
8. Narayanaswamy M, Wright KC, Kandarpa K. Animal Models for Atherosclerosis, Restenosis, and endovascular Graft Research. *J Vasc Interv Radiol.* 2000; 11: 5-17.
 9. Dobrin PB. Animal models of aneurysms. *Ann Vasc Surg.* 1999; 13:641-648
 10. Lee LK, Faries PL. Assessing the effectiveness of endografts: Clinical and experimental perspectives. *J Vasc Surg.* 2007; 45: 123A-130A
 11. Formichi M, Marois Y, Roby P, Marinov G, Stroman P, King MW, Douville Y, Guidoin R. Endovascular repair of thoracic aortic aneurysm in dogs: Evaluation of a nitinol-polyester self-expanding stent-graft. *J Endovasc Ther.* 2000; 7:47-67
 12. Ikonomidis JS, Gibson WG, Gardner J, Sweterlitsch S, Thompson RP, Mukherjee R, Spinale FG. A murine model of thoracic aortic aneurysms. *J Surg Res.* 2003; 115:157-163
 13. Bavaria EJ, Coselli JS, Curi MA, Eggebrecht H, Elefteriades JA, Erbel R, Gleason TG, Lytle BW, Mitchell RS, Nienaber CA, Roselli EE, Safi H, Shemin RJ, Sicard GA, Sundt TM, Szeto WY, Wheatley III GH. Expert consensus document on the treatment of descending thoracic aortic disease using endovascular stent-grafts. *Ann Thor Surg.* 2008; 85:S1-S41
 14. Gould DA, Reekers JA, Kessel DO, Chalmers NC, Sapoval M, Patel AA, Becker GJ, Lee MJ, Stockx L. Simulation devices in interventional radiology: Caveat emptor. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2006; 29:4-6

15. Berry M, Lystig T, Beard J, Klingestierna H, Reznick R, Lönn L. Porcine transfer study: Virtual reality simulator training compared with porcine training in endovascular novices. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2007; 30: 455-461
16. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Institute of laboratory animal resources, Commission on Life Sciences, National Research Council, National Academy Press, Washington DC. 1996
17. Kerr BJ, Yen JT, Nienaber A, Easter RA. Influences of dietary protein level, amino acid supplementation and environmental temperature on performance, body composition, organ weights and total heat production of growing pigs. *J Anim Sci.* 2003; 81:1998-2007
18. Costa ARC, Lopes PS, Torres RA, Regazzi AJ, Silva MA, Euclides RF, Pires AV. Estimação de parâmetros genéticos em características de desempenho de suínos das raças Large White, Landrace e Duroc. *R Bras Zootec.* 2001; 30:49-55
19. Manno MC, Oliveira RFM, Donzele JL, Ferreira AS, Oliveira WP, Lima KRS, Vaz RGMV. Efeito da temperatura ambiente sobre o desempenho de suínos dos 15 aos 30 kg. *R Bras Zootec.* 2005; 34:1963-1970
20. Olsson C, Thelin S, Stahle E, Ekbom A, Granath F. Thoracic aortic aneurysm and dissection: increasing prevalence and improved outcomes reported in a nationwide population-based study of more than 14.000 cases from 1987 to 2002. *Circulation.* 2006; 114:2611-2618
21. Bieckerstaff LK, Pairolero PC, Hollier LH, Melton LJ, Van Peenen HJ, Cherry KJ, Joyce JW, Lie JT. Thoracic aortic aneurysms: a population-based study. *Surgery.* 1982; 92:1103-1108

22. Patel HJ, Shillingford MS, Williams DM, Upchurch GR, Dasika NL, Prager RL, Deeb GM. Survival benefit of endovascular descending thoracic aortic repair for the high-risk patient. *Ann Thor Surg.* 2007; 83:1628-1634
23. Makaroun MS, Dillavou ED, Kee ST, Sicard G, Chaikof E, Bavaria J, Williams D, Cambria RP, Mitchell RS. Endovascular treatment of thoracic aortic aneurysms: results of phase II multicenter trial of the GORE TAG thoracic endoprosthesis. *J Vasc Surg.* 2005; 41:1-9
24. Neequaye SK, Aggarwal R, Van Herzeele I, Darzi A, Cheshire NJ. Endovascular skills training and assessment. *J Vasc Surg.* 2007; 46:1055-1064
25. Schwartz RS, Huber KC, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vliestra RE, Holmes DR. Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model. *J Am Coll Cardiol.* 1992; 19:262-274
26. Schwartz RS. Neointima and arterial injury: Dogs, rats, pigs, and more. *Labor Invest.* 1994; 71:789-791
27. Mason RG, Read MS. Some species differences in fibrinolysis and blood coagulation. *J Biomed Mater Res.* 1971; 5:121-128
28. Uflacker R, Brothers T. Filling of the aneurismal sac with DEAC-glucosamine in an animal model of abdominal aortic aneurysm following stent-graft repair. *J Cardiovasc Surg.* 2006; 47:425-436
29. França LHG, Pereira AH, Perini SC, Argenta R, Aveline CC, Mollerke RO, Soares ME, Nóbrega F, Ferreira MP. Modelo experimental de

- aneurisma sacular de artéria íliaca comum com pericárdio bovino em suínos. *J Vasc Br.* 2005; 4:353-356
30. Soula PS, d'Othée BJ, Otal P, Amin C, El Khoury J, Delisle MB, Cérène A, Joffre F, Rousseau H. Macroporous polyester-covered stent in an experimental abdominal aortic aneurysm model. *J Endovasc Ther.* 2001; 8:390-400
31. Wisselink W, Abruzzo FM, Shin CK, Ramirez JR, Rodino W, Kirwin JD, Panetta TF. Endoluminal repair of aneurysms containing ostia of essential branch arteries: an experimental model. *J Endovasc Surg.* 1999; 6:171-179
32. Faries PL, Sanchez LA, Marin ML, Parsons RE, Lyon RT, Oliveri S, Veith FJ. An experimental model for the acute and chronic evaluation of intra-aneurysmal pressure. *J Endovasc Surg.* 1997; 4:290-297
33. Zollikofer CL, Redha FH, Brühlmann WF, Uhlschmid GK, Vlodayer Z, Castaneda-Zuniga WR, Amplatz K. Acute and long-term effects of massive balloon dilation on the aortic wall and vasa vasorum. *Radiology.* 1987; 164: 145-149

Tabela 1

Diâmetros dos aneurismas e evolução do peso dos animais

Indivíduo	Peso Inicial	Peso Final	Diâmetro Aorta (mm)	Diâmetro Aneurisma	Proporção (An/Ao)
P 1	20	28	12	31	2,6
P 2	18	22	11	28	2,5
P 3	17	26	12	32	2,7
P 4	18	20	9	32	3,5
P 5	18	25	8	29	3,6
P 6	19	30	12	33	2,7
P 7	19	30	11	29	2,6
P 8	19	30	10	32	3,2
P 9	25	32	12	33	2,7
P 10	18	22	12	30	2,5
Controle	19	28	12	-	
	19,1±2,2	26,5±4,1*	11±2	31±2*	2,9±0,4

* Média ± desvio padrão, p<0,05.

Figura 1.

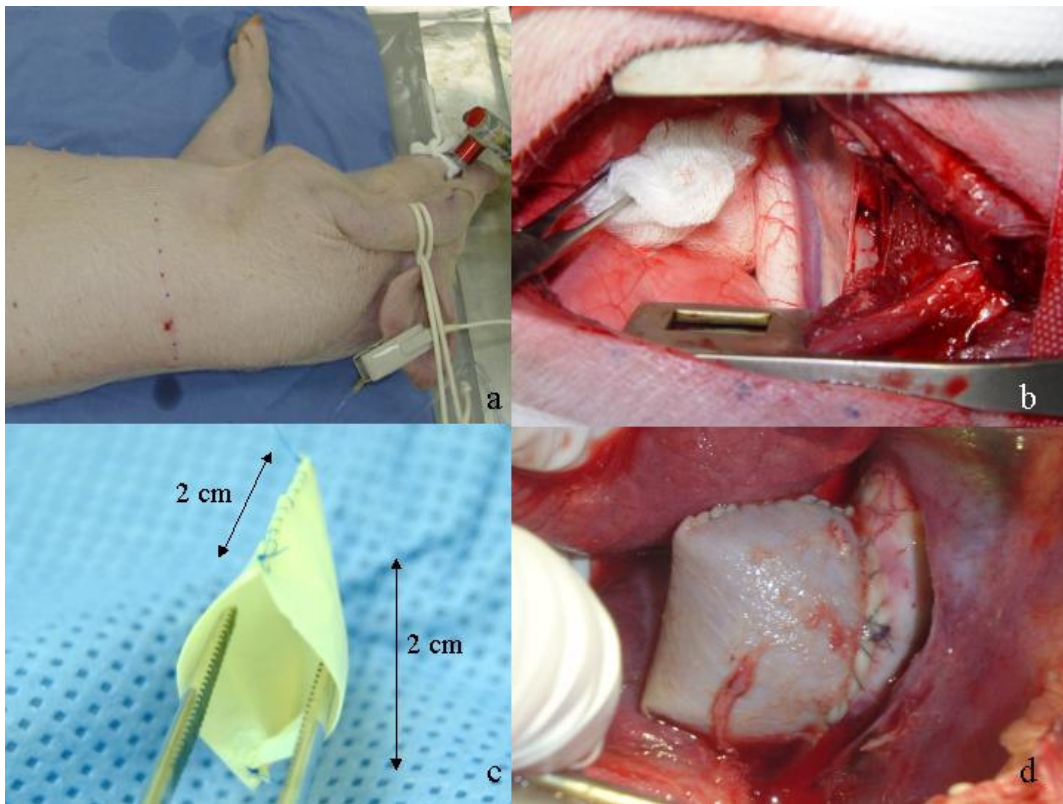


Figura 2.

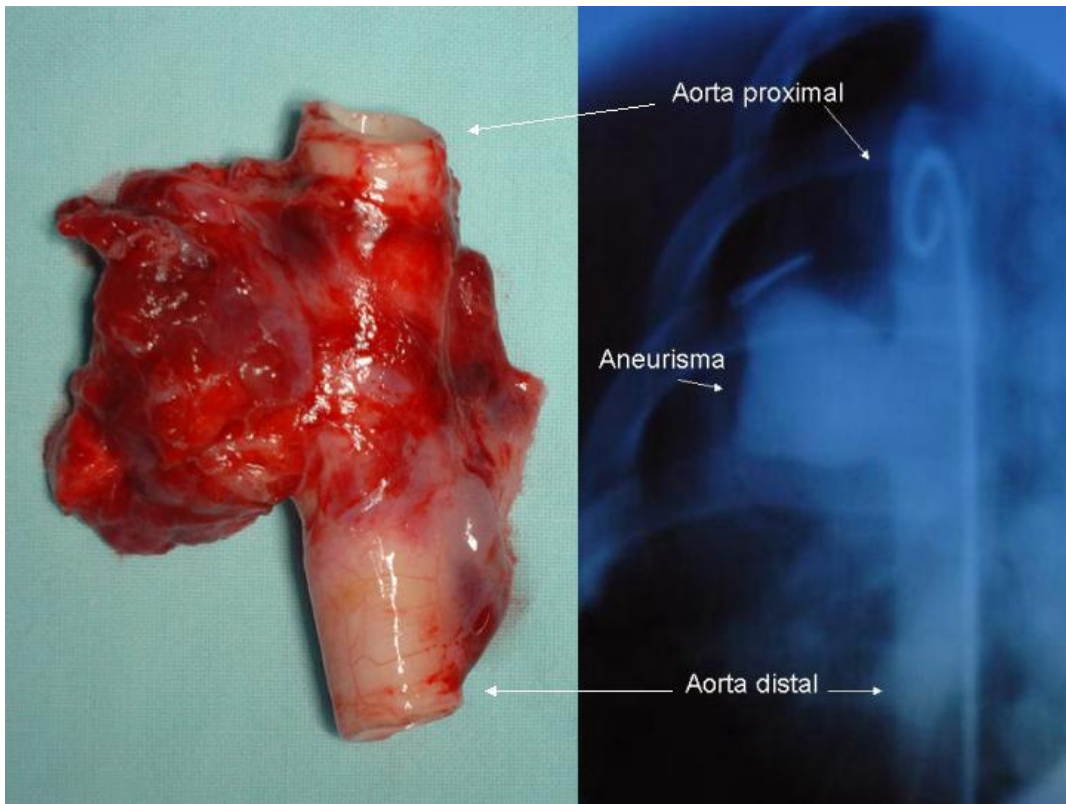


Figura 3.

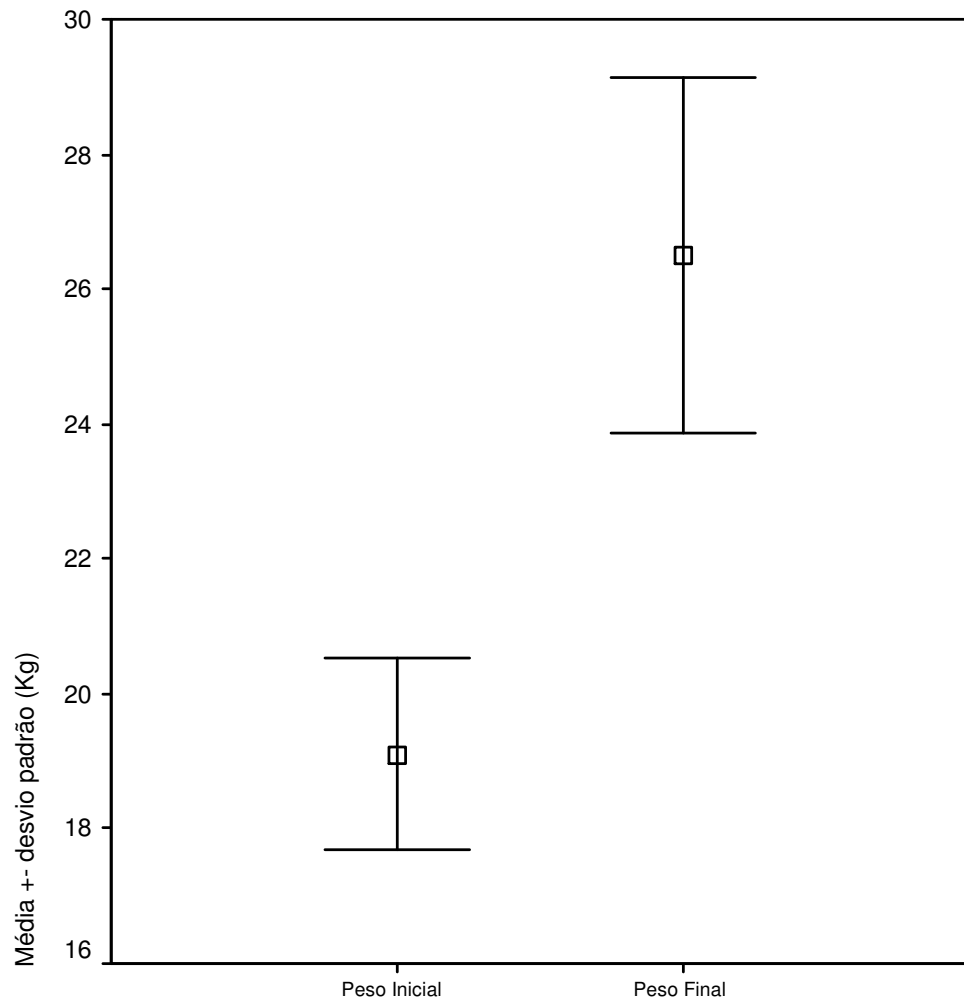


Figura 4.

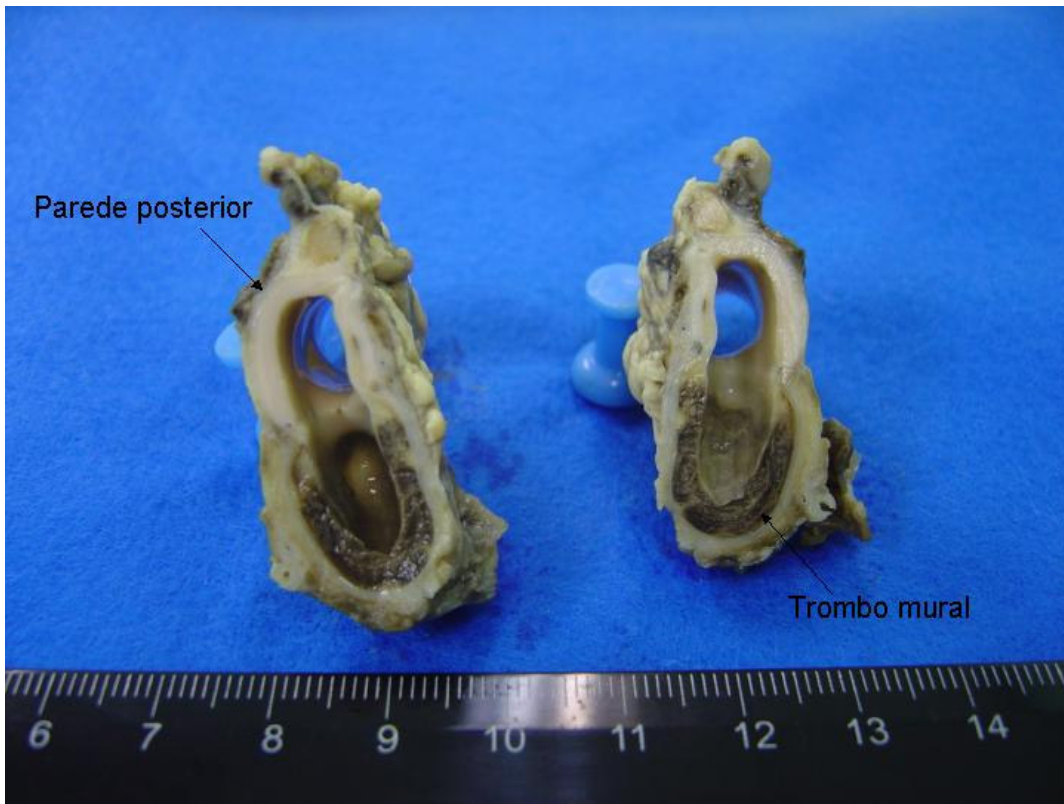


Figura 5.

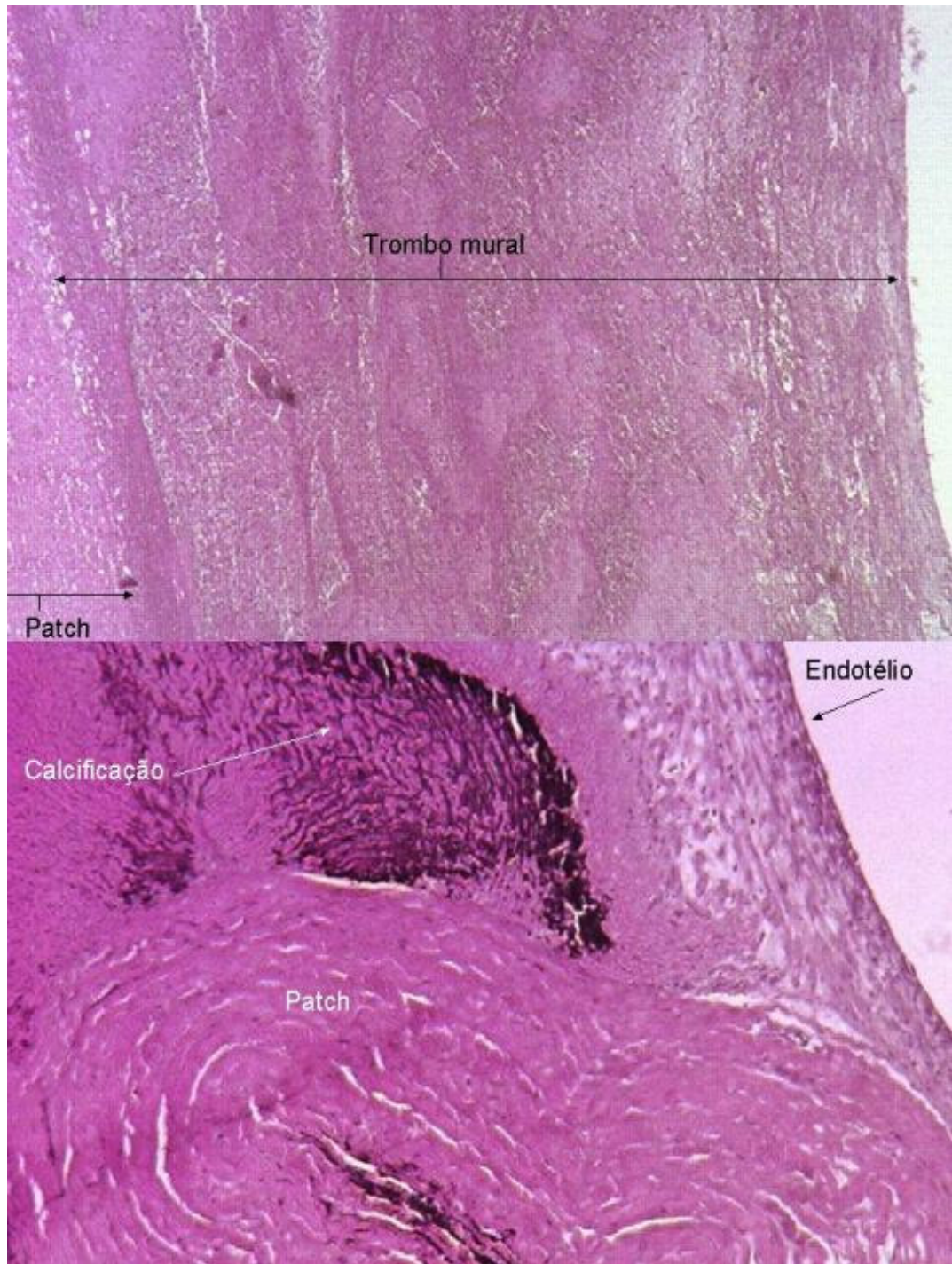
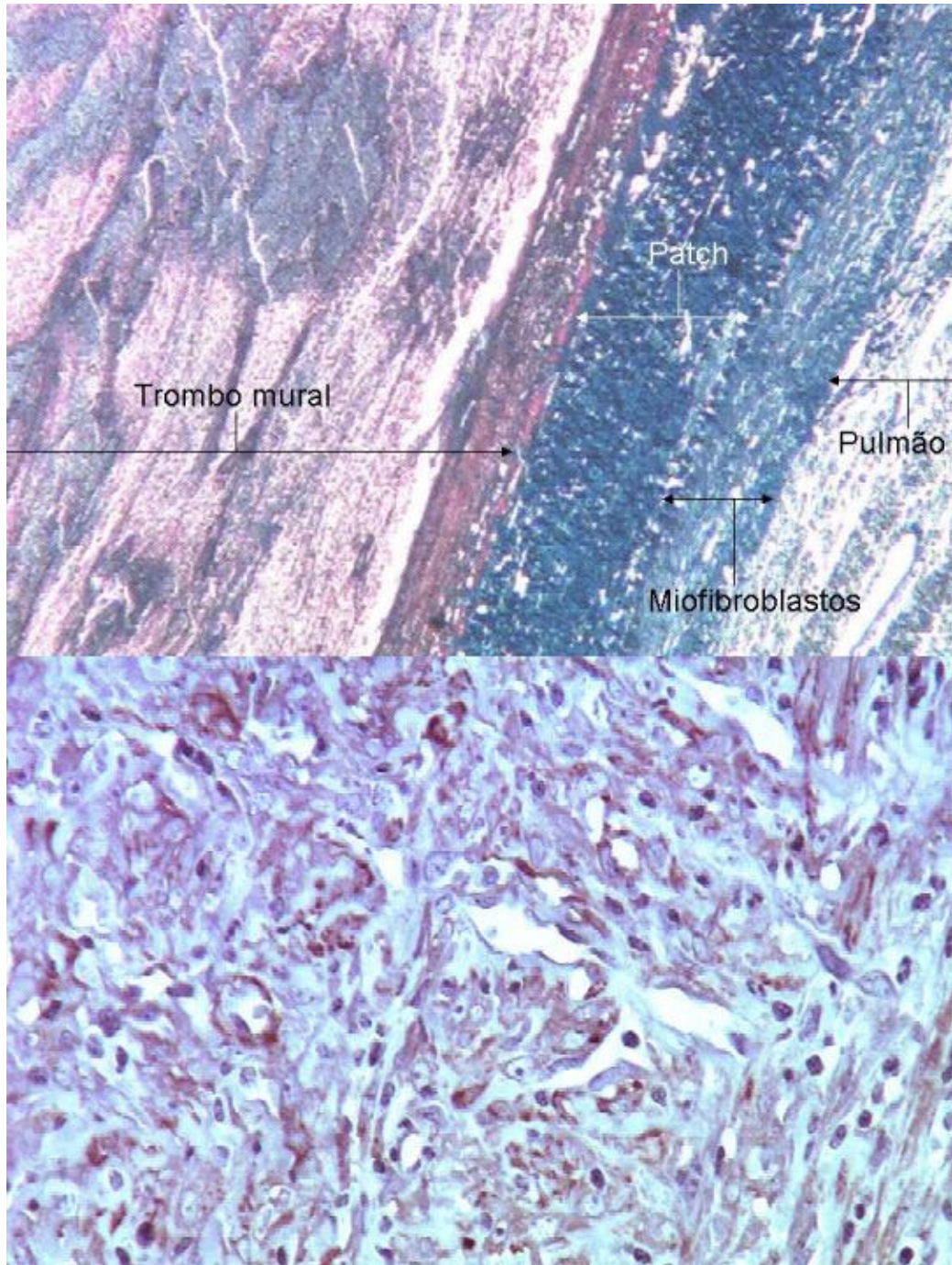


Figura 6.



LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1. A) Posicionamento do animal. B) Exposição da aorta torácica. C) Bolsa de pericárdio bovino. D) Aneurisma após a liberação do pinçamento

Figura 2. Aorta torácica descendente com o aneurisma e aortografia de controle

Figura 3. Ganho ponderal durante o seguimento. Diferença entre os grupos, Teste t de Student para amostras pareadas ($p < 0,05$)

Figura 4. Aneurisma após conservação em formalina tamponada

Figura 5. Coloração Hematoxilina-Eosina. A) Trombo mural 100x. B) Calcificação na linha de sutura 250x

Figura 6. A) Processo cicatricial na parede do aneurisma, Masson, 250x. B) Miofibroblastos periadventiciais, positivos para actina, clone HHF35, 400x

6. Anexos



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto:

Projeto: 04-488

Pesquisadores:

ADAMASTOR HUMBERTO PEREIRA

SILVIO CESAR PERINI

CARLOS THADEU SCHMIDT CERSKI

LUIS HENRIQUE GIL FRANÇA

RODRIGO ARGENTA

Título: MODELO EXPERIMENTAL DE ANEURISMA DE AORTA TORÁCICA COM PERICÁRDIO BOVINO EM SUÍNOS

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada ao CEP/HCPA. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

Porto Alegre, 20 de abril de 2005.


Profª Nadine Clausell

Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

GPPG- CENTRO DE PESQUISAS

ORÇAMENTO PARA PROJETO DE PESQUISA

Orientador: Prof. Adamastor Humberto Pereira

Pesquisador: Rodrigo Argenta

Projeto 04.488

1) UNIDADE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

QUANTIDADE	ITEM	VALOR TOTAL
02	Diárias de alojamento <i>pi/O</i> animais	100,00
40	Agulha 25x7 cod 2615	8,00
02	Alcool iodado	10,00
30	Buterfly 27 cod 2500	10,50
30	Cloreto sódio 0,9% 250 ml	65,00
40	Compressa campo operatório cód 1945	40,00
5 pacotes	Compressa gaze cód 1953	2,50
30	Equipos de soro	45,00
30	Glicose 5% 250 ml cód 201545	39,00
20	Fio vicryl O cod 118559	96,00
20	Fio mononylon 3.0 cod 195057	92,00
25	Lâmina de bisturi	25,00
60	Luva cirúrgica estéril	36,00
60	Seringa 10 ml	12,00
10	Cefazolina cód. 248681	31,00
10	Heparina cód.181269	85,00
10	Água bi-destilada cód. 24740	12,00
03	Isoflurano cód.16651 O	201,00
01	Polividine	9,00
02	Luva não estéril	18,00
22	Avental descartável	66,00
15	Halotano frasco cód.15385	306,00
60	Lençol descartável	48,00
60	Campo cirúrgico	15,00
15	Cefazolina fr/amp cód 248681	45,00
30	Esterilização de material	390,00
90	Campo cirúrgico 45x45	54,00
22	Cateter 14g	44,00
22	Anestésias	110,00
150	Suplementação anestésica	375,00
22	Tricotomias	44,00
22	Esterilização de materiais	286,00
75 horas	Taxa de sala cirúrgica bloco	1000,00
06 meses	Material rateio	180,00

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

GPPG- CENTRO DE PESQUISAS

ORÇAMENTO PARA PROJETO DE PESQUISA

Orientador: Prof. Adamastor Humberto Pereira

Pesquisador: Rodrigo Argenta

Projeto 04.488

22	Eutanásia	110,00
10	Ketamina	350,00
10	Xilasina	200,00
10	Bupivacaina cód 235342	40,00
10	Midazolam cód 17272	30,00
10	Contraste cód 11649	500,00
44	Filme raiox cód 22705	123,60
		5253,60

2) Serviços de Terceiros

24	Fio polipropileno 6.0 cod.181200	240,00
11	Porcos AGEOGEN	880,00
10	Xilocaina 5%	40,00
40	Transporte animais	2.000,00
20	Diárias p/ 10 animais Granja	1.911,00
		5.071,00

O material shunt de silicone não foi incluído neste orçamento.

VALOR TOTAL DO ORÇAMENTO: R\$ 10.324,60

quarta-feira, 20 de maio de 2009. Rosane Schlatter

Administradora CP_ HCP A