

Avaliação de dois modelos experimentais de trombose venosa profunda: estase venosa e lesão endotelial

Evaluation of two experimental models of deep venous thrombosis: venous stasis and endothelial injury

Evaluación de dos modelos experimentales de trombosis venosa profunda: estasis venosa y lesión endotelial

Recebido: 10/03/2023 | Revisado: 30/03/2023 | Aceitado: 01/04/2023 | Publicado: 06/04/2023

Andreza Janine de Almeida Santos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9502-0148>

Universidade Federal do Mato Grosso, Brasil

E-mail: andrezzajas1992@hotmail.com

Carlos Eduardo Rodrigues Lopes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4225-2428>

Universidade Federal do Mato Grosso, Brasil

E-mail: carloslopesfsa@gmail.com

Luiz Eduardo Alessio Junior

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6226-3787>

Faculdade Garça Branca Pantanal, Brasil

E-mail: lui.alessio@gmail.com

Neiva Pereira Paim

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3507-2023>

Universidade Federal do Mato Grosso, Brasil

Instituto de Anatomia Patológica e Citologia – Luigi Bogliolo, Brasil

E-mail: neivapaim1@gmail.com

Keila Fernanda da Cruz Souza Pinto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3870-2430>

Instituto de Anatomia Patológica e Citologia – Luigi Bogliolo, Brasil

E-mail: keila.snp@hotmail.com

Rodolfo Cassimiro Araújo Berber

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5617-4964>

Universidade Federal de Rondonópolis, Brasil

E-mail: rodolfo.berber@ufr.edu.br

Aline Morandi Alessio

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3573-615X>

Universidade Federal do Mato Grosso, Brasil

E-mail: alinemorandialessio@gmail.com

Resumo

A trombose venosa profunda é uma importante causa de morbimortalidade no mundo, principalmente no âmbito intra-hospitalar, justificando seu tratamento e também profilaxia quando necessário. Os métodos de indução de trombose venosa profunda em animais são fundamentais para o estudo da fisiopatologia da doença, assim como para testes de drogas antitrombóticas. Os objetivos do trabalho foram avaliar e comparar dois métodos de indução de trombose venosa profunda em ratos: o modelo por estase venosa, amplamente descrito na literatura, e o modelo por lesão endotelial, com poucos estudos, principalmente em ratos. Foram usados ratos machos Wistar para indução da trombose venosa profunda. Para estase foi dissecada e ligada a veia cava inferior por 3 horas e após retirado o segmento com a veia contendo o trombo. Para o modelo de lesão endotelial, foi aplicado por 1 minuto um pedaço de papel filtro embebido em FeCl₃ e avaliado o segmento após 1 hora. Em ambos os modelos foram avaliados o peso úmido e a área de oclusão. Para o peso úmido obteve-se comparando os métodos de lesão endotelial e estase respectivamente: 17,7mg (±3,0mg) vs. 2.34mg (±1,8mg) com P<0,001. Para a área de oclusão obteve-se comparando os métodos de lesão endotelial e estase respectivamente: 85,11% (±9,67%) vs. 40,83% (±33,14%), com P<0,05. Em todas as variáveis o método de lesão endotelial possuiu resultados superiores ao método de estase venosa, mostrando ser mais reprodutível.

Palavras-chave: Trombose venosa; Modelos animais; Cloreto férrico; Ligadura.

Abstract

Deep vein thrombosis is an important cause of morbidity and mortality worldwide, especially in the hospital environment, justifying its treatment and also prophylaxis when necessary. The methods of inducing deep vein

thrombosis in animals are fundamental for the study of the pathophysiology of the disease, as well as for testing antithrombotic drugs. The objective in this work was to evaluate and compare two methods of inducing deep vein thrombosis in rats: the venous stasis model, widely described in the literature, and the endothelial lesion model, with few studies, especially in rats. male Wistar rats were used for induction of deep vein thrombosis. For stasis, the inferior vena cava was dissected and ligated for 3 hours and after the segment with the vein containing the thrombus was removed. For the endothelial lesion model, a piece of filter paper soaked in FeCl₃ was applied for 1 minute and the segment was evaluated after 1 hour. In both models, the wet weight and the area of occlusion were evaluated. For the wet weight, it was obtained by comparing the methods of endothelial injury and stasis, respectively: 17.7mg (± 3.0 mg) vs. 2.34mg (± 1.8 mg) with $P < 0.001$. For the area of occlusion, comparing the methods of endothelial injury and stasis, respectively: 85.11% ($\pm 9.67\%$) vs. 40.83% ($\pm 33.14\%$), with $P < 0.05$. In all variables, the endothelial lesion method had better results than the venous stasis method, proving to be more reproducible.

Keywords: Venous thrombosis; Animal models; Ferric chloride; Ligature.

Resumen

La trombosis venosa profunda es una importante causa de morbimortalidad en el mundo, especialmente en el ámbito hospitalario, justificando su tratamiento y también profilaxis cuando sea necesario. Los métodos de inducción de trombosis venosa profunda en animales son fundamentales para el estudio de la fisiopatología de la enfermedad, así como para el ensayo de fármacos antitrombóticos. Los objetivos del estudio fueron evaluar y comparar dos métodos de inducción de trombosis venosa profunda en ratas: el modelo de estasis venosa, ampliamente descrito en la literatura, y el modelo de lesión endotelial, con pocos estudios, principalmente en ratas. Se utilizaron ratas Wistar macho para inducir trombosis venosa profunda. Para la estasis, se disecó y ligó la vena cava inferior durante 3 horas, después de lo cual se extrajo el segmento con la vena que contenía el trombo. Para el modelo de lesión endotelial, se aplicó un trozo de papel de filtro empapado en FeCl₃ durante 1 minuto y se evaluó el segmento después de 1 hora. En ambos modelos se evaluó el peso húmedo y el área de oclusión. El peso húmedo se obtuvo comparando los métodos de lesión endotelial y estasis respectivamente: 17,7 mg ($\pm 3,0$ mg) vs. 2,34 mg ($\pm 1,8$ mg) con $P < 0,001$. Para el área de oclusión, comparando los métodos de lesión endotelial y estasis respectivamente: 85,11% ($\pm 9,67\%$) vs. 40,83% ($\pm 33,14\%$), con $P < 0,05$. En todas las variables, el método de lesión endotelial tuvo mejores resultados que el método de estasis venosa, demostrando ser más reproducible.

Palabras clave: Trombosis venosa; Modelos de animales; Cloruro férrico; Ligadura.

1. Introdução

A trombose venosa profunda (TVP) ocorre devido ao desequilíbrio hemostático, sendo importante causa de morbimortalidade, com uma incidência aproximada de 120/100.000 indivíduos (Heit et al., 2016). A TVP e a embolia pulmonar possuem alto custo devido à assistência médica necessária para o tratamento hospitalar (aproximadamente \$62.838/5 anos) (Fernandez et al., 2015; Cohoon et al., 2015).

Modelos animais de TVP são importantes para o estudo da fisiopatologia da doença e o teste de drogas antitrombóticas (von Brühl et al., 2012; Liu et al., 2019; Li et al., 2019). Há vários estudos em modelos animais que avaliaram drogas que atualmente são utilizadas para o tratamento de pacientes, tais como clopidogrel (Herbert et al., 1993), ticagrelor (van Giezen et al., 2009), rivaroxabana (Parry et al., 2011) e apixabana (Wong et al., 2008). Para os modelos experimentais de TVP tem sido utilizados diversos animais como porcos (Albadawi et al., 2017), cachorros (Frisbie, 2005), coelhos (Himber et al., 2003; Wong et al., 2006), babuínos (Wakefield et al., 1991), camundongos (Brill et al., 2011) e ratos (Myers et al., 2002). Os camundongos e ratos têm sido amplamente utilizados por causa da aceitação no âmbito da biologia experimental, ao fácil manuseio pelo pequeno tamanho, menores despesas para abrigo e infraestrutura, e uma maior aceitação cultural em relação aos animais maiores (Jagadeeswaran et al., 2016). Em relação aos camundongos, os ratos ainda têm a vantagem de possuírem maiores vasos, o que facilita os procedimentos realizados. Em ratos há diversos modelos descritos para indução de TVP como ligadura (Zhou et al., 2019), estenose (Gong et al., 2011), cloreto férrico (Xin et al., 2017), estase com hipercoagulabilidade (Peternel et al., 2005), dentre outros (Diaz et al., 2012; Albadawi et al., 2017; Diaz et al., 2019).

A TVP nos modelos animais é induzida em geral por dois mecanismos: redução/interrupção do fluxo sanguíneo ou lesão endotelial na parede do vaso (Jagadeeswaran et al., 2016, Diaz et al., 2019). O modelo experimental para indução de trombose venosa em ratos foi inicialmente descrito em 1980 por Reyers, que utilizou a ligadura da veia cava inferior (VCI) para induzir a formação do trombo por estase sanguínea. Em 1990, Kurz et al. propôs um modelo animal de trombose arterial

em ratos utilizando a lesão endotelial causada pelo cloreto férrico (FeCl₃), sendo a concentração do FeCl₃ dose-dependente na formação de trombo oclusivo arterial. Desde então, o modelo tem sido amplamente utilizado não somente em ratos, mas inclusive em camundongos, tanto para indução de trombose arterial (Wang et al., 2005) como para indução de trombose venosa (Wang et al., 2006). Também tem sido utilizado em ratos um método de indução de trombose venosa associando ligadura parcial com lesão endotelial através do uso de FeCl₃ (Gustafsson et al., 2001; Peternel et al., 2005; Hennan et al., 2008). Finalmente, Dai et al. (2017) utilizaram exclusivamente o método de lesão endotelial com o FeCl₃ para a indução de trombose venosa em ratos.

Assim, tanto o modelo de indução de TVP por ligadura da VCI como o modelo de indução de TVP pelo FeCl₃ são amplamente utilizados, porém observou-se variabilidade significativa na técnica de execução e nos parâmetros avaliados, como o tempo de ligadura da VCI de 3h (Gong et al., 2011), e de 30min a 6h (Reyers et al., 1980), o tempo de exposição da VCI ao FeCl₃ de 3,5min (Couture et al., 2011), de 5min (Dai et al., 2017), de 15min (Cui et al., 2015) e a concentração de FeCl₃ utilizado para lesar o endotélio 8% (Saitoh et al., 2017), 10% (Couture et al., 2011) e 50% (Cui et al., 2015). Outro fator importante é a influência da variação destas técnicas no peso do trombo: Estase venosa por ligadura: 2.54mg±0.29mg (Reyers et al., 1980), 3.51mg±0.85mg (Reyers et al., 1980), 13.42mg±2.01mg (Gong et al., 2011); Lesão venosa com FeCl₃: 6.10mg±3.6mg (Dai et al., 2017) 14.7mg±1.0mg (Couture et al., 2011), dentre outros. Além disso, poucos estudos realizam a análise histológica do trombo formado, que possibilita a análise da área de oclusão da VCI (Reyers et al., 1980; Gong et al., 2011). O uso destes parâmetros permite avaliar *in vivo* a formação efetiva do trombo com baixo custo e rápida análise.

Perante essas variabilidades e a ausência de um protocolo padronizado de indução de TVP em ratos com o FeCl₃ ou utilizando a ligadura, nosso trabalho buscou comparar os 2 métodos quanto aos parâmetros peso do trombo úmido, área de oclusão e incidência do trombo, avaliando histologicamente e discutindo ao final os resultados de cada subgrupo.

2. Metodologia

Ratos Wistar macho (250-350g) foram mantidos em caixas coletivas, sob condições de ciclo de luz controlado (12 horas claro e 12 horas escuro), temperatura constante (24 ±2°C), com água e ração padrão *ad libitum*. Todos os cuidados com os animais e os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentos Animal (CONCEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) em reunião ordinária de 24/11/2017 sob o protocolo nº 23108.725489/2017-80.

Os animais foram anestesiados (ketamina 75mg/kg e xilazina 10mg/kg) via intraperitoneal (Nakata & Kira, 2016). Em seguida o animal foi posicionado em uma mesa cirúrgica, realizada uma laparotomia mediana, os órgãos expostos foram mantidos hidratados com soro fisiológico 0,9% e isolada delicadamente a região da VCI.

Para o modelo de estase venosa, as veias colaterais foram ligadas e a VCI foi cuidadosamente isolada da artéria abdominal logo abaixo da veia renal esquerda, onde a ligadura foi feita com fio de seda 4.0 para criar uma oclusão total do fluxo. A cavidade abdominal do animal foi fechada e a formação do trombo venoso foi observada após 3 horas (Reyers et al., 1980). O trombo foi retirado da VCI e pesado imediatamente.

No modelo de indução TVP por lesão endotelial, as veias colaterais foram isoladas e pré-nós colocados na VCI abaixo da confluência das veias renais para facilitar a retirada do segmento. Um papel filtro (1x10mm) embebido com FeCl₃ à 15% foi colocado sobre a VCI durante 1 minuto (Wang et al., 2006; Alessio et al., 2013) e a formação do trombo venoso foi observada após 1 hora. Os ratos permaneceram anestesiados durante todo o procedimento.

O grupo controle de Estase Venosa foi executado com os mesmos passos do grupo de Estase até o isolamento da VCI, todavia não foi realizada a ligadura. Após o isolamento da VCI aguardou-se 3 h para reabrir a cavidade e retirar o segmento da VCI. Nos grupos controle no grupo de Lesão Endotelial por FeCl₃, foi aplicado papel filtro não embebido em FeCl₃ na VCI do

animal por 1 minuto e após uma hora foi retirado o segmento da VCI.

Para avaliação do peso úmido do trombo nos subgrupos destinado a análise dessa variável, o trombo foi retirado do segmento da VCI e pesado imediatamente em balança de alta precisão.

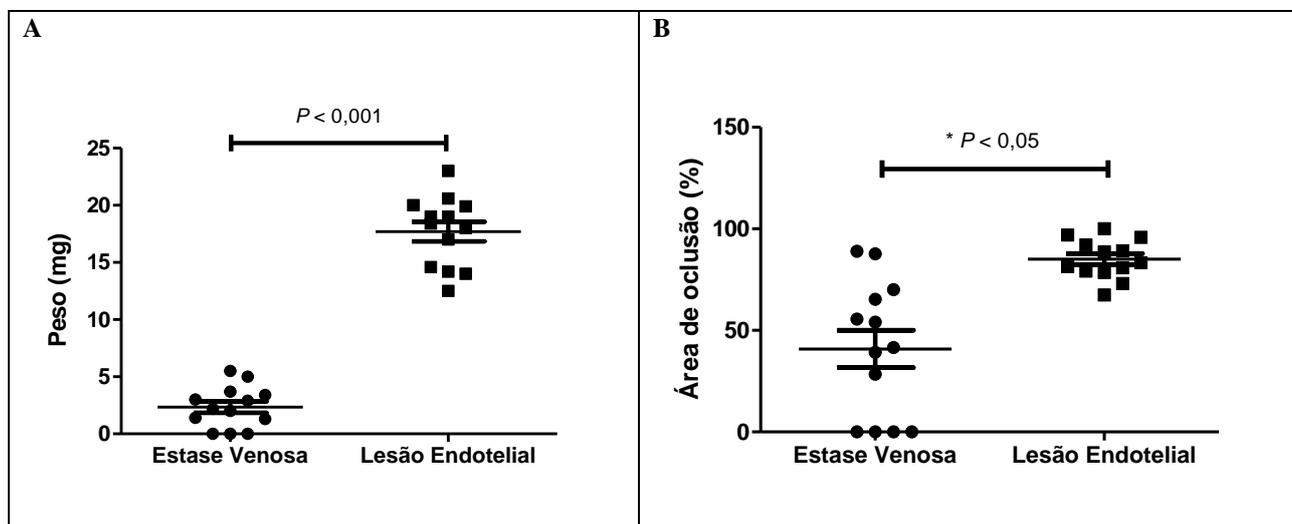
O segmento contendo o trombo na VCI com a artéria abdominal, somado a tecidos moles adjacentes, foi acomodado em papel filtro (2x1cm) para evitar a retração. Em seguida, foi fixado em formaldeído à 10% por 24 horas. O material foi processado manualmente a frio para evitar excessivo dessecamento e facilitar o corte histológico. O processo compreende a imersão do material em álcool absoluto (4 recipientes), terebentina (2 recipientes) e parafina em estufa à 86°C (2 recipientes), permanecendo o material durante 40 minutos em cada recipiente. Posteriormente, o material foi incluído em parafina e seguiu para o corte histológico. Secções transversais em série 5µm de espessura foram cortados para confecções de lâminas histológicas coradas com hematoxilina e eosina (HE) (Jin et al., 2017). Imagens das lâminas foram obtidas por um microscópio com câmera fotográfica acoplada para posterior análise da área de oclusão da VCI pelo trombo formado. A área de oclusão foi calculada através de regra de três simples utilizando o programa ImageJ® (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Foram descritos as médias (M) e o desvio padrão (DP) para os resultados do peso do trombo e da área de oclusão da VCI. A comparação destes resultados de acordo com o método de indução foi realizada no programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., USA) através do teste de Mann-Whitney. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

3. Resultados

Foram utilizados 13 animais para a determinação do peso do trombo e da área de oclusão em cada modelo de trombose venosa e nos grupos controle, sendo ao total utilizados 104 animais. Não houve formação de trombo em nenhum dos animais dos grupos controle. O peso úmido do trombo venoso no modelo de lesão endotelial foi maior do que no modelo de estase venosa (17,7mg ± 3,0mg vs. 2,34mg ± 1,8mg; $P < 0,001$) (Gráfico 1 A). A área de oclusão da VCI no modelo de lesão endotelial apresentou valores maiores quando comparado com o modelo de estase venosa (85,11% ± 9,67% vs. 40,83% ± 33,14%; $P < 0,05$) (Gráfico 1 B).

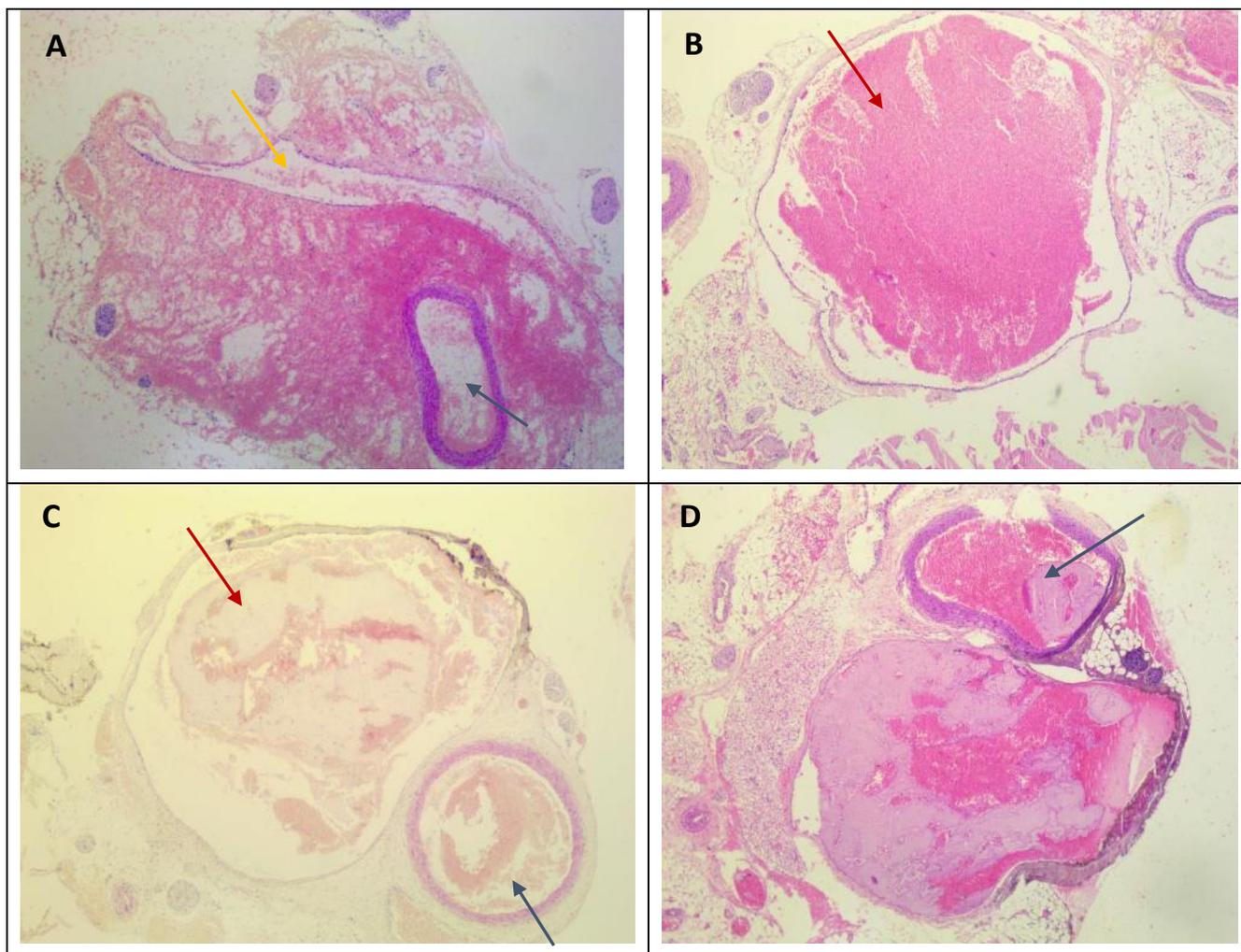
Gráfico 1 - Comparação dos modelos animais de trombose venosa: estase e lesão endotelial. **A**- Peso úmido dos trombos. **B**- Área de oclusão.



Fonte: próprio autor utilizando o programa *GraphPad Prism 5.0*. * Teste de *Mann-Whitney*.

A área de oclusão no modelo de TVP por estase venosa variou entre 0 a 88,89%, já no modelo induzido por lesão endotelial a variação observada foi entre 67,48% a 100% (Figura 1 A-D).

Figura 1 - Área de oclusão nos modelos animais de trombose venosa. Modelo de estase venosa: **A**- Ausência de trombo venoso. **B**- Oclusão de 81,15% da VCI. Modelo de lesão endotelial: **C**- Área de oclusão 78,44% da VCI. **D**- Área de oclusão 100% da VCI.



Fonte: próprio autor através do *software ImageJ*. VCI: veia cava inferior. As setas coloridas indicam a veia cava inferior (seta amarela), os trombos (setas vermelhas) e a artéria aorta descendente (setas azuis).

Os dados da análise do peso do trombo úmido e da área de oclusão nos grupos de trombose venosa por estase venosa e lesão endotelial observados foram descritos detalhadamente na Tabela 1.

Tabela 1 - Comparação da área de oclusão e do peso úmido nos modelos animais de trombose venosa: estase e lesão endotelial.

Variáveis	Estase Venosa			Lesão Endotelial			
	Média	Desvio Padrão	IC>95%	Média	Desvio Padrão	IC>95%	* P
Área de oclusão (%)	40,83	33,14	60,85	85,11	9,66	90,96	<0,005
Peso Úmido (mg)	2,34	1,81	3,43	17,7	3,0	19,57	<0,001

*Dados comparados pelo teste de Mann-Whitney. IC: intervalo de confiança. Fonte: Autoria própria.

A incidência de trombose venosa no modelo de TVP por lesão endotelial foi maior do que a observada no modelo por estase venosa, tanto quando comparada pelo peso úmido como pela área de oclusão (76,9% vs. 100% e 69,23% vs. 100% respectivamente). Dessa forma, observou-se uma melhor reprodutibilidade no método de trombose venosa induzido por lesão endotelial com uso do FeCl₃ do que no modelo por estase venosa utilizando a ligadura da VCI, tanto na incidência do trombo, como nos parâmetros peso do trombo e área de oclusão.

4. Discussão

O modelo de estase venosa foi descrito pela primeira vez em 1980 por Reyers et al. quando estes estudaram a falha da aspirina em diferentes doses para modificar a trombose experimental. Este modelo é utilizado em diferentes pesquisas para testes de drogas (Reyers et al., 1980; Sood et al., 2010; Jagadeeswaran et al., 2016) e para analisar componentes inflamatórios do trombo (von Brühl et al., 2012; Liu et al., 2019). Os modelos de estase são projetados para simular a depressão do fluxo venoso ou fluxo perturbado que ocorre em bolsas de válvulas, uma vez que um dos fatores gatilhos para formação de TVP em pacientes é a depressão do fluxo sanguíneo sem desnudação endotelial, modelos experimentais animais demonstram que o tempo de curso prolongado de TVP se assemelha à dinâmica da formação do trombo na TVP humana (von Brühl et al., 2012). Em seus estudos, Von Bruhl et al. (2012) também realizaram avaliação macroscópica de trombos venosos comparando a tamanhos dos trombos com o tempo de estase.

Sood et al. (2010) referem que os pesos dos trombos são uma medida rápida e confiável da resolução dos trombos. Henke et al. (2007) analisaram a resolução dos trombos em até 28 dias e verificam que a trombose da VCI e os coágulos diminuíram com o tempo, sendo maior em 2 dias após ligadura (86mg±3mg), e com o decréscimo por volta do sétimo dia (45mg±9mg), tornando-se o trombo inseparável da parede da veia após 14 dias, demonstrando assim a fibrose. Outros estudos usaram como parâmetro de avaliação os pesos dos trombos, como Reyers et al. (1980) comparando quatro grupos, sendo 2 grupos controles e 2 grupos os quais foram administradas doses de 2,5mg/kg e 200mg/kg de aspirina, nos grupos controles foi encontrada pesos médios dos trombos de 2,54mg±0,29mg e 3,51mg±0,85mg. Pazzini et al. (2015) utilizaram o modelo de estase e a média dos trombos analisada foi de 17,2mg±15mg. Gong et al. (2011) com o mesmo método de estase obteve peso médio dos trombos de 13.42mg±2.01mg.

Devido à variabilidade dos tamanhos dos trombos produzidos pelo modelo de estase, em algumas vezes ocorreu a não formação do mesmo, alguns autores associam um ou mais métodos de indução de TVP ao de estase com o intuito de garantir um maior tamanho de trombo e a reprodutibilidade o método (Gustafsson et al., 2001; Hennan et al., 2008; Prado et al., 2017). Em modelos que utilizaram o método de lesão com FeCl₃ associado a ligadura, observou-se um peso médio do trombo de aproximadamente 24mg (Gustafsson et al., 2001; Hennan et al., 2008). Prado et al. (2017) associaram o modelo de ligadura ao de indução de hipercoagulabilidade encontrou trombos com média de pesos 21,2mg ±3,3mg. Peternel et al. (2005) avaliaram dois modelos experimentais de indução de trombose venosa em ratos: a estase completa combinada com hipercoagulabilidade pesos médios 18mg±3,3mg e a estase parcial combinada com lesão do vaso 22,5mg±2,31mg.

A maioria dos estudos que realizam a análise histológica, fazem uso desta técnica para análise de imunohistoquímica, contagem de células inflamatórias, padrão celular (Sood et al., 2010) 48, mas não determinam a área de oclusão.

O cloreto férrico (FeCl₃) foi inicialmente descrito como agente trombogênico por Kurz et al. em 1990. Desde então, tem sido amplamente utilizado em várias pesquisas com essa finalidade. O mecanismo pelo qual induz a formação do trombo ainda não é completamente elucidado. Classicamente, assume-se que o efeito principal seja devido a ação na vasculatura, na qual a acumulação de ferro e radicais de oxigênio lesam o endotélio, levando a ativação da cascata de coagulação (Schoenwaelder & Jackson, 2015). Todavia, Barr et al. (2013) observaram que o FeCl₃ induziu a formação de trombo mesmo com o endotélio inalterado, o que incentivou ainda mais a busca por explicações alternativas ao mecanismo de atuação.

Ciciliano et al. (2015) mostraram que na vasculatura in vitro são formados agregados com plaquetas, mas as células predominantes são os eritrócitos. O mesmo estudo também testou o FeCl₃ no sangue na ausência de células endoteliais. Nesse último modelo o FeCl₃ também induziu a formação do agregado, o que levou os autores a proporem uma explicação ao modelo trombogênico baseado não somente na coagulação ativada pela exposição endotelial, mas também baseado na carga elétrica. Aliado a incerteza de seu mecanismo está a ampla variedade de concentrações e tempo de exposição da adventícia do vaso ao cloreto férrico descritos na literatura (Ciciliano et al., 2015).

Gustafsson et al. (2001) utilizou um método combinado de estenose com FeCl₃ a 8% por 5 minutos exposto na VCI e dividiu os ratos em 3 grupos, retirando o trombo de um grupo após 1 hora, do outro após 3 horas e do último após 5 horas. O grupo com o trombo retirado após 1h teve o peso médio do trombo entre 20 e 30mg, os grupos cujos trombos foram retirados após 3 e 5h tiveram um peso médio entre 30 e 40mg Hennen et. al (2008) também utilizaram o método associando estenose e cloreto férrico, mas na concentração de 10%, também por 5 minutos. Os trombos foram retirados 1 hora após a exposição, gerando trombos com peso médio entre 20 e 26mg. Couture et al. (2011) utilizando o FeCl₃ a 10% por 3.5 minutos no vaso e retirada após 1 hora encontraram uma média de peso de 14.7±1.0mg. Dai et al. (2017) utilizando o método somente com FeCl₃ na VCI, na concentração de 10% e exposição por 5 minutos obtiveram peso seco (após 24 horas) médio de 6.10mg±3.60mg. Cui et al. (2015) utilizaram o FeCl₃ em concentração de 50% exposto sob e sobre a VCI por 15 minutos. Após, foi retirado o trombo e o peso médio obtido foi entre 6 e 9mg.

Os resultados do peso do trombo que obtivemos com esse trabalho no método utilizando a ligadura durante 3 horas foram semelhantes aos valores conseguidos por Reyers et al. em 1980 após 2 horas de ligadura, todavia com pesos médios consideravelmente menores que os valores obtidos por outros trabalhos como Pazzini et al. (2015) e Gong et al. (2011). Os valores dos pesos médios que obtivemos com o método utilizando a lesão endotelial foram semelhantes e consideravelmente superiores aos descritos por Couture et al. (2011), e superiores a média de pesos encontrada por Dai et al. (2017) e Cui et al. (2015).

São poucas as publicações contendo a área de oclusão como parâmetro avaliado em modelos animais de trombose. Dentre eles pode-se citar Alessio et al. (2013) que avaliaram tal parâmetro em camundongos. O método de avaliação foi o mesmo utilizado, o programa ImageJ. Os resultados mostraram oclusão total em 15 minutos a 1 hora. Tien et al. (2016) também realizaram avaliação da área de oclusão, pelo software Adobe Photoshop 7.0.1 mas apenas afirmam a redução da área do trombo sem mostrar em gráficos as porcentagens obtidas. Mesmo sem dados na literatura suficientes para comparação de nossos achados, acreditamos ser este parâmetro útil e recomendável nos experimentos com trombose em modelos animais. É simples de ser calculado, para tal basta utilizar a fórmula: área de oclusão = (área do trombo x 100) /área do vaso. A maior dificuldade pode consistir na elaboração de lâminas com boa qualidade de visualização, o que é influenciado desde a forma de processamento até a presença de profissional habilitado para a montagem e análise das mesmas.

5. Conclusão

O método de indução de trombose venosa profunda por lesão endotelial com o uso de cloreto férrico (FeCl₃) demonstrou uma boa reprodutibilidade devido à alta taxa de incidência de trombose venosa nos animais, além de possuir um tempo menor para formação do trombo, baixo custo e de fácil execução.

Referências

Albadawi, H., Witting, A. A., Pershad, Y., Wallace, A., Fleck, A. R., Hoang, P., Khademhosseini, A., & Oklu, R. (2017). Animal models of venous thrombosis. *Cardiovascular diagnosis and therapy*, 7 (Suppl 3), S197–S206. <https://doi.org/10.21037/cdt.2017.08.10>

- Alessio, A. M., Beltrame, M. P., Nascimento, M. C., Vicente, C. P., de Godoy, J. A., Silva, J. C., Bittar, L. F., Lorand-Metze, I., de Paula, E. V., & Annichino-Bizzacchi, J. M. (2013). Circulating progenitor and mature endothelial cells in deep vein thrombosis. *International journal of medical sciences*, 10(12), 1746–1754. <https://doi.org/10.7150/ijms.6887>
- Barr, J. D., Chauhan, A. K., Schaeffer, G. V., Hansen, J. K., & Motto, D. G. (2013). Red blood cells mediate the onset of thrombosis in the ferric chloride murine model. *Blood*, 121(18), 3733–3741. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-11-468983>
- Brill, A., Fuchs, T. A., Chauhan, A. K., Yang, J. J., De Meyer, S. F., Köllnberger, M., Wakefield, T. W., Lämmle, B., Massberg, S., & Wagner, D. D. (2011). von Willebrand factor-mediated platelet adhesion is critical for deep vein thrombosis in mouse models. *Blood*, 117(4), 1400–1407. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-05-287623>
- Ciciliano, J. C., Sakurai, Y., Myers, D. R., Fay, M. E., Hechler, B., Meeks, S., Li, R., Dixon, J. B., Lyon, L. A., Gachet, C., & Lam, W. A. (2015). Resolving the multifaceted mechanisms of the ferric chloride thrombosis model using an interdisciplinary microfluidic approach. *Blood*, 126(6), 817–824. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-02-628594>
- Cohon, K. P., Leibson, C. L., Ransom, J. E., Ashrani, A. A., Petterson, T. M., Long, K. H., Bailey, K. R., & Heit, J. A. (2015). Costs of venous thromboembolism associated with hospitalization for medical illness. *The American journal of managed care*, 21(4), e255–e263.
- Couture, L., Richer, L. P., Cadieux, C., Thomson, C. M., & Hossain, S. M. (2011). An optimized method to assess in vivo efficacy of antithrombotic drugs using optical coherence tomography and a modified Doppler flow system. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 64(3), 264–268. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2011.09.001>
- Cui, G., Shan, L., Guo, L., Keung Chu, I., Li, G., Quan, Q., Zhao, Y., Meng Chong, C., Zhang, Z., Yu, P., Hoi, M. P., Sun, Y., Wang, Y., & Lee, S. M. (2015). Corrigendum: Novel anti-thrombotic agent for modulation of protein disulfide isomerase family member ERp57 for prophylactic therapy. *Scientific reports*, 5, 13509. <https://doi.org/10.1038/srep13509>
- Dai, B., Li, L., Li, Q., Song, X., Chen, D., Dai, J., Yao, Y., Yan, W., Teng, H., Yang, F., Xu, Z., & Jiang, Q. (2017). Novel microspheres reduce the formation of deep venous thrombosis and repair the vascular wall in a rat model. *Blood coagulation & fibrinolysis: an international journal in haemostasis and thrombosis*, 28(5), 398–406. <https://doi.org/10.1097/MBC.0000000000000629>
- Diaz, J. A., Obi, A. T., Myers, D. D., Jr, Wroblewski, S. K., Henke, P. K., Mackman, N., & Wakefield, T. W. (2012). Critical review of mouse models of venous thrombosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 32(3), 556–562. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.244608>
- Diaz, J. A., Saha, P., Cooley, B., Palmer, O. R., Grover, S. P., Mackman, N., Wakefield, T. W., Henke, P. K., Smith, A., & Lal, B. K. (2019). Choosing a Mouse Model of Venous Thrombosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 39(3), 311–318. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.311818>
- Fernandez, M. M., Hogue, S., Preblich, R., & Kwong, W. J. (2015). Review of the cost of venous thromboembolism. *Clinic Economics and outcomes research: CEOR*, 7, 451–462. <https://doi.org/10.2147/CEOR.S85635>
- Frisbie J. H. (2005). An animal model for venous thrombosis and spontaneous pulmonary embolism. *Spinal cord*, 43(11), 635–639. <https://doi.org/10.1038/sj.sc.3101770>
- Gustafsson, D., Nyström, J., Carlsson, S., Bredberg, U., Eriksson, U., Gyzander, E., Elg, M., Antonsson, T., Hoffmann, K., Ungell, A., Sörensen, H., Någård, S., Abrahamsson, A., & Bylund, R. (2001). The direct thrombin inhibitor melagatran and its oral prodrug H 376/95: intestinal absorption properties, biochemical and pharmacodynamic effects. *Thrombosis research*, 101(3), 171–181. [https://doi.org/10.1016/s0049-3848\(00\)00399-6](https://doi.org/10.1016/s0049-3848(00)00399-6)
- Gong, G., Qin, Y., & Huang, W. (2011). Anti-thrombosis effect of diosgenin extract from *Dioscorea zingiberensis* C.H. Wright in vitro and in vivo. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 18(6), 458–463. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.08.015>
- Heit, J. A., Spencer, F. A., & White, R. H. (2016). The epidemiology of venous thromboembolism. *Journal of thrombosis and thrombolysis*, 41(1), 3–14. <https://doi.org/10.1007/s11239-015-1311-6>
- Henke, P. K., Varma, M. R., Moaveni, D. K., Dewyer, N. A., Moore, A. J., Lynch, E. M., Longo, C., Deatrick, C. B., Kunkel, S. L., Upchurch, G. R., Jr, & Wakefield, T. W. (2007). Fibrotic injury after experimental deep vein thrombosis is determined by the mechanism of thrombogenesis. *Thrombosis and haemostasis*, 98(5), 1045–1055.
- Hennan, J. K., Morgan, G. A., Swillo, R. E., Antrilli, T. M., Mugford, C., Vlasuk, G. P., Gardell, S. J., & Crandall, D. L. (2008). Effect of tiplaxtinin (PAI-039), an orally bioavailable PAI-1 antagonist, in a rat model of thrombosis. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, 6(9), 1558–1564. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03063.x>
- Herbert, J. M., Tissinier, A., Defreyn, G., & Maffrand, J. P. (1993). Inhibitory effect of clopidogrel on platelet adhesion and intimal proliferation after arterial injury in rabbits. *Arteriosclerosis and thrombosis: a journal of vascular biology*, 13(8), 1171–1179. <https://doi.org/10.1161/01.atv.13.8.1171>
- Himber, J., Wohlgensinger, C., Roux, S., Damico, L. A., Fallon, J. T., Kirchhofer, D., Nemerson, Y., & Riederer, M. A. (2003). Inhibition of tissue factor limits the growth of venous thrombus in the rabbit. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, 1(5), 889–895. <https://doi.org/10.1046/j.1538-7836.2003.00110.x>
- Jagadeeswaran, P., Cooley, B. C., Gross, P. L., & Mackman, N. (2016). Animal Models of Thrombosis from Zebrafish to Nonhuman Primates: Use in the Elucidation of New Pathologic Pathways and the Development of Antithrombotic Drugs. *Circulation research*, 118(9), 1363–1379. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306823>
- Jin, Q. Q., Sun, J. H., Du, Q. X., Lu, X. J., Zhu, X. Y., Fan, H. L., Hölscher, C., & Wang, Y. Y. (2017). Integrating microRNA and messenger RNA expression profiles in a rat model of deep vein thrombosis. *International journal of molecular medicine*, 40(4), 1019–1028. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3105>
- Kurz, K. D., Main, B. W., & Sandusky, G. E. (1990). Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. *Thrombosis research*, 60(4), 269–280. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(90\)90106-m](https://doi.org/10.1016/0049-3848(90)90106-m)

- Li, H., Zhang, B., Lu, S., Ji, D. G., Ding, M., Ye, Y. S., & Sun, D. J. (2019). siRNA-mediated silencing of PAI-1 gene acts as a promoter over the recanalization of endothelial progenitor cells in rats with venous thrombosis. *Journal of cellular physiology*, 234(11), 19921–19932. <https://doi.org/10.1002/jcp.28590>
- Liu, H., Li, P., Lin, J., Chen, W., Guo, H., Lin, J., Liu, J., Lu, Z., Yao, X., Chen, Y., & Lin, B. (2019). Danhong Huayu Koufuye prevents venous thrombosis through antiinflammation via Sirtuin 1/NF- κ B signaling pathway. *Journal of ethnopharmacology*, 241, 111975. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.111975>.
- Myers, D. D., Jr, Henke, P. K., Wroblewski, S. K., Hawley, A. E., Farris, D. M., Chapman, A. M., Knipp, B. S., Thanaporn, P., Schaub, R. G., Greenfield, L. J., & Wakefield, T. W. (2002). P-selectin inhibition enhances thrombus resolution and decreases vein wall fibrosis in a rat model. *Journal of vascular surgery*, 36(5), 928–938. <https://doi.org/10.1067/mva.2002.128636>.
- Nakata, N., & Kira, Y. (2016). Effects of Preoperative Glycyrrhizin Infusion for the Prevention of Venous Thrombosis on the Tissue Expression of Antithrombin in a Rat Model. *Annals of vascular diseases*, 9(2), 95–101. <https://doi.org/10.3400/avd.0a.16-00009>.
- Pazzini, C., Marcato, P. D., Prado, L. B., Alessio, A. M., Höehr, N. F., Montalvão, S., Paixão, D., Durán, N., & Annichino-Bizzacchi, J. M. (2015). Polymeric Nanoparticles of Enoxaparin as a Delivery System: In Vivo Evaluation in Normal Rats and in a Venous Thrombosis Rat Model. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 15(7), 4837–4843. <https://doi.org/10.1166/jnn.2015.9816>
- Prado, L. B., Huber, S. C., Barnabé, A., Bassora, F. D. S., Paixão, D. S., Duran, N., Annichino-Bizzacchi, J. M. (2017) Characterization of PCL and Chitosan Nanoparticles as Carriers of Enoxaparin and Its Antithrombotic Effect in Animal Models of Venous Thrombosis. *Journal of Nanotechnology*, 1-7, <https://doi.org/10.1155/2017/4925495>
- Parry, T. J., Huang, Z., Chen, C., Connelly, M. A., Perzborn, E., Andrade-Gordon, P., & Damiano, B. P. (2011). Arterial antithrombotic activity of rivaroxaban, an orally active factor Xa inhibitor, in a rat electrolytic carotid artery injury model of thrombosis. *Blood coagulation & fibrinolysis: an international journal in haemostasis and thrombosis*, 22(8), 720–726. <https://doi.org/10.1097/MBC.0b013e32834cb30e>
- Peternel, L., Drevensek, G., Cerne, M., Stalc, A., Stegnar, M., & Budihna, M. V. (2005). Evaluation of two experimental venous thrombosis models in the rat. *Thrombosis research*, 115(6), 527–534. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2004.10.007>.
- Reyers, I., Mussoni, L., Donati, M. B., & de Gaetano, G. (1980). Failure of aspirin at different doses to modify experimental thrombosis in rats. *Thrombosis research*, 18(5), 669–674. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(80\)90221-2](https://doi.org/10.1016/0049-3848(80)90221-2).
- Saitoh, M., Kaku, S., Funatsu, T., Koshio, H., Ishihara, T., Hirayama, F., Kawasaki, T., Sasamata, M. (2007). Comparison of YM50, an Oral, Direct Factor Xa Inhibitor, with Other Antithrombotic Agents in Rodent Venous and Arterial Thrombosis Models. *Blood*, 110(11):3155. <https://doi.org/10.1182/blood.V110.11.3155.3155>
- Schoenwaelder, S. M., & Jackson, S. P. (2015). Ferric chloride thrombosis model: unraveling the vascular effects of a highly corrosive oxidant. *Blood*, 126(24): 2652-2653. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-09-668384>.
- Sood, V., Luke, C., Miller, E., Mitsuya, M., Upchurch, G. R., Jr, Wakefield, T. W., Myers, D. D., & Henke, P. K. (2010). Vein wall remodeling after deep vein thrombosis: differential effects of low molecular weight heparin and doxycycline. *Annals of vascular surgery*, 24(2), 233–241. <https://doi.org/10.1016/j.avsg.2009.11.002>
- Tien, A. J., Chueh, T. H., Hsia, C. P., & Chien, C. T. (2016). Monascus Adlay and Monacolin K Attenuates Arterial Thrombosis in Rats through the Inhibition of ICAM-1 and Oxidative Stress. *Kidney & blood pressure research*, 41(6), 815–827. <https://doi.org/10.1159/000452584>
- van Giezen, J. J., Berntsson, P., Zachrisson, H., & Björkman, J. A. (2009). Comparison of ticagrelor and thienopyridine P2Y₁₂ binding characteristics and antithrombotic and bleeding effects in rat and dog models of thrombosis/hemostasis. *Thrombosis research*, 124(5), 565–571. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2009.06.029>.
- von Brühl, M. L., Stark, K., Steinhart, A., Chandraratne, S., Konrad, I., Lorenz, M., Khandoga, A., Tirmiceriu, A., Coletti, R., Köllnberger, M., Byrne, R. A., Laitinen, I., Walch, A., Brill, A., Pfeiler, S., Manukyan, D., Braun, S., Lange, P., Riegger, J., Ware, J., Massberg, S. (2012). Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *The Journal of experimental medicine*, 209(4), 819–835. <https://doi.org/10.1084/jem.20112322>.
- Xin, G., Wei, Z., Ji, C., Zheng, H., Gu, J., Ma, L., Huang, W., Morris-Natschke, S. L., Yeh, J. L., Zhang, R., Qin, C., Wen, L., Xing, Z., Cao, Y., Xia, Q., Li, K., Niu, H., Lee, K. H., & Huang, W. (2017). Xanthohumol isolated from *Humulus lupulus* prevents thrombosis without increased bleeding risk by inhibiting platelet activation and mtDNA release. *Free radical biology & medicine*, 108, 247–257. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.018>.
- Wakefield, T. W., Wroblewski, S. K., Sarpa, M. S., Taylor, F. B., Jr, Esmon, C. T., Cheng, A., & Greenfield, L. J. (1991). Deep venous thrombosis in the baboon: an experimental model. *Journal of vascular surgery*, 14(5), 588–598. <https://doi.org/10.1067/mva.1991.32030>.
- Wang, X., Cheng, Q., Xu, L., Feuerstein, G. Z., Hsu, M. Y., Smith, P. L., Seiffert, D. A., Schumacher, W. A., Ogletree, M. L., & Gailani, D. (2005). Effects of factor IX or factor XI deficiency on ferric chloride-induced carotid artery occlusion in mice. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, 3(4), 695–702. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01236.x>.
- Wang, X., Smith, P. L., Hsu, M. Y., Ogletree, M. L., & Schumacher, W. A. (2006). Murine model of ferric chloride-induced vena cava thrombosis: evidence for effect of potato carboxypeptidase inhibitor. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, 4(2), 403–410. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.01703.x>.
- Wong, P. C., Watson, C. A., Crain, J. E., Luetgten, J. M., Ogletree, M. L., Wexler, R. R., Lam, P. Y. S., Pinto, D. J., Knabb, R. M. (2006). Effects of the Factor Xa Inhibitor Apixaban on Venous Thrombosis and Hemostasis in Rabbits. *Blood*, 108 (11): 917. <https://doi.org/10.1182/blood.V108.11.917.917>.
- Wong, P. C., Crain, E. J., Xin, B., Wexler, R. R., Lam, P. Y., Pinto, D. J., Luetgten, J. M., & Knabb, R. M. (2008). Apixaban, an oral, direct and highly selective factor Xa inhibitor: in vitro, antithrombotic and antihemostatic studies. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, 6(5), 820–829. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.02939.x>.
- Zhou, J., May, L., Liao, P., Gross, P. L., & Weitz, J. I. (2009). Inferior vena cava ligation rapidly induces tissue factor expression and venous thrombosis in rats. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 29(6), 863–869. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.185678>.