IVANILSON ALVES DE OLIVEIRA

Desenvolvimento de novo modelo experimental de aneurisma sacular mediante a incubação intra-arterial de papaína em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)

> Tese apresentada à Universidade de São Paulo para para obtenção do título de Doutor em Ciências

> Área de concentração: Radiologia Orientador: Prof. Dr. José Guilherme Mendes Pereira Caldas

São Paulo 2010

Errata

IVANILSON ALVES DE OLIVEIRA

Desenvolvimento de novo modelo experimental de aneurisma sacular mediante a incubação intra-arterial de papaína em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)

> Tese apresentada à Universidade de São Paulo para para obtenção do título de Doutor em Ciências

> Área de concentração: Radiologia Orientador: Prof. Dr. José Guilherme Mendes Pereira Caldas

São Paulo 2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira, Ivanilson Alves de

Desenvolvimento de novo modelo experimental de aneurisma sacular mediante a incubação intra-arterial de papaína em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) / Ivanilson Alves de Oliveira. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de: Radiologia.

Orientador: José Guilherme Mendes Pereira Caldas.

Descritores: 1.Elastase 2.Papaína 3.Aneurisma 4.Modelos animais 5.Coelho

USP/FM/DBD-348/10

Dedicatória

À Virgem Maria, às minhas filhas Maria Eduarda e Mariana, à minha esposa Adriana, aos meus pais e aos meus irmãos.

Agradecimentos

Guilherme Mendes Pereira Aos professores José Caldas (Neurorradiologia, USP), Hélio Araújo Oliveira (Neurologia, UFS), Érika de Abreu Costa Brito (Patologia, UFS), Hugo Leite de Farias Brito (Patologia, UFS) lataanderson Alves de Oliveira (Química, UFS), Denisson Alves de Oliveira (Física, UFS) Waldecy de Lucca Júnior (Morfologia, UFS), José Aderval Aragão (Morfologia, UFS), Enaldo Vieira Melo (Estatística, UFS), Francisco do Prado Reis (Anatomia, UFS), Vera Lúcia Corrêa Feitosa (Histologia, UFS), Eduardo Pompeu (Biotério, FMUSP). Às técnicas em histologia Adriana, Josiete, Tâmara e Denise (UFS). Ao senhor Eraldo Nascimento Oliveira (UFS). Aos técnicos do Biotério da FMUSP, aos funcionários do Centro de Esterilização de Materiais do HU-UFS e às secretárias da PG da Radiologia da USP, Lia Melo e Sandra Barros. A todos, minha profunda gratidão pois, sem suas contribuições, este trabalho jamais teria existido.

Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas				
Lista de tabelas, quadros e gráficos				
Resumo				
Summary				
1 INTRODUÇÃO	1			
2 OBJETIVOS	3			
3 REVISÂO DA LITERATURA	4			
3.1 Princípios gerais de construção dos aneurismas experimentais	4			
3.2 Escolha do animal 4				
3.3 Principais modelos de aneurisma sacular	5			
3.4 Aneurismas experimentais construídos cirurgicamente	6			
3.5 Outros modelos experimentais de aneurisma	8			
3.6 Modelo elastase-induzido	9			
3.6.1 Mecanismos de ação da elastase na formação de aneurismas	9			
3.6.2 Criação e aprimoramento do modelo elastase- induzido	10			
3.6.3 Aspectos morfológicos e geométricos	16			
3.6.4 Histologia dos aneurismas elastase-induzidos	20			
3.7 Anatomia vascular cérvico-cerebral do coelho	22			
3.8 Papaína	25			
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28			
4.1 Animais e comitê de ética	28			
4.2 Técnica cirúrgica	28			
4.2.1 Anestesia e cuidados pré-operatórios	28			

4.2.2 Criação do aneurisma		
4.2.3 Cuidados pós-operatórios		
4.3 Macroscopia e histologia		
4.3.1 Medida da espessura da parede arterial		
4.3.2 Quantificação da trombose		
4.3.3 Quantificação das fibras elásticas	35	
4.3.4 Infiltrado inflamatório parietal		
4.3.5 Endotélio	37	
4.3.6 Fibrose intimal	37	
4.7 Análise estatística		
4.7.1 Hipóteses nulas e alternativas	38	
5 RESULTADOS	41	
6 DISCUSSÃO	63	
7 CONCLUSÕES		
8 ANEXOS		
9 REFERÊNCIAS		

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais modelos cirúrgicos de aneurisma sacular experimental.	8
Figura 2. Representação gráfica da técnica endovascular de construção do aneurisma elastase-induzido	12
Figura 3. Vascularização visceral do pescoço do coelho	24
Figura 4. Sistema de anastomoses intracranianas do coelho	25
Figura 5. Processo de criação do aneurisma	31
Figura 6. Autópsia do coelho	33
Figura 7. Mensuração da espessura parietal	34
Figura 8. Método de quantificação das fibras elásticas	36
Figura 9. Exemplo de diâmetro dos aneurismas	44
Figura 10. Exemplo de comprimento dos aneurismas	46
Figura 11. Destruição das fibras elásticas	51
Figura 12. Endotélio	58
Figura 13. Fibrose intimal	60
Figura 14. Inflamação parietal	62

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Diâmetro das artérias controles	42
Gráfico 2. Diâmetro das artérias testes	43
Gráfico 3. Diferença do diâmetro entre os testes e os controles	44
Gráfico 4. Comprimento dos aneurismas	46
Gráfico 5. Quantidade de fibras elásticas dos controles representada em número de pixels	48
Gráfico 6. Quantidade de fibras elásticas dos testes representada em número de pixels	49
Gráfico 7. Diferença da quantidade de fibras elásticas (em número de pixels) entre os teses e os controles	50
Gráfico 8. Espessura dos controles	53
Gráfico 9. Espessura dos testes	54
Gráfico 10. Diferença de espessura parietal entre os testes e os controles	55
Gráfico 11. Comparação do grau de trombose entre os grupos elastase e papaína	56
Gráfico 12. Comparação do grau de lesão endotelial entre os grupos elastase e papaína	58
Gráfico 13. Comparação do grau de fibrose intimal entre os grupos elastase e papaína	60
Gráfico 14. Comparação do grau de inflamação mural entre os grupos elastase e papaína	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diâmetro (mm) dos testes e dos seus controles com suas respectivas diferenças	41		
Tabela 2. Comprimento (mm) dos aneurismas	45		
Tabela 3. Quantidade de fibras elásticas, representada em número de pixels (10 ⁸), dos testes e dos controles com suas respectivas diferenças.	47		
Tabela 4. Espessura parietal (mm) dos testes e dos controles com suas respectivas diferenças	52		
Tabela 5. Percentual do grau de trombose (x100)	55		
Tabela 6. Grau de lesão endotelial no grupo elastase			
Tabela 7. Grau de lesão endotelial no grupo papaína 5			
Tabela 8. Grau de fibrose intimal no grupo elastase	59		
Tabela 9. Grau de fibrose intimal no grupo papaína	59		
Tabela 10. Grau de inflamação mural no grupo elastase	61		
Tabela 11. Grau de inflamação mural no grupo papaína	61		

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

mm	milímetro
mm ³	milímetro cúbico
mL	mililitro
Kg	quilograma
μm	micrômetro
°C	grau Celsius
ACC	Artéria carótida comum
ACCD	Artéria carótida comum direita
ACCE	Artéria carótida comum esquerda
ACI	artéria carótida interna
ACE	artéria carótida externa
ACD	Artéria subclávia direita
ТВС	Tronco braquiocefálico
U	unidade
р	nível de significãncia
min	minuto
min.	mínimo
max.	máximo
h	hora
EP	erro padrão
Da	Dalton
IM	Intra-muscular

Resumo

Oliveira, IA. Desenvolvimento de novo modelo experimental de aneurisma sacular mediante a incubação intra-arterial de papaína em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)[tese].São Paulo, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. p. 99

INTRODUÇÃO: O modelo eslastase-induzido de aneurismas tem se destacado, nos últimos anos, porque simula as características geométricas dos aneurismas intracranianos humanos. A elastase destrói as fibras elásticas e dilata as artérias. A papaína é uma enzima que ainda não foi usada com esta finalidade. Os objetivos deste estudo foram determinar se a papaína produz aneurismas saculares em coelhos, e comparar suas características macroscópicas e histológicas com as dos aneurismas elastase-induzidos. **MÉTODO:** Dezoito coelhos brancos Nova Zelândia (1,9-3,2 kg) foram divididos em 3 grupos: I- elastase (n=7), II- papaína (n=8) e III- cirurgia controle (n=3). Os animais foram submetidos à exposição cirúrgica do pescoço, sendo que a artéria carótida comum direita foi usada como teste e a artéria carótida comum esquerda como controle. No 21° dia após a cirurgia, os animais foram sacrificados para retirada das artérias, tomada de suas medidas e análise histológica. Considerou-se formação de aneurisma quando a artéria teste dilatou em relação ao seu controle. **RESULTADOS**: Não houve aneurismas no grupo cirúrgico controle. Houve formação de aneurismas nos grupos elastase (71,4%) e papaína (100%). A diferença do diâmetro das artérias testes e seus respectivos controles não foi significativa (p= 0,15) entre os grupos elastase (média= $1,2 \pm 0,4$ mm) e papaína (média= $2,1 \pm 0,4$ mm), embora houvesse tendência deste último à maior dilatação . A histologia demonstrou que a papaína produziu maior tendência à lesão endotelial, à trombose (p = 0,01) e à inflamação parietal do que a elastase. A análise da fibrose intimal foi prejudicada em 50% dos casos do grupo papaína devido à trombose acentuada. Não houve diferença significativa entre os grupos quanto ao espessamento parietal (p=0,81) e ao grau de destruição das fibras elásticas (p= 0,009). CONCLUSÕES: A papaína produz aneurismas com tamanhos semelhantes aos da elastase, contudo a papaína provoca maior lesão endotelial, maior trombose e maior inflamação do que a elastase.

Descritores: 1.Elastase 2.Papaína 3.Aneurisma 4.Modelos animais 5.Coelho

xiii

Summary

Oliveira, IA. Development of a new experimental saccular aneurysm model through intrarterial incubation with papain in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*)[thesis].São Paulo, "Faculdade de Medicina", Universidade de São Paulo; 2010. p.99

INTRODUCTION: The elastase-induced model of experimental saccular aneurysms has been relevant in the last years because it mimics the size and geometric features of human intracranial aneurysms. Elastase destroys the artery's elastic fibers and produces arterial enlargement. Papain enzyme is also elastolytic but it had not been tested on saccular aneurysms creation yet. The purpose of this study was determine if papain produces saccular aneurysms in rabbits and to compare its gross and microscopic features are with the elastaseinduced aneurysms. METHODS: Eighteen New Zealand white rabbits (1.9 kg -3,2 kg) were separated in 3 groups: 1) sham (n=3) - 0.9% saline solution; papain (n=8) - 17-40 U; elastase (n=7) - 6-8 U. The animals underwent surgical exposure of the neck; the right common carotid artery (RCCA) was used as the test and the left common carotid artery (LCCA) as the control. On the 21st day after surgery, animals were sacrificed for removal of the arteries, measurements and histological analysis. We determine formation of aneurysm to occur when the test artery dilated compared to the control. **RESULTS:** The sham group didn't develop aneurysms. There was aneurysm formation in the elastase (71,4%) and papain (100%) groups. The difference of the diameter of the tests and their respective controls is not significant (p=0,15) between elastase (average = 1.2 ± 0.4 mm) and papain (average = 2.1 ± 0.4 mm) groups although there was tendency of this last one to produce larger aneurysms. the and to thrombosis (p = 0,01) and to parietal inflammation than the elastase. The analysis of the intimal fibrosis was not possible in 50% of papain cases due to pronounced thrombosis. There was no significant difference between the groups regarding the parietal thickening (p = 0.81) and the degree of destruction of the elastic fibers (0,009). **CONCLUSION:** Papain creates saccular aneurysms with similar dimensions to elastase-induced aneurysms. The microscopic results indicated papain destroys more endothelial cells, produces more thrombosis and more inflammatory process than elastase. Keywords: 1.Elastase 2.Papain 3.Aneurysm 4.Animal models 5.Rabbit

1 – Introdução

Os aneurismas saculares experimentais são aneurismas induzidos que reproduzir características histológicas. tentam as geométricas. hemodinâmicas e fisiopatológicas dos aneurismas intracranianos humanos. Desde o experimento inicial em cães (1954) [1], vários modelos e espécies de animais foram usados [2-5], mas todos eles possuem limitações. Um dos modelos mais utilizados atualmente é o elastase-induzido, o qual tem sido muito usado no teste pré-clínico de novos materiais de embolização [6-9]. Ele se baseia na incubação endovascular de elastase pancreática porcina com destruição das fibras elásticas da artéria carótida comum direita (ACCD) de coelhos [10]. Este modelo tem, como vantagem, a criação de aneurismas semelhantes àqueles do segmento oftálmico da artéria carótida interna dos seres humanos e, como desvantagens, o tamanho pequeno (< 5mm) [11] e a histologia diferente daquela dos aneurismas dos humanos, ou seja; destruição de fibras elásticas com preservação da camada muscular, espessamento parietal, fibrose intimal e inflamação mural [12]. Na tentativa de produzir aneurismas maiores, fez-se o uso combinado de elastase e colagenase em uma bolsa arterial e sutura desta no arco aórtico de coelhos; porém este modelo não logrou êxito, apresentando tendência aumentada à ruptura espontânea dos aneurismas [13]. Apesar deste insucesso, o aprimoramento do modelo enzimático deveria continuar através do uso de outras enzimas capazes de destruir as fibras elásticas, como por exemplo, a papaína. A papaína, enzima extraída do látex do mamão (Carica papaya)

- 1

[14], possui grande capacidade elastolítica, sendo utilizada na indução de enfisema pulmonar experimental [14-18] e no preparo de enxertos venosos, tendo como efeitos indesejados o enfraquecimento das paredes das veias e a formação de aneurismas venosos [15]. Na revisão da literatura no MEDLINE, não encontramos estudos sobre o uso dessa enzima na produção de aneurismas saculares experimentais em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*).

2

2- Objetivos

 Determinar se a incubação intra-arterial de papaína é capaz de induzir a formação de aneurismas saculares.

 Determinar se os aneurismas papaína-induzidos são maiores do que os elastase-induzidos.

 Determinar se a papaína é capaz de provocar maior destruição das fibras elásticas do que a elastase.

 Determinar se a papaína é capaz de provocar maior espessamento da parede do aneurisma do que a elastase.

5) Determinar se a papaína é capaz de provocar maior lesão endotelial do que a elastase.

 Determinar se a papaína é capaz de provocar menor trombose do que a elastase.

 Determinar se a papaína é capaz de provocar maior inflamação parietal do que a elastase.

 B) Determinar se a papaína é capaz de provocar maior fibrose intimal do que a elastase.

3 – Revisão da literatura

3.1 Princípios gerais de construção de aneurismas experimentais

Com o surgimento do tratamento endovascular dos aneurismas intracranianos humanos, através da embolização destes com microespiras de platina [16], os modelos experimentais de aneurisma sacular foram obrigados a se adaptar à essa nova modalidade terapêutica, buscando alcançar as seguintes características: 1) demonstrar sua permeabilidade a longo prazo em espécime controle não tratado, 2) ser desenvolvido em espécies animais com sistema de coagulação similar ao dos humanos, 3) simular morfologias de bifurcação arterial, de artéria terminal ou outras morfologias aneurismáticas, que submetam o colo do aneurisma à alta tensão hemodinâmica, 4) ser desenvolvido em vasos com tamanho similar aos vasos intracranianos dos humanos, 5) ser desenvolvido sem cirurgia local de modo a minimizar a resposta de reparo/cicatrização, o que poderia confundir os resultados do experimento com o aumento natural da atividade biológica característica dos diversos materiais de embolização, tais como: molas, agentes líquidos, etc e 6) simular as limitações encontradas na embolização de aneurismas humanos com estes materiais [6].

3.2 A escolha do animal

A ocorrência espontânea de aneurismas intracranianos em animais é rara, de sorte que a maioria dos estudos utiliza o modelo induzido, o qual tem a grande vantagem de permitir a livre escolha das espécies [17].

Animais como o rato [2], o coelho [18], o cão [1], o porco [4] e o macaco [3] são utilizados para pesquisas de fisiopatologia, estudo hemodinâmico, treinamento cirúrgico e técnicas de embolização endovascular, além do teste de novos materiais de embolização. Nos experimentos de técnica operatória, o uso de mais de uma espécie é raro, de modo que algumas espécies tradicionais se consagraram como modelo para determinado tipo de cirurgia. Porém, experimentos cirúrgicos envolvendo aspectos fisiopatológicos da doença, devem abranger mais de uma espécie [19]. Apesar dessa recomendação, não encontramos, na revisão bibliográfica no MEDLINE, estudos sistemáticos e comparativos no sentido de definir qual é o animal ideal para produção experimental de aneurismas intracranianos. Contudo, o coelho (*Oryctolagus cuniculus*) tem se destacado por ter seu sistema de coagulação muito semelhante ao dos seres humanos, e por ser um animal de fácil manuseio e apresentar artérias carótidas com diâmetros próximos aos diâmetros das artérias intracranianas humanas [6].

3.3 Principais modelos de aneurisma sacular

German e Black (1954) foram os primeiros a produzir um aneurisma experimental através da construção cirúrgica de aneurismas saculares na artéria carótida comum de cães. Estes aneurismas simulavam os aneurismas de bifurcação e foram muito usados para estudos hemodinâmicos, mas tinham a desvantagem de produzir fibrose no local de sutura [1]. Desde então, os modelos cirúrgicos evoluíram até culminar com o modelo suíno (1994), o qual consiste na sutura de uma bolsa venosa na

artéria carótida comum (ACC) de porcos. Esse método produz aneurismas de parede lateral, com a desvantagem de possuir histologia venosa e intensa fibrose no local da sutura [4].

Além do método cirúrgico, existe o método de lesão química para construção de aneurismas saculares [2, 3, 20-26]. O principal realizador desta técnica foi Hashimoto (1978), o qual provocava o enfraquecimento da parede arterial de ratos mediante a ingestão de 3-beta-aminopropionitrilo, um agente tóxico extraído da semente da ervilha-de-cheiro (Latyrus odoratus) que provoca a destruição das fibras elásticas e colágeno das artérias de ratos. Além disso, Hashimoto ligava uma das artérias carótidas comuns e provocava hipertensão arterial nos ratos (através de nefrectomia, ingestão de solução salina e altas doses de corticoesteróides) com o intuito de gerar maior tensão hemodinâmica sobre a parede arterial enfraquecida. Esta técnica foi a primeira a ter sucesso na produção de aneurismas saculares intracranianos nas bifurcações do polígono arterial cerebral, porém aneurismas eram muito pequenos, não sendo úteis para o OS desenvolvimento de técnicas cirúrgicas nem para o estudo das alterações hemodinâmicas intra-aneurismáticas [2].

3.4 Aneurismas experimentais construídos cirurgicamente

O fundamento da técnica de construção cirúrgica de aneurismas experimentais é a sutura de uma bolsa venosa (geralmente retirada da veia jugular externa) na artéria carótida comum. A sua principal vantagem é que os aneurismas criados apresentam aspectos hemodinâmicos muito

semelhantes aos aneurismas humanos. Suas desvantagens são a histologia venosa e resistência à ruptura. Quanto ao local de construção, eles podem ser de parede lateral ou bifurcação.

Há cinco técnicas principais para construção de um aneurisma de parede lateral:

1. Bolsa venosa, não-ligada, com anastomose término-lateral à artéria.

 Bolsa venosa, não-ligada, com anastomose látero-lateral à artéria (variante da primeira).

3. Anastomose término-lateral da veia para a artéria, com bolsa venosa ligada.

4. Anastomose látero-lateral da veia para artéria com bolsa venosa ligada.

5. Anastomose término-lateral da bolsa venosa. A principal vantagem dessa última é o curto período de fechamento da artéria carótida comum, evitando lesão endotelial e vasoespasmo [27].

A construção dos aneurismas de bifurcação tem como principal modelo a técnica de Forrest e O'Rielley, na qual a artéria carótida comum esquerda do coelho é parcialmente anastomosada com a artéria carótida comum direita. Depois, uma bolsa venosa (retirada da veia jugular externa, veia facial anterior ou veia facial posterior) é suturada no nó formado pela união dessas anastomoses arteriais. Esta técnica tem a vantagem de não provocar trombose dos aneurismas, ao contrário dos aneurismas de parede lateral [28] (**figura 1**).



Figura 1 - Principais modelos cirúrgicos de aneurisma sacular experimental. (a) Parede lateral, (b) bifurcação (ACCD artéria carótida comum direita, VJE – veia jugular externa, ACCE – artéria carótida comum esquerda).

3.5 Outros modelos experimentais de aneurisma

Além dos modelos químico e cirúrgico, houve tentativas de construção de aneurismas saculares por outros métodos, tais como: o de hiperfluxo (através da criação de fístulas arterio-venosas); o modelo traumático (punção traumática da parede arterial ou através de laser de CO₂) e lesão química parietal (através da injeção de mostarda nitrogenada e outras substâncias diretamente no interior da parede arterial) [29]. Todas essas técnicas são menos eficientes que as técnicas de lesão química e construção cirúrgica.

Assim, apesar de todas as tentativas de construção de um modelo experimental de aneurisma sacular, até o momento, nenhum destes métodos foi capaz de reproduzir todos os aspectos histopatológicos e hemodinâmicos dos aneurismas saculares intracranianos que ocorrem nos seres humanos [20-21, 31].

3.6 Modelo elastase-induzido

3.6.1 Mecanismos de ação da elastase na formação de aneurismas

A formação de um aneurisma sacular depende de vários mecanismos, dentre eles: a reação inflamatória, o enfraquecimento da parede arterial e a tensão hemodinâmica. É possível que o deseguilíbrio enzimático e a atividade inflamatória sejam uma das causas para a formação de aneurismas em seres humanos. Anidjar (1992) incubou elatase pancreática porcina no interior da aorta abdominal de um grupo de ratos Wistar, e no outro grupo incubou tioglicolato mais plasmina (ativadores da resposta inflamatória). Nos dois grupos, houve reação inflamatória, fragmentação da lâmina elástica e formação de aneurisma fusiforme semelhante ao que ocorre no ser humano. Essa atividade inflamatória foi mais intensa no grupo da elastase (sendo máxima no sexto dia) e consistia em macrófagos, polimorfonucleares, linfócitos T auxiliares e linfócitos T supressores na parede arterial. À medida que progredia a atividade inflamatória, havia aumento no diâmetro da aorta abdominal [30]. Halpern (1994) determinou a seqüência e sincronia de ativação dessa resposta inflamatória. A elastase provoca uma lesão da parede arterial, que conduz a uma resposta inflamatória inicial. As células inflamatórias levam à ativação de proteinases endógenas (peso molecular entre 50 – 90kd), destruição da elastina e do colágeno, além de dilatação da aorta. Esse experimento indica que a quebra da elastina e seu contato com o macrófago representam o evento principal para ativação das proteinases endógenas com aumento da destruição tecidual e da resposta inflamatória [31].

O papel da resposta inflamatória no desenvolvimento do aneurisma não está totalmente definido. Alterações das propriedades mecânicas das artérias aliadas à tensão hemodinâmica sobre a parede do vaso podem, por si, produzir aneurismas. Miskolczi (1997) demonstrou isto num experimento "in vitro", através da retirada de um segmento da artéria carótida comum de porcos e de ovelhas e digestão das suas paredes com elastase pancreática porcina. Em seguida, interpôs os segmentos arteriais entre uma bomba artificial de fluxo pulsátil e uma série de tubos. Isso lhe permitiu controlar variáveis como fluxo, pulsação e pressão, sem a participação das respostas inflamatórias presentes nos estudos "in vivo". O resultado foi o surgimento de pequenos aneurismas saculares nos locais onde havia destruição da elastina e tensão hemodinâmica sobre a parede arterial enfraquecida [32].

3.6.2 Criação e aprimoramento do modelo elastase - induzido

Baseando-se nos trabalhos de criação de aneurisma experimental com elastase de Anidjar (1992) e Halpern (1994) [30, 31], Cawley et al. (1996) desenvolveram um novo modelo experimental de aneurisma de parede lateral em coelhos. Esse modelo consistia na dissecação do pescoço do coelho, ligadura do segmento proximal da artéria carótida externa e incubação intra-arterial de elastase pancreática porcina. Em 3 semanas, conseguiram produzir aneurismas saculares muito semelhantes aos dos humanos, quer angiograficamente quer histologicamente. Porém, somente 40% dos aneurismas permaneciam com sua luz aberta. Isso se deveu ao fato dos aneurismas de parede lateral não gerarem estresse hemodinâmico

e fluxo sangüíneo intra-aneurismático semelhantes aos que ocorrem nas bifurcações das artérias cerebrais intracranianas do homem [5].

Cloft et al. (1999) aperfeiçoaram o modelo anterior criando um estresse hemodinâmico maior sobre a artéria carótida comum esquerda (ACCE), a qual era atingida diretamente pelo fluxo sangüíneo da aorta ascendente em 2/3 dos coelhos. A técnica era totalmente endovascular e consistia na insuflação de um balão na origem da ACCE com isolamento de um pequeno segmento arterial para incubação endoluminal de elastase pancreática bovina durante 30 minutos. Os controles angiográficos foram realizados através da dissecação e punção retrógrada das artérias femorais. Através desse método, conseguiram produzir aneurismas com tamanho médio de 3,0 mm x 5,0 mm que permaneceram com a luz aneurismática aberta por até 3 meses após o procedimento. Microscopicamente, todos os aneurismas apresentavam endotélio intacto, ausência de reação inflamatória, lâmina elástica bastante destruída no interior do aneurisma (mas intacta no colo), além de trombo no ápice. Nenhum animal apresentou següela neurológica (devido à rede de vasos colaterais intracranianos) ou sinais sistêmicos de intoxicação pela elastase [33].

Kallmes et al. (1999) modificaram esse modelo criando tensão hemodinâmica extra sobre o segmento proximal da artéria carótida comum direita (ACCD). Essa artéria se localiza entre a artéria braquiocefálica e a aorta ascendente, mimetizando um "aneurisma de bifurcação". Além disso, a longa curvatura da artéria braquiocefálica fez com que a tensão hemodinâmica sobre a origem da ACCD fosse superior àquela exercida

sobre a ACCE. Outra modificação do modelo foi a redução do tempo de digestão enzimática para 20 minutos (**figura 2**).



Elastase pancreática porcina 20 min

Figura 2 - Representação gráfica da técnica endovascular de construção do aneurisma elastase-induzido. AAo- arco aórtico, ACCD – artéria carótida comum direita e ACCE – artéria carótida comum esquerda. Modificado de Hoh, 2004 [34].

Essas modificações técnicas produziram aneurismas experimentais semelhantes aos aneurismas humanos nos seguintes aspectos: origem arterial, forma, hemodinâmica e patência. A grande tensão hemodinâmica provocada pela longa curva da artéria braquiocefálica assemelha esses aneurismas experimentais aos aneurismas do segmento oftálmico da artéria carótida interna dos seres humanos [6]. Altes e al (2000) usaram a ACCD para a incubação endoluminal de elastase pancreática porcina em coelhos e obtiveram aneurismas em 89% dos animais. Após 2 semanas, houve ruptura

da lâmina elástica e formação de aneurismas (dimensões médias 4,5 mm x 7,5 mm) com trombo organizado no domo do aneurisma e lâmina elástica preservada nas paredes da artéria de onde se origina o aneurisma. As células presentes no trombo organizado possuíam características de células musculares lisas e fibroblastos. Após 10 semanas, não houve alterações significativas. A execução dessa técnica durava menos de 1 hora e, embora envolvesse aspectos cirúrgicos (como por exemplo: a secção da ACCD), apresentou menos morbidade e mortalidade que o uso da ACCE [10].

A concentração de elastase e o tempo de incubação não exerceram efeito no tamanho dos aneurismas. Testes que compararam animais sem elastase com animais submetidos a concentrações baixas, médias e altas dessa droga, revelaram que os coelhos sem elastase apresentaram trombose completa do coto arterial e não formaram aneurisma. Já aqueles que receberam a elastase em concentrações progressivas formaram aneurisma, sendo que o aumento da dose não teve efeito sobre o tamanho dos aneurismas. Em contra-partida, a alta concentração de elastase provocou a dilatação da artéria formadora do aneurisma, tornado a geometria do colo aneurismático mais complexa e próxima daquela dos aneurismas humanos. Já a baixa concentração (elastase a 25%) produziu aneurismas sem dilatação da artéria adjacente [35].

Hoh et al (2004) desenvolveram um modelo mais simples obtendo aneurismas semelhantes. A primeira simplificação consistiu no uso de um angiocateter 24 gauge (ao invés de um introdutor) com fechamento temporário da origem da ACCD por meio de um clipe neurocirúrgico (ao

13

invés de balão) [34]. A segunda simplificação foi a acurada avaliação neurológica do coelho através de uma escala graduada em 4 pontos . Essa escala neurológica se baseava na observação dos movimentos do coelho numa superfície plana, verificando-se a ocorrência de paresia nas pernas ou marcha anormal (movimentos em círculo ou dificuldade em caminhar). Assim: grau I – sem déficit neurológico; grau II – déficit neurológico mínimo ou suspeito; grau III – déficit neurológico leve sem movimento anormal; e grau IV – déficit neurológico acentuado com movimento anormal [36].

Embora os estudos até então não tenham relatado a perda de animais, Möller-Hartmann et al. (2003) detectaram uma mortalidade de 25%. Isto devido à entrada inadvertida de elastase na artéria tireóidea superior com origem aberrante ou num ramo traqueoesofágico oriundo da artéria carótida comum, levando à necrose hemorrágica da traquéia [37]. Outro vaso com origem anômala é a artéria traqueobrônquica, a qual pode ser identificada na angiografia como um pequeno ramo perpendicular à porção proximal da ACCC que se dirige medialmente para a traquéia [38]. Assim, a eliminação dessas vias vasculares anômalas (através de ligadura, coagulação ou posicionamento mais baixo do introdutor no interior da ACCD) é fundamental para o sucesso na criação dos aneurismas por meio da incubação endoluminal de elastase [37].

Além do problema dos vasos aberrantes, Krings et al. (2003) identificaram mais duas fontes potenciais de falha no modelo da elastase. A primeira seria o modo de injeção da elastase via introdutor. Isto por que, ao invés de empurrar elastase para o interior do lume arterial, empurra-se a

coluna de sangue do espaço morto do introdutor. O outro problema inclui a quantidade de elastase (100U) a qual, na experiência desse autor, foi geralmente fatal. Para corrigir esses problemas usou 20U de elastase, além de realizar o teste de injeção de contraste para detecção de artérias aberrantes. O teste consistiu no seguinte: após a oclusão com balão da região proximal da ACCD, procedeu-se à injeção de contraste não-iônico (através de um introdutor) no interior da ACCD e verificação da coluna de contraste durante 2 minutos. Se a coluna de contraste estivesse presente por 2 minutos sem lavagem ou diluição o teste seria negativo, isto é, não havia vasos anômalos. Em caso contrário, o teste era considerado positivo e o introdutor era avançado para uma posição mais proximal da ACCD em que não ocorresse lavagem ou diluição do contraste. Com estas providências, nenhum animal morreu e todos desenvolveram aneurismas, sendo 40 minutos o tempo de duração do procedimento. O problema da coluna de sangue e contraste dentro do introdutor foi solucionado através da aplicação de sucção contínua [39].

Os estudos prospectivos da morfologia e viabilidade dos aneurismas elastase-induzidos em coelhos exigem um controle angiográfico seriado e de boa qualidade; sendo que atualmente podem ser usadas três vias de acesso: artérias femorais, veia auricular externa esquerda e artéria central da orelha esquerda. Miskolczi et al (2005). defendem a punção retrógrada da artéria central da orelha esquerda como a melhor via de acesso. Isto porque a artéria femoral é estreita e frágil, apresentando alto risco de lesão e perda definitiva. Além disso, a cateterização femoral retrógrada requer dissecação

da virilha, arteriotomia e subsegüente ligadura com oclusão permanente do vaso, impedindo assim novas angiografias nesse local. A punção da veia auricular externa esquerda permite injeções repetidas de contraste, porém as imagens produzidas apresentam baixa resolução espacial e muitos artefatos de movimento. Já a artéria central da orelha esquerda permite injeções repetidas com imagens de boa qualidade e excelente demonstração dos vasos do tronco braquiocefálico. Isto se deve ao fato de que, habitualmente, os coelhos possuem uma origem bovina da ACCE. Assim, quando o contraste é injetado na artéria central da orelha esquerda, o tronco braquiocefálico e seus ramos são logo opacificados. Quando a ACCE se origina diretamente do arco aórtico ou de uma origem comum com o tronco braquiocefálico mas com angulação desfavorável, o contraste acaba opacificando somente o arco aórtico distal. Cerca de 70% - 80% dos coelhos Nova Zelândia brancos têm anatomia favorável para injeção retrógrada na artéria central da orelha esquerda; de sorte que uma pré-seleção seria importante para excluir do experimento os animais com anatomia desfavorável [40].

3.6.3 Aspectos morfológicos e geométricos

O modelo com elastase é eficaz em reproduzir aneurismas similares aos aneurismas humanos em largura, altura, tamanho do colo e diâmetro da artéria formadora do aneurisma, assemelhando-se aos aneurismas do segmento oftálmico da artéria carótida interna dos humanos. Short et al (2001) estudaram, prospectivamente, 40 coelhos e verificaram que o modelo

com elastase fornece cavidades aneurismáticas com tamanho apropriado para testes pré-clínicos de técnicas e dispositivos de oclusão endovascular. Eles mediram a largura (pontos da cavidade com largura máxima), a altura (medida do domo do aneurisma até a porção média de uma linha conectando as porções proximal e distal do colo do aneurisma), o colo (diâmetro máximo entre as porções proximal e distal do orifício aneurismático), o diâmetro da artéria nutridora (diâmetro da artéria imediatamente proximal ao colo do aneurisma) e a razão domo/colo (largura máxima do domo/largura do colo). Além disso, classificaram os aneurismas em pequenos (2,0 mm - 4,9 mm); médios (5,0 mm - 9,9 mm) e grandes (10,0 - 16,0 mm). O colo foi classificado em pequeno (< 4 mm) e grande (> 4 mm). Após 2 semanas, todos os animais sobreviveram, nenhum mostrou evidência clínica de déficit neurológico, com aneurismas formados no ápice da longa curva da artéria braquiocefálica, formato alongado e altura maior que a largura. Predominaram os aneurismas de tamanho médio (50%) e grande (42,5%) com colo pequeno (55%). A largura da cavidade variou entre 2,5 - 7,1 mm com média de $4,1 \pm 1,2$ mm. A altura variou entre 3,0 - 15,6mm com média de 8,8 ± 2,6 mm. A relação domo/colo > 1 ocorreu em 50% dos aneurismas, com média de $1,13 \pm 0,5$, e o diâmetro da artéria nutridora teve média de 4,3 ± 1,4 mm. Apesar desses valores serem similares aos dos aneurismas humanos, eles não reproduzem todas as características morfológicas, as quais, em muitos aspectos são difíceis de quantificar [11].

Os aneurismas produzidos pela incubação de elastase na ACCD aumentam suas dimensões progressivamente até o fim do primeiro mês

após sua criação, tornado-se estáveis em seguida. Já os aneurismas não incubados com elastase se retraem progressivamente e formam trombo no seu interior. Pesquisadores verificaram que as médias da largura e da altura do domo no 3° e 28° dia pós-indução foram, respectivamente: (3,2 ± 0,6 mm; 5,0 ± 0,9 mm) e (6,0 ± 1,3 mm; 10,0 ± 2,2 mm). Uma vez que a escala usada foi em milímetros e que as diferenças encontradas foram pequenas, os autores consideraram fontes potenciais dessas variações a baixa resolução da angiografia endovenosa, as projeções radiográficas usadas, as variações do ciclo cardíaco promovendo diferentes pressões intra-aneurismáticas e, como fator limitante do estudo, a falta de correlação histopatológica [41].

Ding et al. (2006) estudaram a permeabilidade a longo prazo dos aneurismas elastase-induzidos em coelhos e notaram que a cavidade aneurismática pode ficar aberta e sem trombo até dois anos da criação do aneurisma e que, após o 1º mês, suas dimensões (largura, altura e largura do colo) não mudam significativamente [42].

O tamanho do colo tem importância fundamental para o teste de dispositivos endovasculares e estudo da fisiopatologia dos aneurismas. Ding et al. (2005) descobriram que o tamanho do colo pode ser controlado pelo ajuste da posição do balão durante a incubação da elastase. Eles verificaram que o balão em posição alta, isto é, metade no interior da ACCD proximal e a outra metade no interior das artérias subclávia e braquiocefálica, produz aneurismas de colo estreito (< 4 mm). Já o balão em posição baixa, ou seja, exclusivamente no interior das artérias subclávia e braquiocefálica, produz aneurismas de colo largo (> 4 mm). Observaram

também que a posição do balão não influencia a largura do aneurisma e ressaltam que nem todos os casos feitos com o balão em posição baixa produziram colo largo [43].

Além do posicionamento do balão, a relação geométrica entre o maior eixo do aneurisma e o eixo da artéria nutridora desempenha um papel significativo na determinação da hemodinâmica local e na arquitetura final do aneurisma. Onizuka et al. (2006) compararam o ângulo entre o maior eixo do aneurisma e o eixo da artéria nutridora imediatamente e após 3 semanas de construção do aneurisma. Encontraram uma relação positiva entre o tamanho do colo e a altura do domo. Além disso, a altura do domo foi proporcional ao ângulo entre a artéria braquiocefálica e o colo do aneurisma. Assim, concluíram que quanto mais aberto esse ângulo, maior o estresse hemodinâmico do fluxo de entrada de sangue sobre o colo distal e o fundo do aneurisma [44].

O volume dos aneurismas elastase-induzidos pode ser ajustado de acordo com a posição da ligadura da ACCD. O uso de ligaduras altas pode criar aneurismas relativamente mais volumosos, comparados com uma ligadura mais baixa. Ding et al. (2007) estudaram prospectivamente a influência da altura da ligadura da ACCD no volume do aneurisma. A ligadura era considerada baixa quando a altura do nó estava a 10 mm da origem da ACCD, e alta quando feita a 15 mm da origem da ACCD. Considerando-se que o formato dos aneurismas criados era cilíndrico, aplicaram a fórmula do volume de um cilindro {} para o cálculo do volume do aneurisma. Os aneurismas com ligadura mais alta apresentaram volumes maiores (102,4 \pm 54,8 mm³) do que os aneurismas de ligadura mais baixa (36,6 \pm 26,8 mm³). Além disso, os aneurismas de ligadura alta apresentaram dimensões superiores, tais como: colo (3,3 \pm 0,8 mm); largura (3,7 \pm 0,7 mm) e altura (9,0 \pm 1,7 mm). Os autores atribuem esses resultados ao espaço cavitário maior nos aneurismas de ligadura mais alta, além de um provável maior estresse hemodinâmico sobre o aneurisma. Os autores não relataram morte dos animais devido à passagem de elastase, através de vasos aberrantes, nos aneurismas de nó mais alto [43].

3.6.4 Histologia dos aneurismas elastase-induzidos

Abruzzo et al (1998) compararam as características histológicas entre os aneurismas de parede lateral (produzidos através da incubação de elastase na artéria carótida externa de coelhos) e os aneurismas de parede lateral construídos com a sutura de uma bolsa venosa na artéria carótida comum de porcos. Estes aneurismas experimentais foram comparados com aneurismas humanos de 5mm – 10mm de diâmetro (rompidos recentemente e obtidos por meio de autópsia), cujas principais características foram: 1) ausência completa da lâmina elástica interna no aneurisma, com interrupção súbita da lâmina elástica interna da artéria nutridora nas margens do orifício sacular; 2) ausência completa da túnica média do aneurisma, com súbita interrupção da túnica média da artéria nutridora nas margens do orifício aneurismático; ausência de reação inflamatória nas paredes do aneurisma; 4) ausência de proliferação fibromuscular neointimal e 5) a espessura do saco foi de 51 µm e do colo, 52 µm . Em 3 dos 5 aneurismas estudados, um

20

terço da cavidade aneurismática estava preenchida por trombo em vários estágios de organização e firmemente aderido ao ponto de ruptura. Os aneurismas elastase - induzidos apresentaram súbita interrupção da lâmina elástica interna nas margens do orifício sacular, porém a túnica média permaneceu íntegra, continuando para o interior da parte sacular do aneurisma. As paredes do saco apresentaram reação inflamatória leve a moderadamente celular (monócitos e neutrófilos), com um grau leve de reação fibromuscular. A espessura do colo foi de 49µm e da parede do saco, 44µm. Houve a presença de trombo desorganizado que preencheu um terço da cavidade aneurismática em 2 dos 4 coelhos estudados. Já os aneurismas construídos com bolsa venosa apresentaram lâmina elástica bem desenvolvida e túnica média se estendendo pelas paredes do saco. As paredes da bolsa venosa continham grande infiltrado inflamatório (monócitos e neutrófilos) e graus extremos de proliferação fibromuscular por toda parede do aneurisma, de modo que produziu um acentuado espessamento neointimal com estreitamento do lume. A espessura da parede do domo foi de 228 µm e do colo, 350 µm. Assim, os autores concluíram que, histologicamente, os aneurismas elastase-induzidos foram os que mais se aproximaram dos aneurismas humanos, apresentando pouca reação fibromuscular espontânea quando comparados ao modelo cirúrgico com sutura de bolsa venosa. Isso faz com que, no momento, o modelo elastaseinduzido seja o mais adequado para o teste de dispositivos endovasculares [12].

3.7 Anatomia vascular cérvico-cerebral do coelho

A artéria inominada (3,5 mm) é o primeiro ramo do arco aórtico. Ela se divide, após 6 mm de extensão, nas artérias subclávia direita (2 mm) e carótida comum direita (2 mm). A artéria carótida comum esquerda (2 mm) se origina imediatamente adjacente ou junto com a artéria inominada. A artéria subclávia esquerda (2 mm) é o último ramo do arco aórtico e dá origem às artérias vertebral esquerda (1 mm) e cervical superficial (1 mm) [45]. O segundo tipo mais freqüente de distribuição é o arco aórtico fornecendo apenas 3 ramos: artéria inominada, artéria carótida comum esquerda e artéria subclávia esquerda. Variações menores podem ocorrer, como por exemplo, a artéria intercostal superior e artéria vertebral esquerda saindo diretamente do arco aórtico. A artéria tireóidea superior se origina, habitualmente, das artérias carótidas comuns, mas em alguns casos, ela pode estar presente em apenas uma artéria carótida comum [46]. Surge aproximadamente entre o 3º e o 6º anéis traqueais, e se dirige para a glândula tireóide. Quando chega no istmo, divide-se em 2 ramos: um ascendente (ramo crico-tiróideo) e um descendente (que se dirige inferiormente entre a traquéia e o esôfago). Os ramos brônguicos se originam da artéria intercostal suprema direita e da artéria carótida comum esquerda. Formam os ramos traqueo-esofágicos os quais continuam para cima, entre a traquéia e o esôfago, e se anastomosam com os ramos descendentes da artéria tireoidea superior (figura 3) [47]. As variações destes ramos são infreqüentes e, quando ocorrem, são mais comuns no lado esquerdo [48].
A artéria carótida comum do coelho emite um único ramo, a artéria tireóidea. Imediatamente acima desta, a ACC se divide nas artérias carótida interna e externa. A artéria carótida externa tem como principais ramos as artérias occipital, lingual, maxilar externa (facial) e auriculares anterior e posterior. As artérias auriculares e maxilar externa podem surgir de modo independente ou de um tronco comum. Na altura do arco zigomático, a ACE se divide nas artérias temporal superficial e facial transversa. Além disso, a ACE continua até o canal pterigóide, de onde envia pequenos ramos para a parte posterior da órbita, dando origem à artéria oftálmica externa que, por sua vez, formará os ramos lacrimal e frontal, anastomosando-se com a artéria oftálmica interna. A artéria maxilar interna tem como principal ramo a artéria meníngea média. A ACI intracraniana se divide nas artérias oftálmica, ramo cranial e ramo caudal. O ramo cranial corre para frente em direção ao uncus, onde se divide na artéria coroidea anterior e no tronco da artéria cerebral média. O ramo cranial continua seu trajeto até o quiasma onde se une com o ramo cranial oposto, formando um tronco arterial cerebral anterior comum, que torna a se separar no nível do corpo caloso. Esse tronco anterior comum emite a artéria lateral do bulbo olfatório que, por sua vez, gera os ramos etmoidais da placa cribiforme. A ACM percorre o sulco cerebral lateral e se divide nas artérias oftálmica posterior, grande ramo posterior, grandes ramos anterior e médio, além dos pequenos ramos do bulbo olfatório. O ramo caudal da ACI supre a maior parte do fluxo sangüíneo para a artéria basilar e emite os seguintes ramos: artéria comunicante posterior, pequenos ramos do corpo geniculado medial, grande

artéria do corpo quadrigeminal anterior, pequenos ramos da parte posterior do uncus e segmento posterior do corpo caloso. A artéria cerebelar pode surgir como terminação da ACI ou da AB, enviando vários ramos para o tronco cerebral. A AB é formada pela fusão das artérias do primeiro nervo espinhal, dividindo-se em dois vasos (na superfície ventral do corpo trapezóide) que se unem no bordo superior da ponte. Além disso, a AB emite pequenos ramos laterais, a artéria cerebelar e os ramos perfurantes. As artérias do primeiro nervo espinhal se juntam num nível mais inferior e formam a artéria espinal ventral [49].



Figura 3 - Vascularização visceral dos pescoço do coelho. 1- artéria laríngea superior, 2 – ramos superior, 3 – artéria tireóidea superior, 4 – ramo cricotireoideo, 5 – ramo bronquial e 6 – ramo tráqueo-esofágico. Modificado de Bugge,1967 [47].

No que diz respeito ao sistema de anastomoses intracranianas do coelho, sua circulação colateral é muito diferente das circulações do cão e gato. A artéria maxilar interna origina os ramos orbitários, os quais terminam no ramo oftálmico, constituindo-se numa via anastomótica insuficiente. Os ramos anastomóticos entre as artérias orbital e carótida interna são muito pequenos ou ausentes. Um pequeno ramo une a ACI e AB antes que se juntem ao polígono. Em última análise, na oclusão da artéria carótida comum, o fluxo principal vem por meio da ACI contra-lateral (**figura 4**) [50].



Figura 4 - Sistema de anastomoses intracranianas do coelho. 1 - Artéria carótida comum, 2 – artéria carótida interna, 3 – artéria carótida externa, 4 – artéria occipital, 5 – artéria orbitária, 6 – artéria oftálmica interna e 7 – artéria vertebral. Modificado de Chungcharoen, 1954 [50].

3.8 Papaína

A papaína é uma enzima endolítica do tipo cisteíno-proteinase, extraída do látex do mamão verde (*Carica papaya*). Pesa 23.000 Da e suas moléculas formam uma cadeia peptídica única com 211 resíduos de aminoácidos que se dobram em duas partes e criam uma fenda, a qual representa seu sítio catalítico [14].

Além da papaína, o látex possui mais 3 enzimas (quimopapaína, caricaína e glicil-endopeptidase) que juntas com a papaína, constituem 80% de toda fração enzimática, sendo a papaína a menor fração de todas as enzimas (5-8%). A purificação da papaína, habitualmente, é feita por meio de técnicas de precipitação. Entretanto, a enzima purificada ainda permanece contaminada por outras proteases [51].

Em relação à sua atividade enzimática, a papaína é ativada pela adição de substâncias tais como: cianida, glutatione reduzido e sulfato, sendo inativada por agentes oxidantes. Sua atividade enzimática máxima ocorre entre os pH 5 e 7,5.

Quanto à sua especificidade, além de hidrolisar diversas substâncias, a papaína possui forte atividade esterase, o que amplia mais ainda o seu espectro de ação, de modo que atua nos mesmos substratos das enzimas proteolíticas do pâncreas com atividade esterase [52].

Quanto à sua forma comercial de apresentação, pode ser encontrada sobre a forma de látex cru (~ 12 U/mg), pó liofilizado (10 U/mg) e suspensão aquosa (16-40 U/mg) [53].

Em relação aos efeitos biológicos da papaína, além da destruição de fibras elásticas a papaína destrói o colágeno. Junqueira (1980) estudou a capacidade de a papaína destruir fibras colágenas em diversos tecidos (cartilagem, osso, pele e vaso sangüíneo) de várias espécies animais, tais como: *Gallus gallus* (galinha), *Canis familiaris* (cão), *Oryctolagus cuniculus* (coelho) e *Sus scrofa* (porco), e observou que o grau de destruição do colágeno varia de acordo com o tipo de tecido [54]. Ionescu (1977), ao empregar a papaína para deantigenização de heteroenxerto venoso com sutura na artéria carótida comum de cães, percebeu que a papaína produzia enfraquecimento excessivo do enxerto com tendência à formação de aneurisma. Para vencer este problema, tratou os enxertos previamente com formol, de modo que mantiveram sua rigidez e flexibilidade sem formação de aneurisma [15].

4 – Material e métodos

4.1 Animais e comitê de ética

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade de São Paulo com o experimento realizado no Laboratório de Medicina Experimental, e a análise histológica realizada no Laboratório de Patologia, ambos da Universidade Federal de Sergipe, sendo o cuidado dos animais de acordo com o "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" [55]. Foram usados 18 coelhos brancos Nova Zelândia (1,9 – 3,2kg) divididos em 3 grupos. No grupo I (n=7), os animais foram submetidos à injeção intraarterial de elastase pancreática porcina, (Elastase pancreática porcina®, suspensão aquosa, 1mg / 6-8U, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). No grupo II (n= 8), os animais foram submetidos à injeção intra-arterial de papaína (Papaína®, suspensão aquosa, 1mg / 17-40U, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e no grupo III (n=3), os animais foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico dos grupos anteriores (cirurgia controle) e à injeção intra-arterial de solução salina a 0,9%.

4.2 Técnica cirúrgica

4.2.1 Anestesia e cuidados pré-operatórios

Os animais foram submetidos à anestesia geral intra-muscular (IM) com cloridrato de cetamina (Anesedan ®, Vetbrands, Brasil) 20mg/kg e cloridrato de xilazina (Dopalen ®, Vetbrands, Brasil) 2mg/kg, com respiração espontânea dos animais. Em seguida, fez-se analgesia IM com cetoprofeno

a 1% (Ketoprofeno ®, Vencofarma, Brasil) 0,3ml/kg e profilaxia antibiótica IM com enrofloxacino (Kinetomax ®, Bayer, Brasil) 0,3ml/kg.

4.2.2 Criação do aneurisma

Após a indução anestésica e mediante técnica cirúrgica estéril, fez-se uma incisão de 8-10cm na linha média do pescoço, da cartilagem tireóide até o esterno. Os músculos esternocleiodomastoideo e esternohióide foram dissecados e afastados lateralmente, revelando a traquéia e a ACCD. As aderências do músculo pectoralis tenuis no topo do esterno foram refletidas, revelando a origem da ACCD e da artéria subclávia direita (ASD) logo abaixo da primeira costela, sem a necessidade de removê-la. O nervo vago apareceu como uma delgada fita branca lateral à ACCD e foi afastado. Em seguida, dois fios de seda 4 - 0 foram usados para ocluir distalmente a ACCD e criar um coto. Um *clamp* vascular foi posicionado, temporariamente, na origem da ACCD. Um angiocateter (Gelco ® 24G) foi usado para canular retrogradamente a ACCD, no seu terço médio, no sentido pescoço-tórax. Um nó foi atado proximalmente para evitar o refluxo sangüíneo e um segundo nó foi atado logo abaixo do ponto de canulação para evitar o refluxo das substâncias teste durante a injeção. O sangue foi aspirado do interior do segmento isolado da ACCD. Em seguida, injetou-se solução salina a 0,9% para lavar as paredes arteriais e o conteúdo foi novamente aspirado. Depois, a elastase – 1mg (6-8U), a papaína - 1mg (17-40U) e a solução salina foram injetadas a 36°C no segmento arterial isolado, de acordo com seus respectivos grupos, tomando-se o cuidado de não ultrapassar o limite de

ruptura da artéria, permanecendo as substâncias no interior do lume vascular isolado durante 20 minutos. Depois, o conteúdo foi aspirado e o angiocateter retirado. Em seguida, deu-se o nó nos fios de seda, fez-se a retirada do *clamp*, a verificação da pulsação do coto arterial e a revisão da hemostasia. A pele foi reaproximada com fio mononylon 4-0 com pontos separados (**figura 5**). As artérias carótidas comuns direitas (ACCD) de cada grupo foram usadas como teste e as artérias carótidas comuns esquerdas (ACCE) como controle.





Figura 5 - Processo de criação do aneurisma. (a) Dissecação da ACCD e colocação dos fios de seda para controle do fluxo sangüíneo; (b) clampeamento, punção arterial e aspiração do seu conteúdo; (c) injeção da droga a ser testada (note o aspecto translúcido da artéria demonstrando elevada tensão em suas paredes); (d) ligadura da artéria e (e) aspecto final da artéria com a veia jugular interna (VJI) ao seu lado.

4.2.3 Cuidados pós-operatórios

Foram feitas observações diárias buscando sinais de dor, infecção, hemorragia ou estresse do animal. A analgesia e a profilaxia antibiótica foram feitas durante 3 dias com cetoprofemo a 1% e enrofloxacino, respectivamente, com as mesmas doses pré-operatórias.Os animais foram avaliados, diariamente, usando uma escala neurológica com a seguinte graduação: grau I – sem deficiência neurológica, grau II – deficiência neuológica mínima, grau III – deficiência neurológica leve sem movimentos anormais e grau IV – deficiência neurológica acentuada com movimentos anormais [36].

4.3 Macroscopia e histologia

No 21° dia pós-operatório, os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina e, depois, submetidos à eutanásia com uma injeção intra-cardíaca contendo 3ml de tiopental. A autópsia e a dissecação dos vasos foram realizadas no sentido do pescoço para o tórax. O arco aórtico e seus ramos foram removidos em bloco e lavados com solução salina. Em seguida, por meio de um paquímetro com escala de 0,5mm, foram tomados os diâmetros da ACCD e da ACCE, além do comprimento (distância do nó até o ponto de colocação do *clamp*) da ACCD. Considerou-se que houve formação de aneurisma quando a artéria teste dilatou em relação ao seu controle (**figura 6**).



Figura 6 - Autópsia do coelho. (a) Dissecação do pescoço e (b) retirada do arco aórtico e das artérias carótidas comuns em um animal do grupo cirúrgico controle.

Após a sua separação do arco aórtico, a ACCD e a ACCE foram fixadas em solução de formaldeído a 10% por 24horas. Depois da fixação, foram realizadas secções transversais a cada 0,5 cm ao longo do eixo longitudinal das artérias, que foram incluídas em parafina. Os preparados histológicos consistiram de cortes seriados de 5 µm de espessura, obtidos a cada intervalo de 200µm, corados pela coloração rotineira de hematoxilina - eosina (H&E), pela coloração de tricrômio de Masson e pela coloração de Verhoeff, esta última, para evidenciar as fibras elásticas. A análise microscópica foi feita de modo independente por um patologista experiente e pelo próprio pesquisador, através de um microscópio óptico binocular (Eclipse 200, Nikon, Japão).

4.3.1 Medida da espessura da parede arterial

A aferição da espessura parietal foi realizada por meio de uma régua microscópica com escala em décimo de milímetro (0,1mm), sendo que os limites para a aferição estavam compreendidos entre o limite externo da camada muscular e o endotélio ou o limite interno da camada intimal (quando o endotélio estava desnudo). A área selecionada para a medida foi a região com maior espessura, considerando-se, dessa forma, a espessura máxima da parede (**figura 7**).





Figura 7 - Mensuração da espessura parietal. (a) Limites para medida da espessura parietal e (b) medida da espessura parietal de uma artéria controle, usando-se a régua microscópica com escala em décimo de milímetro (0,1mm). (tricrômio de Masson, x 40 mais zoom digital)

4.3.2 Quantificação da trombose

A trombose foi considerada presente ou ausente. Se presente, o grau de trombose foi calculado dividindo-se o número de cortes contínuos em que o trombo apareceu pelo número total de cortes feitos em toda a artéria, sendo o resultado dessa fração multiplicado por 100 e correspondendo à porcentagem de luz vascular obstruída pelo trombo.

4.3.3 Quantificação das fibras elásticas

O material corado com a técnica Verhoeff foi submetido a fotomicrografias digitais coloridas através de um microscópio óptico trinocular (CX31, Olympus, Japão) com uma câmera digital (Camedia, Olympus, Japão, com 7.1 megapixels e sistema RGB -*Red, Green* e *Blue*-para captura de imagens coloridas) acoplada ao microscópio, sendo as imagens analisadas através do programa ImageJ (versão 1.42q, NIH, EUA) com recursos específicos para análise microscópica.

Cada imagem colorida foi recortada de modo a restar apenas a parede arterial. Em seguida, essa imagem foi decomposta nas suas cores primárias: vermelho, verde e azul; escolhendo-se a imagem de maior contraste. Depois, fez-se o ajuste da faixa de *pixels* de interesse (*treshold*) para marcar as fibras elásticas. A imagem foi transformada, binariamente, de modo a assumir apenas as cores preta e branca, com a imagem final demonstrando as fibras elásticas em cor negra sobre um fundo branco. Finalmente, o programa calculou, automaticamente, a área total dos *pixels* negros correspondentes às fibras elásticas marcadas. Esse procedimento foi realizado nas artérias testes e seus respectivos controles (**figura 8**).



Figura 8 - Método de quantificação das fibras elásticas. (a) Artéria controle com coloração Verhoeff demonstrando as fibras elásticas, (b) recorte da imagem, (c) imagem decomposta em uma de suas cores primárias e (d) marcação das fibras elásticas em preto com a escala de pixels ao lado.

4.3.4 Infiltrado inflamatório parietal

O infiltrado inflamatório foi avaliado de forma subjetiva, considerando-se a quantidade de células inflamatórias por campo de aumento de 400x. Assim, a inflamação foi classificada em ausente (1). Se presente, a sua intensidade foi considerada: (2) leve (células inflamatórias restritas a uma área focal da parede arterial), (3) moderada (mais de um foco de células inflamatórias na parede arterial) e (4) acentuada (quando a parede arterial estava comprometida em toda a sua circunferência).

4.3.5 Endotélio

O endotélio foi analisado e classificado em: (1) ausente, (2) presente e descontínuo (se houvesse uma ou mais áreas de perda endotelial) e (3) íntegro (isto é, quando o endotélio estava presente em toda a circunferência arterial em todos os cortes).

4.3.6 Fibrose intimal

A fibrose intimal foi analisada e considerada: (1) ausente, (2) presente e descontínua (quando houvesse mais de uma área focal sem fibrose), (3) difusa (quando atingisse toda a circunferência arterial) e (4) análise prejudicada (quando não fosse possível distinguir a fibrose intimal da fibrose decorrente da organização dos trombos luminais).

4.7 Análise estatística

Os dados quantitativos foram descritos como médias e erros padrões, com seus respectivos intervalos de confiança. Os dados categóricos foram descritos como freqüências simples e porcentagens.

O teste t-student foi utilizado para a comparação entre os grupos independentes. Na estimativa das médias e seus intervalos de confiança, utilizou-se a técnica estatística de Bootstrap, baseada num número de reamonstragens igual a 5.000. Esse procedimento também foi utilizado ao aplicar-se o teste t-student. Admitiram-se os testes como bicaudais e os níveis de significância adotados foram os seguintes: $\alpha = 0,005$ e $\beta = 0,20$.

Os programas estatísticos usados foram o PASW Statistics 18, versão

demo, Winwrap Basic Copyright, EUA, 2009 e Excel, Microsoft, EUA, 2003.

4.7.1 Hipóteses nulas e alternativas

As hipóteses nulas e alternativas foram as seguintes:

 H0 - Não houve diferença significativa entre os grupos papaína e elastase quanto ao diâmetro dos controles,

H1 - Houve diferença significativa entre os grupos papaína e elastase quanto ao diâmetro dos controles;

 H0 - Não houve diferença significativa entre os grupos papaína e elastase quanto ao diâmetro dos testes,

H1 - Houve diferença significativa entre os grupos papaína e elastase quanto ao diâmetro dos testes;

 H0 - Não houve diferença significativa entre os grupos papaína e elastase quanto à dilatação das artérias testes em relação aos seus respectivos controles,

H1 - Houve diferença significativa entre os grupos papaína e elastase quanto à capacidade das artérias testes dilatarem em relação aos seus respectivos controles;

 H0 - Não houve diferença significativa entre os grupos papaína e elastase quanto ao comprimento das artérias testes,

H1 - Houve diferença significativa entre os grupos papaína e elastase quanto ao comprimento das artérias testes;

 H0 - Não houve diferença significativa entre os grupos papaína e elastase em relação à quantidade de fibras elásticas dos controles,

H1 - Houve diferença significativa entre os grupos papaína e elastase em relação à quantidade de fibras elásticas dos controles;

- 6) H0 Não houve diferença significativa entre os grupos papaína e elastase em relação à quantidade de fibras elásticas dos testes,
 H1 Houve diferença significativa entre os grupos papaína e elastase em relação à quantidade de fibras elásticas dos testes;
- H0 Não houve diferença significativa entre os grupos papaína e elastase quanto à capacidade de destruir fibras elásticas, quando comparadas as artérias testes aos seus respectivos controles;

H1 - Houve diferença significativa entre os grupos papaína e elastase quanto à capacidade de destruir fibras elásticas, quando comparadas as artérias teste aos seus respectivos controles;

 H0 - Não houve diferença significativa entre os grupos papaína e elastase quanto à espessura parietal dos controles,

H1 - Houve diferença significativa entre os grupos papaína e elastase quanto à espessura parietal dos controles;

9) H0 - Não houve diferença significativa entre os grupos papaína e elastase quanto à espessura parietal dos testes,
 H1 - Houve diferença significativa entre os grupos papaína e elastase

quanto à espessura parietal dos teste

 H0 - Não houve diferença significativa entre os grupos papaína e elastase quanto ao espessamento parietal, quando comparadas as artérias testes aos seus respectivos controles,

H1 - Houve diferença significativa entre os grupos papaína e elastase

quanto ao espessamento parietal, quando comparadas as artérias testes e seus respectivos controles;

 H0 – Não houve diferença significativa entre os grupos papaína e elastase quanto ao grau de trombose,

H1 - Houve diferença significativa entre os grupos papaína e elastase quanto ao grau de trombose;

 H0 - Não houve diferença significativa entre os grupos papaína e elastase quanto ao grau de lesão endotelial,

H1 - Houve diferença significativa entre os grupos papaína e elastase quanto ao grau de lesão endotelial

 H0 - Não houve diferença significativa entre os grupos papaína e elastase quanto ao grau de fibrose intimal,

H1 - Houve diferença significativa entre os grupos papaína e elastase quanto ao grau de fibrose intimal

 H0 - Não houve diferença significativa entre os grupos papaína e elastase quanto ao grau de inflamação,

H1 - Houve diferença significativa entre os grupos papaína e elastase quanto ao grau de inflamação.

5 - Resultados

Nenhum animal morreu, apresentou deficiência neurológica pósoperatória ou teve hemorragia traqueal.

Não houve formação de aneurisma em qualquer caso do grupo cirúrgico controle.

Os valores dos diâmetros arteriais dos grupos elastase e papaína são apresentados na tabela 1.

Tabela	1 –	Diâmetro	(mm)	dos	testes	е	dos	seus	controles	com	suas
		respectiv	/as dif	ieren	ças						

CASO	DIÂMETRO TESTE	DIÂMETRO CONTROLE	DIFERENÇA TESTE- CONTROLE	ANEURISMA SIM/NÃO
F1	3.0	1.0	2.0	S
E2	2.0	2.0	0.0	N
E3	2.0	2.0	0.0	N
E4	3,0	2,0	1,0	S
E5	4,0	1,0	3,0	S
E6	4,0	2,5	1,5	S
E7	3,0	2,0	1,0	S
P1	7,0	2,0	5,0	S
P2	3,0	1,0	2,0	S
P3	4,0	2,0	2,0	S
P4	4,0	2,0	2,0	S
P5	2,5	1,0	1,5	S
P6	4,0	2,0	2,0	S
P7	3,0	1,5	1,5	S
P8	3,0	2,0	1,0	S

E - elastase, P - papaína

Verifica-se que os testes dos casos E2 e E3 do grupo elastase não dilataram, de sorte que houve formação de 5 aneurismas em 7 casos deste grupo (eficiência de 71,4%). Já no grupo papaína, todos os casos formaram aneurisma (eficiência de 100%). O diâmetro mínimo e o diâmetro máximo dos controles foram respectivamente: 1,0 e 2,5mm no grupo elastase e 1,0 e

2,0mm no grupo papaína. O diâmetro mínimo e o diâmetro máximo dos testes foram respectivamente: 2,0 e 4,0mm no grupo elastase e 2,5 e 7,0mm no grupo papaína. Em relação à diferença teste – controle, isto é, o grau de dilatação da artéria teste quando comparada com seu controle, a diferença mínima e a diferença máxima foram respectivamente: 0,0 e 3,0mm no grupo elastase e 1,0 e 5,0mm no grupo papaína.

Quando comparados os diâmetros das artérias controles, a análise estatística não demonstrou diferença significativa (p= 0,72) entre os grupos elastase (média= 1,8 \pm 0,2mm, IC 95%= 1,3 - 2,2mm) e papaína (média = 1,7 \pm 0,2mm, IC 95%= 1,4 -2,0mm) (**gráfico 1**).





Quando comparados os diâmetros das artérias testes, a análise estatística não demonstrou diferença significativa (p = 0,38) entre os grupos elastase (média = $3,0 \pm 0,3$ mm, IC 95%= 2,4 - 3,6mm) e papaína (média = $3,4 \pm 0,2$ mm, IC95%= 2,9 - 3,8mm). Contudo, houve uma tendência à maior dilatação no grupo papaína (**gráfico 2**).

Gráfico 2 - Diâmetro das artérias testes



Quando comparada a diferença do diâmetro das artérias testes e seus respectivos controles, o teste estatístico não demonstrou diferença significativa (p= 0,15) entre os grupos elastase (média= 1,2 \pm 0,4mm, IC95%= 0,4 - 2,0mm) e papaína (média= 2,1 \pm 0,4mm, IC95%= 1,5 -3,1mm). Apesar disso, o grupo papaína apresentou tendência a produzir maior dilatação (**gráfico 3**) (**figura 9**).



Gráfico 3 - Diferença do diâmetro entre os testes e os controles.



Figura 9 - Exemplo de diâmetro dos aneurismas. (a) Aneurisma papaína – induzido com 7,0 mm; (b) aneurisma elastase-induzido com 4,0 mm de diâmetro.

Os valores dos comprimentos dos aneurismas são apresentados na tabela 2, sendo que o comprimento mínimo e o comprimento máximo foram respectivamente: 11,0 e 22,0 mm no grupo elastase e 8,0 e 25,0 mm no grupo papaína.

Caso	Comprimento		
	(mm)		
E1	11		
E2	16		
E3	16		
E4	21		
E5	16		
E6	22		
E7	20		
P1	12		
P2	8		
P3	13		
P4	24		
P5	21		
P6	25		
P7	16		
P8	15		
E - electore D - nonoína			

Tabela 2 - Comprimento (mm) dos aneurismas

E - elastase, P - papaína

Quando comparados os comprimentos das artérias testes, não se observou diferença estatística significativa (p= 0,83) entre os grupos elastase (média= 17,4 ± 1,4mm, IC95%= 14,6 - 20,2mm) (diâmetro min.= 11,0mm e max.= 22,0mm) e papaína (média= 16,8 ± 2,1mm, IC95%= 12,7 -20,9mm) (gráfico 4). Além disso, verificou-se que o comprimento dos aneurismas variou em função da altura do nó cirúrgico (figura 10).

Gráfico 4 - Comprimento dos aneurismas





Figura10 - Exemplo de comprimento dos aneurismas. Demonstração de dois aneurismas papaína – induzidos nos quais a altura do nó determinou o comprimento do coto arterial: (a) 16 mm e (b) 8 mm.

Em relação à quantidade de fibras elásticas (representada em número

de *pixels*), seus valores são apresentados na tabela 3.

7
-

CASO	PIXELS X10** ⁸	PIXELS	DIFERENÇA PIXELS X10** ⁸
	CONTROLE	X10** ⁸ TESTE	CONTROLE – TESTE
E1	6,97	3,03	3,93
E2	9,86	5,18	4,67
E3	6,44	6,86	- 0,41
E4	8,92	6,66	2,26
E5	6,22	8,66	- 2,44
E6	7,33	5,55	1,77
E7	6,49	0,18	6,30
P1	8,45	1,33	7,12
P2	11,13	1,21	9,92
P3	8,25	8,62	- 0,37
P4	6,92	1,35	5,57
P5	7,17	0,49	6,67
P6	9,65	2,38	7,26
P7	8,47	4,21	4,26
P8	8,69	0,76	7,92

Tabela 3 – Quantidade de fibras elásticas, representada pelo número de *pixels* (x10**⁸), dos testes e dos controles com suas respectivas diferenças

E - elastase, P - papaína

O valor mínimo e o valor máximo dos controles foram respectivamente: $6,2 e 9,8 \times 10^8 pixels$ no grupo elastase e 7,1 e 11,1 $\times 10^8 pixels$ no grupo papaína. Já o valor mínimo e o valor máximo dos testes foram respectivamente: 0,1 e 3,0 $\times 10^8 pixels$ no grupo elastase e 0,4 e 8,6 $\times 10^8 pixels$ no grupo papaína. Não houve redução do número de *pixels* das artérias testes em 2 casos, num total de 7 casos, no grupo elastase (28,5%) e em 1 caso, num total de 8 casos, do grupo papaína (12,5%). De fato, nos casos E3, E5 e P3 o número de *pixels* do teste foi maior que o número de *pixels* do controle, de modo que a diferença controle - teste foi negativa, indicando portanto que não houve destruição de fibras elásticas.

No que se refere à quantidade de fibras elásticas dos controles, não houve diferença estatística significativa (p= 0,13) entre os grupos elastase

(média= 7,5 ± 0,5 x10⁸ *pixels*, IC95%= 6,6 - 8,5 x10⁸ *pixels*) e papaína (média= 8,6 ± 0,5 x10⁸ *pixels*, IC95%= 7,7 - 9,6 x10⁸ *pixels*) (**gráfico 5**).



Gráfico 5 - Quantidade de fibras elásticas dos controles representada em número de pixels.

Em relação à quantidade de fibras elásticas dos testes, não houve diferença estatística significativa (p= 0,009) entre os grupos elastase (média= $5.2 \pm 1.1 \times 10^8$ *pixels*, IC95% = $3.1 - 6.9 \times 10^8$ *pixels*) e papaína (média= $2.6 \pm 0.9 \times 10^8$ *pixels*, IC95% = $1.1 - 4.7 \times 10^8$ *pixels*). Mesmo assim, houve uma maior tendência da papaína em destruir fibras elásticas (**gráfico** 6).





Ao avaliar qual grupo destruiu mais fibras elásticas quando comparados os testes com seus respectivos controles, verificou-se que não houve diferença estatística significativa (p= 0,03) entre os grupos elastase (média= $2,3 \pm 1,1 \times 10^8$ *pixels*, IC95%= 0,09 - 4,4 x10⁸ *pixels*) e papaína (média= 6,0 ± 1,1 x10⁸ *pixels*, IC95%= 3,8 - 7,9 x10⁸ pixels). Mesmo assim, a papaína apresentou maior tendência à destruição de fibras elásticas (**gráfico 7**) (**figura 11**).







Figura 11 - Destruição das fibras elásticas. (a) Artéria controle com fibras elásticas (coradas em preto) preservadas e dispostas concentricamente. Observe a lâmina elástica interna íntegra com seu pregueado característico (seta), (b) destruição das fibras elásticas em uma artéria do grupo papaína e (c) destruição das fibras elásticas em uma artéria do grupo elastase. (coloração Verhoeff, x40 mais zoom digital)

Em relação ao espessamento parietal, seus dados são apresentados

na tabela 4.

E	\mathbf{a}
5	/
-	_

suas respectivas diferenças.						
CASO	ESPESSURA	ESPESSURA	DIFERENÇA TESTE-			
	TESTE	CONTROLE	CONTROLE			
1	0,20	0,10	0,10			
1	0,30	0,20	0,10			
1	0,50	0,10	0,40			
1	0,30	0,20	0,10			
1	0,40	0,10	0,30			
1	0,20	0,10	0,10			
1	0,20	0,10	0,10			
2	0,40	0,20	0,20			
2	0,30	0,20	0,10			
2	0,40	0,20	0,20			
2	0,20	0,10	0,10			
2	0,20	0,10	0,10			
2	0,30	0,20	0,10			
2	0,30	0,10	0,20			
2	0,40	0,10	0,30			

Tabela 4 - Espessura parietal (mm) dos testes e dos controles com suas respectivas diferenças.

Elastase - casos com número 1, papaína - casos com o número 2

A espessura mínima e a espessura máxima dos controles foram respectivamente: 0,10 e 0,20mm no grupo elastase e 0,10 e 0,20mm no grupo papaína. Nos testes, a espessura mínima e a espessura máxima foram respectivamente: 0,20 e 0,50mm no grupo elastase e 0,20 e 0,40mm no grupo papaína. Em relação à diferença de espessura entre os testes e os controles, o seu valor mínimo e valor máximo foram respectivamente: 0,10 e 0,30mm no grupo elastase e 0,10 e 0,30mm no grupo elastase e 0,10 e 0,30mm no grupo papaína.

A espessura da parede arterial dos controles não apresentou diferença estatística significativa (p=0,43) entre os grupos elastase (média= 0,13 \pm 0,02mm, IC 95%= 0,10 - 0,16mm) e papaína (média= 0,31 \pm 0,03mm, IC 95%= 0,25 - 0,36mm) (gráfico 8).



Gráfico 8 - Espessura dos controles.

A espessura da parede arterial dos testes não apresentou diferença estatística significativa (p=0,81) entre os grupos elastase (média= 0,30 \pm 0,04mm, IC 95%= 0,22 - 0,39mm) e papaína (média= 0,31 \pm 0,03mm, IC 95%= 0,26 - 0,37mm). (**gráfico 9**)



Gráfico 9 - Espessura dos testes

Quando avaliado o grau de espessamento parietal das artérias testes comparadas com seus respectivos controles, a análise estatística não demonstrou diferença estatística significativa (p= 0,87) entre os grupos elastase (média= 0,17 ± 0,05mm, IC 95%= 0,10 - 0,26mm) e papaína (média= 0,16 ± 0,07mm, IC 95%= 0,11 - 0,21mm) (gráfico 10).



Gráfico 10 – Diferença de espessura parietal entre os testes e os controles.

Os dados do grau de trombose são apresentados na tabela 5.

CASO	TESTE	CONTROLE
E1	0,40	0,00
E2	0,50	0,00
E3	0,00	0,00
E4	0,76	0,00
E5	0,50	0,00
E6	0,50	0,00
E7	0,50	0,00
P1	0,90	0,00
P2	0,95	0,00
P3	0,80	0,00
P4	0,95	0,00
P5	0,76	0,00
P6	1,00	0,00
P7	0,99	0,00
P8	0,65	0,00

E - elastase, P - papaína

Todos os controles, de ambos os grupos elastase e papaína, não desenvolveram trombose (0%). Ao contrário, todos os testes, com exceção do caso E3, apresentaram trombose em graus variados. Sendo que o valor mínimo e o valor máximo dos graus de trombose foram respectivamente: 0,0 e 0,76 no grupo elastase e 0,76 e 1,0 no grupo papaína.

Quando comparados os testes quanto ao grau de trombose, a análise estatística revelou diferença significativa (p = 0,01) entre os grupos elastase (média= $0,45 \pm 0,08$, IC 95%= 0,28 - 0,60) e papaína (média= $0,88 \pm 0,04$, IC 95%= 0,79 - 0,95), com maior grau de trombose no grupo papaína (gráfico 11).





Os dados do grau de lesão endotelial são apresentados na **tabela 6** e na **tabela 7**.

5	7
J	'

CASO	AUSENTE	PRESENTE E DESCONTÍNUO	ÍNTEGRO	TOTAL
	(1)	(2)	(3)	
E1	Х			
E2		Х		
E3		Х		
E4		Х		
E5		Х		
E6		Х		
E7		Х		
Total	1	6	0	7
%	14,2%	85,7%	0%	100,0%

Tabela 6 - Grau de lesão endotelial no grupo elastase

E – elastase

Tabela 7 - Grau de lesão endotelial no grupo papaína

CASO	AUSENTE	PRESENTE E DESCONTÍNUO	ÍNTEGRO	TOTAL
	(1)	(2)	(3)	
P1	Х			
P2	Х			
P3		Х		
P4		Х		
P5		Х		
P6	Х			
P7		Х		
P8		Х		
Total	3	5	0	8
%	37,5%	62,5%	0%	100,0%

P - papaína

Quanto ao grau de lesão endotelial, a papaína causou maior destruição, de modo que o endotélio estava completamente ausente em 37,5% dos casos do grupo papaína contra apenas 14,2% dos casos do grupo elastase, ou seja, uma diferença de 23,3% a favor do grupo papaína. Porém a maioria dos casos de ambos os grupos apresentou lesão parcial do endotélio: elastase (85,7%) e papaína (62,5%) (**gráfico 12**) (**figura 12**).



Gráfico 12 – Comparação do grau de lesão endotelial entre os grupos elastase e papaína



Figura 12 – Endotélio. (a) Endotélio presente e descontínuo em um caso do grupo elastase (H&E, x 40 mais zoom digital); (b) endotélio completamente ausente (seta negra) com trombo (estrela) em um caso do grupo papaína. (H&E, x 400 mais zoom digital)

Os dados do grau de fibrose intimal são apresentados na tabela 8 e na

tabela 9.
CASO	AUSENTE	PRESENTE E DESCONTÍNUO	DIFUSA	PREJUDICADA	TOTAL
	(1)	(2)	(3)	(4)	
E1	Х				
E2			Х		
E3		Х			
E4		Х			
E5		Х			
E6		Х			
E7		Х			
Total	1	5	1	0	7
%	14,2%	71,4%	14,2%	0%	100,0%

Tabela 8 - Grau de fibrose intimal no grupo elastase

E- elastase

No grupo elastase, a fibrose intimal foi descontínua em 71,4% dos

casos. Já a sua ausência ocorreu em apenas 14,2% dos casos

CASO	AUSENTE	PRESENTE E DESCONTÍNUA	DIFUSA	TOTAL	
	(1)	(2)	(3)	(4)	
P1		Х			
P2		Х			
P3		Х			
P4				Х	
P5				Х	
P6				Х	
P7				Х	
P8		Х			
Total	0	4	0	4	8
%	0%	50,0%	0%	50,0%	100,0%

Tabela 9 - Grau de fibrose intimal no grupo papaína

P - papaína

No grupo papaína, a avaliação da fibrose intimal foi prejudicada em 50% dos casos devido à acentuada trombose nesse grupo, o que tornou muito difícil a distinção entre o trombo e a fibrose intimal (**gráfico 13**) (**figura 13**).







Figura 13 - Fibrose intimal. (a)Trombose acentuada prejudicando a avaliação da fibrose intimal num caso do grupo papaína (tricrômio de Masson, x 400 mais zoom digital); (b) ausência de trombose e identificação de fibrose intimal em um caso do grupo elastase. (tricrômio de Masson, x 40 mais zoom digital)

Os dados do grau de inflamação mural são apresentados na tabela 10

e na tabela 11.

CASO	AUSENTE(1)	LEVE	MODERADA	DIFUSA	TOTAL
		(2)	(3)	(4)	
E1	Х				
E2	Х				
E3	Х				
E4		Х			
E5		Х			
E6		Х			
E7		Х			
Total	3	4	0	0	7
%	42,8%	57,1%	0,0%	0,0%	100,0%

Tabela 10 - Grau de inflamação mural no grupo elastase

E - elastase

Tabela 11 - Grau de inflamação mural no grupo papaína

CASO	AUSENTE	LEVE	MODERADA	DIFUSA	TOTAL	
	(1)	(2)	(3)	(4)		
P1			Х			
P2		Х				
P3		Х				
P4	Х					
P5	Х					
P6		Х				
P7		Х				
P8		Х				
Total	2	5	1	0	8	
%	25,0%	62,5%	12,5%	0,0%	100,0%	

P- papaína

A inflamação mural consistiu em um infiltrado de linfócitos e de plasmócitos. Ela foi ausente em 42,80% dos casos do grupo elastase contra 25% dos casos do grupo papaína (diferença de 17, 8% a favor do grupo elastase), indicando uma menor tendência à inflamação no grupo elastase. Porém, em ambos os grupos, predominaram os casos com inflamação leve - elastase (57,1%) e papaína (62,5%) - com diferença de 5,4% a favor desse último grupo (**gráfico 14**) (**figura 14**).







Figura 14 - Inflamação parietal. Infiltrado inflamatório leve em um caso do grupo papaína. Plasmócito (seta). (H&E, x 400 mais zoom digital)

6 Discussão

A técnica operatória utilizada neste estudo foi baseada no trabalho de Hoh et al. [34]. Ela se mostrou simples e segura, sendo que o fechamento temporário da ACCD não provocou deficiência neurológica devido ao eficiente polígono arterial cerebral do coelho [50]. Com relação à hemorragia traqueal, os nossos dados contrastaram com os de Möller-Hartman et al., cuja mortalidade por essa complicação foi de 25%, por causa da entrada acidental de elastase na artéria traqueo-esofágica com origem aberrante na ACCD [52]. Acreditamos que o motivo dos coelhos não terem apresentado essa complicação, em nosso estudo, foi que a canulação da ACCD ocorreu aproximadamente no terço médio da artéria, de sorte que, mesmo que tenha havido um vaso aberrante, a injeção da papaína ficou abaixo da sua origem, tornado o procedimento isento de complicações e dispensando a angiografia para identificação de vasos anômalos. Acreditamos também que a aspiração do sangue e a lavagem do segmento arterial isolado com solução salina sejam outro aspecto técnico relevante. Isto porque o soro do coelho possui inibidores enzimáticos que bloqueiam a ação da papaína [56]. Assim, se a aspiração e a lavagem forem insuficientes, deixando resíduo sangüíneo no interior do coto arterial, poderá haver redução da capacidade elastolítica da papaína e variações no tamanho dos aneurismas.

Com relação à dilatação arterial, o nosso estudo demonstrou que a papaína é capaz de enfraquecer as paredes vasulares e formar aneurismas. Esse fenômeno já havia sido relatado por lonescu et al., os quais, ao

tentarem deantigenizar heteroenxertos venosos com papaína, observaram acentuado enfraquecimento das paredes do enxerto com dilatação progressiva e formação indesejada de aneurisma venoso [15]. Os resultados da tabla 1 demonstram que esta propriedade da papaína em enfraquecer as paredes dos vasos foi confirmada em nosso trabalho, de modo que todos os casos do grupo papaína formaram aneurisma (eficiência de 100%). A elastase também formou aneurismas, porém 2 casos (E2 e E3) não apresentaram dilatação, demonstrando assim uma menor eficiência da elastase (71,4%) em provocar aneurismas.

Com relação aos diâmetros arteriais, a análise dos controles demonstrou que a distribuição dos valores dos diâmetros em ambos os grupos foi homogênea, de sorte que não houve diferença estatística significativa (p= 0,72) entre os grupos elastase (média = 1,8 \pm 0,2mm) e papaína (média = 1,7 \pm 0,2mm) (gráfico 1). Quando avaliados os diâmetros dos testes, a análise estatística não revelou diferença significativa (p= 0,38) entre os grupos elastase (média= 3,0 \pm 0,3mm) e papaína (média= 3,4 \pm 0,2mm) (gráfico 2). Quando avaliado qual grupo apresentou maior dilatação da artéria teste em relação ao seu respectivo controle, embora não tenha havido diferença estatística significativa (p=0,15) entre os grupos elastase (média= 1,2 \pm 0,4mm) e papaína (média= 2,1 \pm 0,4mm), verificou-se maior tendência da papaína em provocar dilatação arterial (gráfico 3). Ao comparar os aneurismas papaína-induzidos com os aneurismas elastase-induzidos de outros estudos, o diâmetro dos aneurismas papaína-induzidos (3,4 \pm 0,2mm)

64

Discussão

65

descritos nos trabalhos de Cloft (média = 3,0mm) [33], Kallmes (média = 3,8 \pm 0,8mm) [35], Thiex (média = 3,2mm) [38] e Ding (média = 3,6 \pm 0,9mm) [57]. No entanto, é importante destacar que, no nosso estudo, o modo de aferição do tamanho dos aneurismas foi feito tomando-se as medidas diretamente das artérias carótidas. Isto é importante porque a maioria dos trabalhos com aneurismas elastase-induzidos utilizou medidas angiográficas, cujos valores tendem a ser superestimados por causa da pulsação sangüínea que distende as paredes do aneurisma [41]. Deste modo, é possível que se fosse utilizada a angiografia por subtração digital, as medidas dos aneurismas papaína-induzidos poderiam ter sido maiores.

Em relação ao comprimento dos aneurismas, a análise estatística não revelou diferença significativa (p=0,83) entre os grupos elastase (média= 17,4 ± 1,4mm) e papaína (média= 16,8 ± 2,1). Além disto, observou-se que o comprimento foi influenciado pela altura do nó, sendo que nós altos produziram cotos longos e nós baixos, cotos curtos (**gráfico 4**) (**figura 10**). Este fato também foi observado por Ding et al (2007) os quais, ao estudarem a variação do volume dos aneurismas elastase-induzidos de acordo com a altura da ligadura da artéria carótida comum direita, perceberam que ligaduras altas produziam aneurismas com comprimento e volume maiores e ligaduras baixas produziam com comprimento e volume menores [43].

Em relação às fibras elásticas, a artéria carótida comum do coelho apresentou-se como uma artéria mista, demonstrando uma camada muscular bem evidente e parede rica em fibras elásticas dispostas de forma concêntrica (figura11). Por serem fibras com alto grau de orientação e

possuírem propriedades elásticas intrínsecas, as fibras elásticas são as principais responsáveis pelas propriedades mecânicas da artéria [58]; de sorte que a destruição dessas fibras provoca o enfraquecimento da parede arterial com dilatação da mesma [5, 32]

Em nosso estudo, tanto papaína quanto elastase destruíram as fibras elásticas (tabela 3), porém a papaína mostrou maior tendência de destruição, o que foi confirmado pela formação de aneurisma em todos os casos deste grupo (tabela 1). Todavia, apesar de ambos os grupos formarem aneurismas, não houve redução do número de *pixels* das artérias testes em 2 casos, num total de 7, no grupo elastase (28,5%) e em 1 caso, num total de 8, do grupo papaína (12,5%). De fato, nos casos E3, E5 e P3 o número de pixels do teste foi maior que o número de pixels do controle, de modo que a diferença controle - teste foi negativa (tabela 3). Quando comparados o número de pixels e o diâmetro dos testes, observa-se que no caso E2 houve redução número de pixels do teste em relação ao seu controle (diferença do número de *pixels* controle-teste = 4.6×10^8 *pixels*), porém sem dilatação arterial correspondente (diferença do diâmetro teste controle = 0,0mm). Já no caso E3, não houve redução do número de pixels do teste em relação ao seu controle (diferença do número de *pixels* controle - teste = -0.4×10^8 pixels) e artéria não dilatou (diferenca do diâmetro teste - controle = 0,0mm). Nos casos E5 e P3, embora não tenha havido a redução do número de pixels dos testes em relação aos seus controles: E5 (diferença do número de *pixels* controle – teste = -02.4×10^8 *pixels*) e P3 (diferenca do número de *pixels* controle – teste = -0.3×10^8 *pixels*), as artérias testes dilataram em relação aos seus controles: E5 (diferença do diâmetro teste – controle = 1,0mm) e P3 (diferença do diâmetro teste – controle = 2,0mm) respectivamente (**tabela 1**) (**tabela 3**).

É possível que estas divergências tenham ocorrido em função de artefatos técnicos, tais como: 1) corte da artéria criando dobras, 2) excesso de corante com impregnação demasiada dos tecidos arteriais e 3) erro no ajuste do threshold de pixels. Todos estes problemas técnicos criam áreas escuras não representativas das fibras elásticas, levando à superestimação do número de pixels. Alguns destes artefatos já foram descritos em outro trabalho. Uitto et al. (1983) ao estudarem as fibras elásticas da pele de pacientes com pseudoxantoma elástico e síndrome de Buschke, utilizaram uma técnica de quantificação das fibras elásticas semelhante à descrita em nosso estudo. A análise morfométrica das fibras elásticas foi baseada no reconhecimento diferencial destas fibras através de coloração específica (coloração de Verhoeff - Van Gieson) que marca as fibras elásticas, destacando-as em relação ao tecido vizinho. As imagens em preto e branco, com variados graus de cinza, foram convertidas em imagens binárias através do ajuste do limiar de pixels (threshold) a um nível que fornecesse uma imagem binária das fibras, correspondendo, tanto quanto possível, às imagens pretas e brancas das fibras elásticas. Estas imagens foram então digitalizadas e a área ocupada pelos pixels pretos (fibras elásticas) foi determinada automaticamente pelo programa de computador. Neste estudo, os autores identificaram três fontes potenciais de erro, ou seja, áreas escuras não representativas das fibras elásticas: 1) artefatos de coloração,

67

2) infiltrados celulares densos e 3) erro de ajuste do *threshold* por parte do pesquisador. Quanto a este último item, os autores observaram uma variabilidade de \pm 6,1% no nível de *threshold* quando usavam 3 investigadores diferentes, e uma variabilidade individual de 2,4 a 5,3%. Em relação ao erro do equipamento, a variabilidade foi desprezível (10⁻⁶%) [59]. Assim, apesar dos avanços técnicos através do uso de programas computadorizados de imagem, específicos para análise microscópica, o corte da artéria, sua inclusão em parafina, a sua coloração e o ajuste do *threshold* são dependentes do operador, de modo que os artefatos inevitavelmente ocorrerão por conta do erro humano, restando como solução para a diminuição destes problemas, mais treinamento nos procedimentos de preparo e análise histológicos.

De qualquer modo, embora o método tenha estas limitações, foi possível observar o comportamento geral das fibras elásticas no nosso experimento. Por exemplo, a distribuição da quantidade de fibras elásticas dos controles foi homogênea, de sorte que a análise estatística não demonstrou diferença significativa (p= 0,13) entre os grupos elastase (média= 7,5 ± 0,5 x10⁸ *pixels*) e papaína (média= 6,6 ± 0,5 x10⁸ *pixels*) (gráfico 5). Em relação à destruição das fibras elásticas nos testes, a análise estatística não revelou diferença significativa (p= 0,009) entre os grupos elastase (média= 5,2 ± 1,1 x10⁸ *pixels*) e papaína (média= 2,6 ± 0,9 x10⁸ *pixels*). Mesmo assim, houve uma maior tendência da papaína em destruir fibras elásticas (**gráfico 6**). Esta tendência foi confirmada ao comparar o grau de destruição das fibras elásticas dos testes em relação aos seus

controles e, conquanto a análise estatística não tenha apresentado diferença significativa (p= 0,003) entre os grupos elastase (média= $2,3 \pm 1,1 \times 10^8$ *pixels*) e papaína (média= $6,0 \pm 1,1 \times 10^8$ *pixels*), os resultados demonstraram uma clara tendência de maior destruição das fibras elásticas no grupo papaína (**gráfico 7**) (**figura 11**).

Em relação ao espessamento parietal, os valores foram muito próximos em ambos os grupos (**tabela1**), de se sorte que não houve diferença estatística significativa (p=0,43) entre os grupos elastase e papaína (gráfico 8). Em relação aos testes, também não houve diferença estatística significativa (p=0,81) entre os grupos elastase (média = 0,30 ± 0,04mm) e papaína (média = 0,31 ± 0,0mm) (gráfico 9), sendo que estes valores ficaram um pouco abaixo do resultado de Abruzzo el al. cujo estudo histológico de 4 aneurismas elastase-induzidos revelou espessura parietal média de 0,40mm [12]. Quando comparada a diferença de espessura parietal entre os testes e os controles, a análise estatística não demonstrou diferença significativa (p=0,87) entre os grupos elastase e papaína (**gráfico 10**).

Com relação à lesão endotelial, ambas as enzimas papaína e elastase possuem ação destrutiva sobre o endotélio. Um estudo com microscopia eletrônica, sobre os efeitos da papaína e da elastase sobre o endotélio de ratos, verificou que a infusão intra-arterial destas substâncias provocava a lesão da membrana endotelial e a abertura das junções interendoteliais [60]. Em nosso trabalho, embora a maioria dos casos de ambos os grupos apresentasse lesão parcial do endotélio: elastase (85,7%) e papaína

69

(62,5%), a papaína provocou maior lesão endotelial do que a elastase, de modo que o endotélio foi completamente destruído em 37,5% dos casos do grupo papaína em comparação com 14,20% dos casos do grupo elastase, ou seja, uma diferença de 23,3% a favor do grupo papaína (**tabela 6**) (**tabela** 7) (**gráfico 12**). Este fato foi relevante, uma vez que gerou trombose mais extensa no grupo papaína. Em verdade, quando avaliado o grau de trombose, a análise estatística demonstrou diferença significativa (p= 0,001) a favor do grupo papaína (média = 0,88 ± 0,04) em comparação com o grupo elastase (média = 0,45 ± 0,08) (**gráfico 11**) . Estes resultados contrastaram com os de Abruzzo et al. que, ao estudarem as alterações histológicas em 4 aneurismas elastase-induzidos, verificaram trombo desorganizado preenchendo 1/3 da cavidade em somente 2 aneurismas [12].

Quanto à fibrose intimal, ela foi descontínua em 71,4% dos casos do grupo elastase. Já no grupo papaína, sua análise foi bastante prejudicada pois, em 50% dos casos deste grupo, a trombose extensa não permitiu distinguir a fibrose do tecido vizinho (tabela 8) (tabela 9) (gráfico 13) (figura 13). Isto é lamentável, pois a reação fibrótica é um item muito importante na determinação da validade dos modelos de aneurisma, principalmente quando são testados materiais de embolização [6]. Desse modo, é fundamental que sejam realizados trabalhos futuros os quais determinem o grau fibrose, como por exemplo, através da mensuração do colágeno da parede arterial.

Em relação ao processo inflamatório mural, ele foi ausente em 42,5% dos casos do grupo elastase contra 25% dos casos do grupo papaína, indicando uma menor tendência à inflamação no grupo elastase. Porém, em ambos os grupos predominaram os casos com inflamação leve (elastase= 57,1% e papaína= 62,5%) que consistia em um infiltrado de linfócitos e plasmócitos (gráfico 14) (figura 14). Isto difere dos casos de Abruzzo et al. nos quais predominavam neutrófilos e monócitos [12]. Embora este infiltrado inflamatório tenha sido leve, o seu predomínio no grupo papaína pode ter sido responsável pela maior tendência à destruição das fibras elásticas e, conseqüentemente, ao maior grau de dilatação arterial neste grupo. Anidjar et al (1992) estudaram a resposta inflamatória na parede da aorta abdominal de ratos Wistar incubados com elastase pancreática porcina e verificaram que, quanto maior a atividade inflamatória, maior o diâmetro da aorta abdominal [30]. Halpern et al (1994), por sua vez, estabeleceram um modelo para a següência dos eventos inflamatórios. Eles observaram que a elastase provocava uma lesão inicial na parede arterial, seguida de uma resposta inflamatória e ativação de proteinases endógenas com destruição da elastina e do colágeno [31]. Portanto, é possível que um infiltrado inflamatório, mesmo que leve, possa originar uma cascata de eventos na qual haja liberação de enzimas endógenas capazes de destruir as fibras elásticas e provocar maior dilatação arterial, como no caso do grupo papaína. Entretanto, é necessário não exagerar a importância da resposta inflamatória na formação dos aneurismas saculares experimentais, pois o seu papel ainda não está totalmente definido. Realmente, ao analisar os casos E1, P4

Discussão

72

e P5, verificou-se que houve formação de aneurisma apesar da ausência de inflamação (tabela 1) (tabela10) (tabela 11), indicando assim a ocorrência de outros mecanismos na formação destes aneurismas saculares experimentais, os quais não foram avaliados neste trabalho. De fato, além do enfraquecimento da parede arterial e da inflamação parietal, os aspectos hemodinâmicos são muito importantes na formação dos aneurismas saculares. Miskolczi et al. com o intuito de suprimir as respostas inflamatórias presentes nos estudos in vivo, realizaram um estudo in vitro através da incubação de elastase no interior das artérias carótidas de porcos e ovelhas. Depois colocaram estas artérias num circuito hidráulico que permitia controlar variáveis, tais como: pressão, pulsação e fluxo. O resultado foi o surgimento de pequenos aneurismas saculares nos locais onde havia destruição das fibras elásticas e tensão hemodinâmica sobre a parede arterial enfraquecida [32]. Portanto, da mesma forma que o modelo elastase-induzido, os mecanismos inflamatórios e hemodinâmicos dos aneurismas papaína-induzidos precisam de mais esclarecimentos.

Quanto à dose de papaína e de elastase, sua escolha foi empírica. Ao tentarmos injetar essas substâncias verificamos que as artérias carótidas comuns dos coelhos não suportavam mais que 0,2ml de suspensão enzimática, de sorte que a injeção desse volume provocava grande tensão nas paredes arteriais. Então, preferimos não ultrapassar esse limite, pois a injeção de volumes maiores poderia romper a artéria com perda do experimento. Apesar dos volumes injetados serem iguais em ambos os grupos, a quantidade de unidades de enzima foi diferente, de maneira que o

volume de 0,2ml de papaína, ou seja, 1mg, continha 17 - 40U de enzima e o volume de 0,2ml de elastase, ou seja, 1mg, continha 6 - 8U de enzima. Apesar dessa diferença, acreditamos que ela não tenha interferido de maneira importante nos resultados macroscópicos e histológicos pois, embora o grupo papaína tenha apresentado maior dilatação arterial, maior inflamação, maior lesão endotelial e maior trombose do que o grupo elastase, acreditamos que isto tenha ocorrido mais em função da ação intrínseca da papaína do que o seu maior número de unidades de enzima em relação à elastase. Isto porque, embora 1 mg de papaína contenha 17-40U de enzima e 1 mg de elastase contenha 6-8U de enzima, essa diferença foi compensada pela alta potência da elastase, cuja capacidade elastolítica é cinco vezes maior que a papaína [61]. De qualquer modo, embora a escolha da dose de papaína tenha sido empírica, ela foi suficiente para enfraguecer a parede arterial e produzir dilatação. Contudo, são necessários novos estudos para determinar se doses maiores de papaína são capazes de induzir a formação de aneurismas maiores.

Além disso, um fato interessante em nosso estudo foi quanto à dose elastase. A literatura refere a criação de aneurismas saculares com doses de elastase variando entre 20U e 100U [34, 38]. No nosso estudo, o uso de 6 -8U dessa enzima também foi capaz formar aneurismas, embora seu diâmetro médio (3,0 \pm 0,3mm) fosse menor do que os diâmetros apresentados em outros trabalhos com aneurismas elastase-induzidos, tais como: Ding (3,7 \pm 0,7mm) [43], Onizuka (4,2 \pm 1,2mm) [44] e Hoh (5,9 \pm 1,9mm) [34].

7 Conclusões

1 - A injeção intra-arterial de papaína foi capaz de formar aneurismas saculares em todos os animais.

2 - Os aneurismas papaína-induzidos apresentaram maior tendência à dilatação do que os aneurismas elastase-induzidos.

 3 - A papaína provocou maior tendência à destruição das fibras elásticas do que a elastase.

- 4 A papaína não provocou maior espessamento parietal do que a elastase.
- 5 A papaína provocou maior destruição endotelial do que a elastase.
- 6 A papaína provocou maior trombose do que a elastase.
- 7 A papaína provocou maior inflamação parietal do que a elastase.
- 8 Não foi possível determinar se a papaína provocou maior fibrose intimal do que a elastase.

8- Anexos

Anexo A - Dados Grupo Controle/Ficha Operatória

	Anim Dose S 0,2	al 01 F 0,9% ml	Anim Dose \$ 0,2	nal 02 SF 0,9% 2 ml	Animal 03 Dose SF 0,9% 0,2 ml		
1- Anestesia	2,80 kg/	Macho	2,30 kg	/Macho	1,90/Fêmea		
1.1-Início/Término (horas)	8:15 h	11:00 h	9;50 h	11:00 h	11:20 h	13:00h	
2-Tipo de Anestesia/Dose (ml)							
2.1- Cetamina	2,8	ml	2,3	ml	1,9 ml		
2.2-Xilazina	2,8	ml	2,3	ml	1,9 ml		
2.3-Cetoprofeno	0,8	ml	0,7	'ml	0,6 ml		
2.4-Enrofloxacina	0,8	ml	0,7	' ml	0,6 ml		
2.5-Heparina	-			-	-		
2.6-Reaplicação de Cetamina/Xilazina	-	Não	-	Não	-	Não	
3-Cirurgia							
3.1-Início/Término (horas)	8:30 h	9:30 h	10:00 h	10:45 h	11:30 h	12:30 h	
3.2-Complicações Peroperatórias	-	Não	-	Não	-	Não	
3.3-Recuperação Anestésica	Nori	mal	Noi	mal	Normal		

1-Sinais de Dor ou Estresse	2, kg/M	80 Iacho	2, kg/M	30 acho	1,90/Fêmea		
1.1-Dose	0,8	s ml	0,7	' ml	0,6 ml		
Cetoprofeno (ml)							
1.2-Enrofloxacina	0,	8ml	0,7	′ ml	0	,6 ml	
(ml)							
1.3-Complicação	-	Não	-	Não	-	Não	
Pós-operatória							
1.4-Saída de Pús	-	Não	-	Não	-	Não	
pelo Local de							
Incisão							
1.5-Sinais de	-	Não	-	Não	-	Não	
Hemorragia							
1.6-Déficit	-	Não	-	Não	-	Não	
Neurológico							

Anexos

— 77

Anexo C - Dados Grupo Elastase/Ficha Operatória

	Animal	Animal 01/Dose		Animal 02/Dose		Animal		Animal		Animal		Animal 06Dose		Animal	
	elas	stase	elastase		03/D	03/Dose		ose	05/D	ose	06/Dos	e dose	07/Dose		
	0,2	0,2 (ml)		2 (ml)	elast	tase	elastase		elastase		elast	tase	elastase		
					0,2	(ml)	0,2	(ml)	0,2	(ml)	0,2 (ml)		0,2 (ml)		
1- Anestesia	1,90 kg	g/Fêmea	2,30 kg	g/Macho	2,20 kg/	/Macho	2,00 kg/Fêmea		1,90/Macho		2,60 kg/Fêmea		2,20 kg/Macho		
1.1-Início/Término (horas)	8:30 h	10:00 h	10:00	11:30 h	9:00 h	11:00	9:00 h	10:30	10:30	12:00	9:30 h	12:30	12:00	15;40	
			h			h		h	h	h		h	h	h	
2-Tipo de Anestesia/Dose (ml)															
2.1- Cetamina	1,9	9ml	2,	3 ml	2,2 ml		2,0	ml 1,9ml		ml	2,6 ml		2,2 ml		
2.2-Xilazina	1,9	∋ ml	2,3 ml		2,2	2,2 ml 2,0 ml		ml	1,9 ml		2,6 ml		2,2 ml		
2.3-Cetoprofeno	0,6	6 ml	0,7 ml 0,7 ml		ml	0,6 ml 0,6 ml		7,5 ml		6,5 ml					
2.4-Enrofloxacina	0,6	6 ml	0,7 ml		0,7 ml		0,6 ml		0,6 ml		7,5 ml		6,5 ml		
2.5-Heparina		-		-	-		-		-		Sim		-		
2.6-Reaplicação de	-	Não	-	Não	-	Não	-	Não	-	Não	-	Não	-	Não	
Cetamina/Xilazina															
3-Cirurgia															
3.1-Início/Término (horas)	8:35 h	9:30 h	10:10	11:00 h	9:10 h	10:00	9:10 h	10:10	10:40	11:30	10:00	10:40	12:10	13:00	
			h			h		h	h	h	h	h	h	h	
3.2-Complicações Peroperatórias	-	Não	-	Não	-	Não	Sim	-	-	Não	-	Não	-	Não	
3.3-Recuperação Anestésica	No	Normal		Normal		Normal		Normal		Normal		Normal		Normal	

1-Sinais de Dor ou Estresse	1,90 kg	1,90 kg/Fêmea		g/Macho	Macho 2,20		2,	2,00 1,90/Macho		2,60		2,20		
				kg/Macho		kg/F	kg/Fêmea		kg/Fêmea		kg/Macho			
1.1-Dose Cetoprofeno (ml)	0,6 ml		0, 7 ml		0,7 ml		0,6 ml		0,6 ml		0,5 ml/0,5 ml		6,5 ml	
1.2-Enrofloxacina (ml) 0,6 ml		6 ml	0,	7 ml	0,7	0,7 ml		0,6 ml		i ml	0,5 ml/0,5 ml		6,5 ml	
1.3-Complicação Pós-	-	Não	-	Não	-	Não	-	Não	-	Não	-	Não	-	Não
operatória														
1.4-Saída de Pús pelo Local	-	Não	-	Não	-	Não	-	Não	-	Não	-	Não	-	Não
de Incisão														
1.5-Sinais de Hemorragia	-	Não	-	Não	-	Não	-	Não	-	Não	-	Não	-	Não
1.6-Déficit Neurológico - Não		-	Não	-	Não	-	Não	-	Não	-	Não	-	Não	

Anexo D- Dados Grupo Elastase/Ficha Pós-operatória

Anexos

- 79

	Animal 0)1/Dose	Animal 02/Dose Animal		imal	Animal 04/Dose Animal 05/Dose		Animal 06Dose		Animal 07/Dose		Animal 08/Dose				
	pap	ina ml)	0.2 (ml)		e papaina	papaina papaina		0 2 (ml)		papaina 0.2 (ml)		0.2 (ml)				
	0,2 (iiii)	0,2		0,2	(((((((((((((((((((((((((((((((((((((((0,2 (m) 0,2 (m)		0,2 (MI)		0,2 (111)		0,2 (111)			
1- Anestesia	2,20 kg/	Macho	2,30 kg	/Fêmea	2,90 kg	g/Fêmea	2,00 kg	/Macho	2,10 kg	/Macho	2,10 kg	/Macho	2,20 kg	/Macho	2,10 kg	/Macho
1.1-	8:30 h	11:30 h	10:40 h	12:30 h	16:30 h	18:30 h	11:00 h	12:30 h	8:30 h	12:00 h	10:15 h	12:00 h	9:00 h	11:00 h	10:30 h	12:00 h
Início/Término																
(horas)																
2-Tipo de																
Anestesia/Dose																
(ml)																
2.1- Cetamina	2,2	ml	2,3	ml	2,9	9 ml	2,0	ml	2,1	ml	2,1 ml		2,2 ml		2,1 ml	
2.2-Xilazina	2,2	ml	2,3	ml 2,9 ml		9 ml	2,0	2,0 ml 2,1 ml		2,1 ml		2,2 ml		2,1 ml		
2.3-Cetoprofeno	0,7	ml	0,7	ml	0,8	8 ml	0,6 ml		0,6 ml 0,6 ml		ml	6,6 ml		0,6 ml		
2.4-Enrofloxacina	0,7	ml	0,7	ml	0,8	8 ml	0,6 ml		0,6 ml 0,6 ml		6,6 ml		0,6 ml			
2.5-Heparina	-			•		-				-		•		-		-
2.6-Reaplicação	Sim	-	-	Não	-	Não	-	Não	-	Não	-	Não	-	Não	-	Não
de																
Cetamina/Xilazina																
3-Cirurgia		1								I				1		
3.1-	8:35 h	9:30 h	10:45 h	12:00 h	16:40 h	17:30 h	11:10 h	12:00 h	8:40h	9:40 h	10:20 h	11:00 h	9:10 h	10:00 h	10:40 h	11:30 h
Início/Término																
(horas)																
3.2-Complicações	-	Não	-	Não	-	Não	Sim	-	-	Não	-	Não	-	Não	-	Não
Peroperatórias																
3.3-Recuperação	Norr	nal	Nor	mal	No	rmal	Nor	mal	Nor	mal	Nor	mal	Nor	mal	Nor	mal
Anestésica									-							

Anexo E - Dados Grupo Papaína/Ficha Operatória

•	80
	~~~

1-Sinais de Dor ou Estresse	2,20 kg/Macho		2,30 kg/Fêmea		2,90 kg/Fêmea		2,00 kg/Macho		2,10 kg/Macho		2,10 kg/Macho		2,20 kg/Macho		2,10 kg/Macho	
1.1-Dose	0,7 ml		0,7 ml		0,8 ml		0,6 ml		0,6 ml		0,6 ml		6,6 ml		0,6 ml	
Cetoprofeno (ml)																
1.2-	0,7 ml		0,7 ml		0,8 ml		0,6 ml		0,6 ml		0,6 ml		6,6 ml		0,6 ml	
Enrofloxacina																
(ml)																
1.3-	-	Não	-	Não												
Complicação																
Pós-operatória																
1.4-Saída de	-	Não	-	Não												
Pús pelo Local																
de Incisão																
1.5-Sinais de	-	Não	-	Não												
Hemorragia																
1.6-Déficit	-	Não	-	Não												
Neurológico																

# Anexo F - Dados Grupo Papaína/Ficha Pós-operatória

#### 9 - Referências

- German WJ, B.S., Experimental production of carotid aneurysms. N Engl J Med, 1954. 21: p. 104-106.
- 2. Hashimoto, N., H. Handa, and F. Hazama, Experimentally induced cerebral aneurysms in rats. Surg Neurol, 1978. 10(1): p. 3-8.
- Hashimoto, N., et al., Experimental induction of cerebral aneurysms in monkeys. J Neurosurg, 1987. 67(6): p. 903-5.
- 4. Guglielmi, G., et al., Experimental saccular aneurysms. II. A new model in swine. Neuroradiology, 1994. 36(7): p. 547-50.
- 5. Cawley, C.M., et al., Arterial saccular aneurysm model in the rabbit. AJNR Am J Neuroradiol, 1996. 17(9): p. 1761-6.
- 6. Kallmes, D.F., et al., Histologic evaluation of platinum coil embolization in an aneurysm model in rabbits. Radiology, 1999. 213(1): p. 217-22.
- Kallmes, D.F., et al., Platinum coil-mediated implantation of growth factor-secreting endovascular tissue grafts: an in vivo study. Radiology, 1998. 207(2): p. 519-23.
- Hans, F.J., et al., Endovascular treatment of experimentally induced aneurysms in rabbits using stents: a feasibility study. Neuroradiology, 2003. 45(7): p. 430-4.
- Struffert, T., et al., Onyx in an experimental aneurysm model: histological and angiographic results. J Neurosurg, 2008. 109(1): p. 77-82.
- 10. Altes, T.A., et al., 1999 ARRS Executive Council Award. Creation of saccular aneurysms in the rabbit: a model suitable for testing

- 81

- 82

endovascular devices. American Roentgen Ray Society. AJR Am J Roentgenol, 2000. 174(2): p. 349-54.

- Short, J.G., et al., Elastase-induced saccular aneurysms in rabbits: comparison of geometric features with those of human aneurysms. AJNR Am J Neuroradiol, 2001. 22(10): p. 1833-7.
- Abruzzo, T., et al., Histologic and morphologic comparison of experimental aneurysms with human intracranial aneurysms. AJNR Am J Neuroradiol, 1998. 19(7): p. 1309-14.
- Yang, X.J., L. Li, and Z.X. Wu, A novel arterial pouch model of saccular aneurysm by concomitant elastase and collagenase digestion. J Zhejiang Univ Sci B, 2007. 8(10): p. 697-703.
- Drenth, J., et al., Structure of papain. Nature, 1968. 218(5145): p. 929-32.
- Ionescu, G., et al., Experimental preparation of deantigenized vascular heterografts and study of tolerance after transplantation. Acta Chir Belg, 1977. 76(4): p. 393-9.
- Guglielmi, G., et al., Electrothrombosis of saccular aneurysms via endovascular approach. Part 1: Electrochemical basis, technique, and experimental results. J Neurosurg, 1991. 75(1): p. 1-7.
- Powell, J., Models of arterial aneurysm: for the investigation of pathogenesis and pharmacotherapy--a review. Atherosclerosis, 1991. 87(2-3): p. 93-102.
- 18. Stehbens, W.E., Experimental production of aneurysms by microvascular surgery in rabbits. Vasc Surg, 1973. 7(3): p. 165-75.
- 19. Fagundes, D.J.T., MO, Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies animais de uso corrente. Acta Cir Bras, 2004. 19: p. 59-65.

- Nishikawa, M., R.D. Smith, and Y. Yonekawa, Experimental intracranial aneurysms. Surg Neurol, 1977. 7(4): p. 241-4.
- 21. Hashimoto, N., H. Handa, and F. Hazama, Experimentally induced cerebral aneurysms in rats: part II. Surg Neurol, 1979. 11(3): p. 243-6.

20.

- Hashimoto, N., H. Handa, and F. Hazama, Experimentally induced cerebral aneurysms in rats: Part III. Pathology. Surg Neurol, 1979. 11(4): p. 299-304.
- Nagata, I., H. Handa, and N. Hashimoto, Experimentally induced cerebral aneurysms in rats: part IV--cerebral angiography. Surg Neurol, 1979. 12(5): p. 419-24.
- Hashimoto, N., et al., Experimentally induced cerebral aneurysms in rats: Part V. Relation of hemodynamics in the circle of Willis to formation of aneurysms. Surg Neurol, 1980. 13(1): p. 41-5.
- 25. Nagata, I., et al., Experimentally induced cerebral aneurysms in rats: Part VI. Hypertension. Surg Neurol, 1980. 14(6): p. 477-9.
- 26. Suzuki, S., et al., Experimental intracranial aneurysms in rats. A gross and microscopic study. J Neurosurg, 1980. 52(4): p. 494-500.
- Massoud, T.F., et al., Experimental saccular aneurysms. I. Review of surgically-constructed models and their laboratory applications. Neuroradiology, 1994. 36(7): p. 537-46.
- Forrest, M.D. and G.V. O'Reilly, Production of experimental aneurysms at a surgically created arterial bifurcation. AJNR Am J Neuroradiol, 1989. 10(2): p. 400-2.
- 29. Stehbens, W.E., Evaluation of aneurysm models, particularly of the aorta and cerebral arteries. Exp Mol Pathol, 1999. 67(1): p. 1-14.

- Anidjar, S., et al., Correlation of inflammatory infiltrate with the enlargement of experimental aortic aneurysms. J Vasc Surg, 1992. 16(2): p. 139-47.
- Halpern, V.J., et al., The elastase infusion model of experimental aortic aneurysms: synchrony of induction of endogenous proteinases with matrix destruction and inflammatory cell response. J Vasc Surg, 1994. 20(1): p. 51-60.
- Miskolczi, L., et al., Saccular aneurysm induction by elastase digestion of the arterial wall: a new animal model. Neurosurgery, 1998. 43(3): p. 595-600; discussion 600-1.
- 33. Cloft, H.J., et al., Endovascular creation of an in vivo bifurcation aneurysm model in rabbits. Radiology, 1999. 213(1): p. 223-8.
- Hoh, B.L., et al., A modified technique for using elastase to create saccular aneurysms in animals that histologically and hemodynamically resemble aneurysms in human. Acta Neurochir (Wien), 2004. 146(7): p. 705-11.
- Kallmes, D.F., et al., Elastase-induced saccular aneurysms in rabbits: a dose-escalation study. AJNR Am J Neuroradiol, 2002. 23(2): p. 295-8.
- 36. Endo, S., P.J. Branson, and J.F. Alksne, Experimental model of symptomatic vasospasm in rabbits. Stroke, 1988. 19(11): p. 1420-5.
- 37. Moller-Hartmann, W., et al., Aberrant origin of the superior thyroid artery and the tracheoesophageal branch from the common carotid artery: a source of failure in elastase-induced aneurysms in rabbits. AJR Am J Roentgenol, 2003. 181(3): p. 739-41.
- 38. Thiex, R., et al., Haemorrhagic tracheal necrosis as a lethal complication of an aneurysm model in rabbits via endoluminal

incubation with elastase. Acta Neurochir (Wien), 2004. 146(3): p. 285-9; discussion 289.

- Krings, T., et al., A refined method for creating saccular aneurysms in the rabbit. Neuroradiology, 2003. 45(7): p. 423-9.
- Miskolczi, L., et al., Contrast injection via the central artery of the left ear in rabbits: a new technique to simplify follow-up studies. AJNR Am J Neuroradiol, 2005. 26(8): p. 1964-6.
- Fujiwara, N.H., et al., Serial angiography in an elastase-induced aneurysm model in rabbits: evidence for progressive aneurysm enlargement after creation. AJNR Am J Neuroradiol, 2001. 22(4): p. 698-703.
- 42. Ding, Y.H., et al., Long-term patency of elastase-induced aneurysm model in rabbits. AJNR Am J Neuroradiol, 2006. 27(1): p. 139-41.
- Ding, Y.H., et al., Control of aneurysm volume by adjusting the position of ligation during creation of elastase-induced aneurysms: a prospective study. AJNR Am J Neuroradiol, 2007. 28(5): p. 857-9.
- Onizuka, M., et al., Elastase-induced aneurysms in rabbits: effect of postconstruction geometry on final size. AJNR Am J Neuroradiol, 2006. 27(5): p. 1129-31.
- 45. Adams, D.F., T.B. Olin, and H.C. Redman, Catheterization of Arteries in the Rabbit. Radiology, 1965. 84: p. 531-5.
- 46. Angel-James, J., Variations in the vasculature of the aortic arch and its major branches in the rabbit. Acta Anat, 1974. 87: p. 283-300.
- 47. Bugge, J., Arterial supply of the cervical viscera in the rabbit. Acta Anat (Basel), 1967. 68(2): p. 216-27.

- 86

- 48. Blanding, J.O., RW; Hoffman, CL; Kniseley, WH, The gross morphology of the arterial supply to the trachea, primary bronchi and esophagus of the rabbit. Anat Rec, 1964. 148: p. 611-614.
- Du Boulay, G., ed. Comaparative neuroradiologic vascular anatomy of experimental animals. Radiology of the skull and brain, ed. T.P. Newton, DG. Vol. 2. 1974, Mosby: Saint Louis. 2763-2786.
- 50. Chungcharoen, D., et al., The effect of carotid occlusion upon the intrasinusal pressure with special reference to vascular communications between the carotid and vertebral circulations in the dog, cat and rabbit. J Physiol, 1952. 117(1): p. 56-76.
- Nitsawang, S.H.-K., R; Kanarawud, P, Purification of papain from Carica papaya latex: aquous two-phase extration versus two-step salt precipitation. Enzime and Microbiol Technology, 2006: p. 1-5.
- 52. Kimmel, J.R. and E.L. Smith, Crystalline papain. I. Preparation, specificity, and activation. J Biol Chem, 1954. 207(2): p. 515-31.
- 53. Sigma-Aldrich, ed. Reagentes bioquímicos e kits para pesquisa em ciências da vida. 2006. 1812-1813.
- 54. Junqueira, L.C., et al., Quantitation of collagen proteoglycan interaction in tissue sections. Connect Tissue Res, 1980. 7(2): p. 91-6.
- Guide for he care and use of laboratory animals. 1996, Washington
  D.C. EUA: National Academy Press. 127.
- 56. Schulz, H., M. Mohr, and M. Meyer, Elastase and papain inhibition by serum of mammals. Scand J Clin Lab Invest, 1989. 49(4): p. 381-8.
- Ding, Y.H., et al., Intra-venous digital subtraction angiography: an alternative method to intra-arterial digital subtraction angiography for experimental aneurysm imaging. Neuroradiology, 2005. 47(10): p. 792-5.

- 87

- 58. Junqueira, L.C., J, ed. Histologia básica. 10 ed. 2004, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. 103-124.
- 59. Uitto, J., et al., Elastic fibers in human skin: quantitation of elastic fibers by computerized digital image analyses and determination of elastin by radioimmunoassay of desmosine. Lab Invest, 1983. 49(4): p. 499-505.
- Constantinides, P. and M. Robinson, Ultrastructural injury of arterial endothelium. 3. Effects of enzymes and surfactants. Arch Pathol, 1969. 88(2): p. 113-7.
- Johanson, W.G., Jr. and A.K. Pierce, Effects of elastase, collagenase, and papain on structure and function of rat lungs in vitro. J Clin Invest, 1972. 51(2): p. 288-93.