

Estudo da Morfologia Estrutural do Triplo Stent in Vitro¹

GUTENBERG DO AMARAL GURGEL²

Chefe do Serviço de cirurgia vascular do Hospital Angiovascular
Natal (RN), Brasil

GUILHERME BENJAMIN BRANDÃO PITTA

Professor adjunto da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas
(UNCISAL), orientador do doutorado Renorbio - Rede Nordeste de
Biotecnologia e orientador do Mestrado e Doutorado em Cirurgia da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

VINÍCIUS LADEIA SEMENZIM

Coodenador de Laboratório – Braile Biomédica, São José do Rio Preto (SP)

GLAUCIA GRAZIELLI BASSO FRAZZATO

Coordenadora de Pesquisa – Braile Biomédica, São José do Rio Preto (SP)

ADAMASTOR HUMBERTO PEREIRA

Professor Adjunto da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto
Alegre (RS); Brasil

MAURÍCIO DE AMORIM AQUINO

Mestre em Cirurgia, UFRGS, Porto Alegre, RS. Chefe do Serviço de Cirurgia
Vascular do Hospital Santa Izabel/ Santa Casa de Misericórdia Bahia

SVETLANA MARIA WANDERLEY DE BARROS

Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas, Faculdade de
Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre,
RS, Brasil, médica veterinária da Universidade Estadual de Ciências da
Saúde de Alagoas (UNCISAL)

ROSANE PEREIRA DOS REIS

Doutora em Biotecnologia pelo Programa de Doutorado em Biotecnologia –
Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) pela Universidade Federal de
Alagoas –UFAL

Abstract

Stent porosity is very important for its flow modulating action. Recent studies have shown that stent porosity is related to the effectiveness of reducing intraaneurysm alacder flow. This study aimed to determine the morphology (porosity, flexibility and thickness) of the

¹ Study of Structural Triple Stent Morphology in Vitro

² Corresponding author: gutenberg.angiovascular@gmail.com

triple stent when randomly positioned in vitro. This is an experimental in vitro study and a Laboratory of Tests and Trials of Braille Biomédica, São José do Rio Preto, SP - Brazil, and in the Pathology Laboratory of the Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, RN - Brazil was carried out. The results of this study showed that the characteristics are inversely proportional, that is, by adding a stent mesh, the porosity of the stent is significantly reduced. We conclude that the porosity of the triple and double stent is 60% and 69% respectively, on average, and is within the ideal standards for flow modulator. The single stent has an average of 81%, not compatible with this purpose.

Keywords: Triple Stent, Aneurysm, Structural morphology.

Resumo

A porosidade do stent é muito importante para sua ação moduladora de fluxo. Estudos recentes têm demonstrado que a porosidade do stent está relacionada com eficácia da redução do fluxo no saco intraaneurisma. Este estudo teve por objetivo determinar a morfologia (porosidade, flexibilidade e espessura) do triplo stent quando posicionado de forma aleatória in vitro. Trata-se de estudo experimental in vitro e foi realizada Laboratório de Testes e Ensaios da Braille Biomédica, São José do Rio Preto, SP – Brasil, e no Laboratório de Patologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, RN – Brasil. Os resultados desse estudo mostraram que as características são inversamente proporcionais, ou seja, ao acrescentar uma malha de stent, diminui-se significativamente a porosidade do stent. Concluímos que a porosidade do triplo e duplo stent é de 60% e 69% respectivamente, na média, e está dentro dos padrões ideais para modulador de fluxo. O único stent apresenta uma média 81%, não compatível com para este fim.

Palavras-Chaves: Triplo Stent, Aneurisma, Morfologia estrutural.

INTRODUÇÃO

Stents moduladores de fluxo (SMF), vem sendo utilizados no tratamento de aneurismas cerebrais, aórtico, viscerais e periféricos, como abordagem alternativa a cirurgias abertas e endovasculares

tradicionais. Este fato consiste, que estes stents, proporcionam a modulação do fluxo intraaneurisma, com redução da velocidade no vórtex do mesmo, formando trombo na periferia, mantendo o fluxo laminar no meio do stent com preservação dos seus ramos.

A porosidade do stent é muito importante para sua ação moduladora de fluxo. Estudos recentes têm demonstrado que a porosidade do stent está relacionada com eficácia da redução do fluxo no saco intraaneurisma (Augsburger 2009). A redução excessiva da porosidade, pode acarretar em diminuição significativa do fluxo nos ramos colaterais do aneurisma, resultando na oclusão e no risco para os órgãos por eles irrigados (Tang 2013).

O primeiro stent modulador de fluxo foi descrito, na década de 90 por Geremia et al, quando sugeriu que a porosidade reduzida do stent, colocado intraaneurisma, como ponte, alteraria o padrão de fluxo, promovendo a formação de trombo e conseqüentemente sua exclusão (Geremia et al. 1994). A partir desta publicação, vários estudos culminaram com o desenvolvimento de stents dedicados a modular o fluxo intraaneurisma. Os mais estudados foram os stents para aneurismas cerebrais, como: Silk (Balt Extrusion; França); Pipeline (Covidien; Estados Unidos) Surpass (Stryker; Estados Unidos) (Gandhi 2014, Bouillot 2016). Estes stents estão aprovados para o tratamento de aneurisma cerebral com a cobertura de óstios de ramos dos aneurismas. Estudos experimentais, tem sugerido que a porosidade é o fator mais importante para redução do fluxo dentro do aneurisma, com uma porosidade ótima ente 60-76% (Gandhi 2014).

Mas recentemente, em 2012, surgiu o stent modulador de Fluxo multicamadas (MFM), com indicação para tratar os aneurismas periféricos, viscerais e da aorta (Henry 2013). O MFM é composto por 2 a 5 camadas de fios de cobalto, dependendo do seu diâmetro e indicação terapêutica. É produzido em várias configurações e tipos de fenestrações (retangulares, quadradas, losangos). A sua porosidade, a qual está alicerçada seu mecanismo de ação, é entre 60 e 65% (Oliveira et al. 2013).

A técnica da aplicação do triplo stent oferece a mesma sistemática de remodelamento do fluxo sanguíneo (Aquino 2012). Utiliza stent auto-expansível de nitinol, com as fenestrações em losango, na qual é utilizado três stents um dentro do outro. O triplo

stent tem sido utilizado como alternativa para o tratamento de aneurisma da aorta desde 2012 (Pitta 2012). Contudo, ainda não se sabe qual é a porosidade média, quando aplicação dos stents, visto que a sua justaposição é aleatória ao implanta-los. Desta forma o objetivo deste estudo é determinar a morfologia (porosidade, flexibilidade e espessura) do triplo stent quando posicionado de forma aleatória in vitro.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo experimental *in vitro* e foi realizada Laboratório de Testes e Ensaio da Braile Biomédica, São José do Rio Preto, SP – Brasil, e no Laboratório de Patologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, RN – Brasil.

Os stents de nitinol utilizados no experimento foram fabricados pela empresa Braile Biomédica (Brasil), com sistema de liberação over the wire, tipo auto-expansível. O stent apresenta um design de células fechadas, com tranças de monofilamento em forma tubular, formando losangos (diamond shape), com marcas radiopacas proximais e distais em ouro.

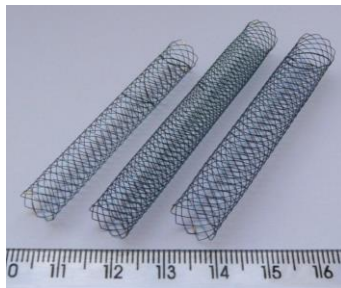


Fig. 1: Stents de diferentes diâmetros utilizados para o procedimento

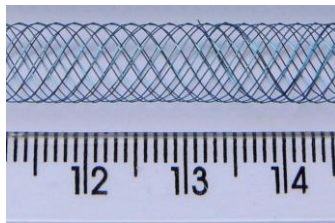
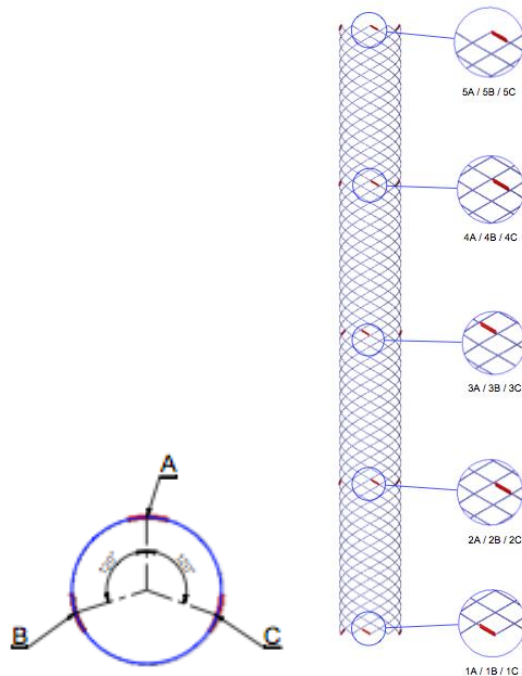


Fig. 2: Stent com células fechadas em forma de losangos (diamond shape)

Avaliamos os stents de três formas: quanto a porosidade, flexibilidade e espessura. O estudo foi da mesma sistemática nos grupos: G1 com um stent; G2 com dois stents e G3 com três stents. Para não apresentar viés na coleta das imagens de cada grupo, para definição da porosidade, padronizamos que os grupos G2 e G3 teriam 9 coletas de imagens de acordo com esquema abaixo:



As 03 marcas de ouro na parte proximal e distal dos stents: A, B e C demarcam a posição longitudinal que fizemos 03 imagens. Uma no meio do stent; outra no meio entre o meio e a porção distal do stent e uma terceira entre o meio e a porção proximal do stent. Realizamos rotação horária do stent ate a segunda marca B ficar na posição mais alta do stent, com o mesmo protocolo anterior, foram adquiridas as tres imagens nesta posição. Mas uma rotação horária e a porção C, em posição superior, adquirido tres novas imagens. Totalizamos em um unico stent (duplo ou triplo) 9 imagens que fizemos a média, a qual foi a medida do stent estudado. Para cada grupo realizamos 30 coletas de imagens, sendo que no grupo de duplo e triplo stent foram 270 coletas.

Os histogramas de quantificação dos pixels e as medidas da dimensão fractal foram realizadas utilizando o software ImageJ (Image Processing and Analysis in Java), versão 1.49. Foram analisadas imagens de microscopia de luz dos stents (Microscópio Biológico Trinocular Olympus BX43, Aumento: 4x), em três grupos: (G1) apenas um stent; (G2) dois stents e (G3) três stents.

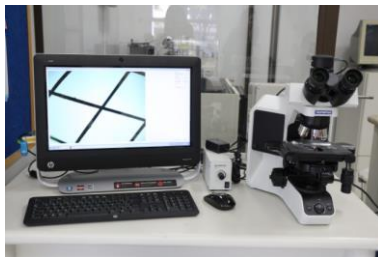


Fig. 3: Grupo G1 – 1 stent

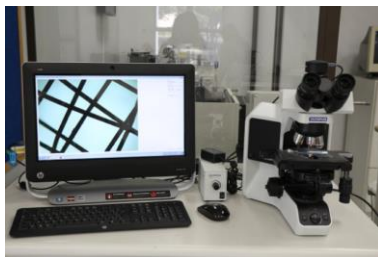


Fig. 4: Grupo G2 - 2 stents

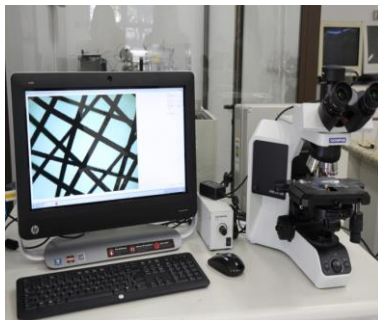


Fig. 5: Grupo G3 - 3 stents

As imagens foram binarizadas, com tons de cinza variando entre 0 (preto) e 255 (branco). Depois disso, as cores foram invertidas, ficando

0 (branco) e 255 (preto), e então calculados os histogramas. As curvas para determinação da dimensão fractal foram geradas pelo método de Box-Couting, um dos métodos mais conhecidos e utilizados para estimar a dimensão fractal de uma forma ou imagem, pela sua simplicidade de implementação. Esse método consiste em cobrir a imagem ou objeto a ser analisado com quadrados de lados r e contar o número de quadrados $N(r)$ necessários para cobrir toda a forma. O contorno fractal foi feito para as regiões escuras da imagem, cobertas com caixas quadradas de dimensões entre 2 e 64 pixels (2, 3, 4, 6, 8, 12, 16, 32 e 64 pixels).

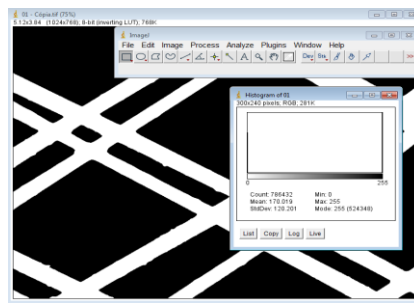


Fig. 6: Binarizada – 02 stents

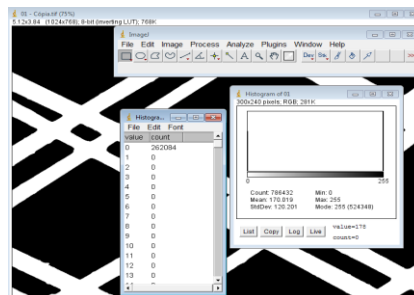


Fig. 7: Histograma – 02 stents

A espessura foi coletada por paquímetro eletrônico calibrado. O teste de flexibilidade e espessura foram realizados com 30 aferições em cada grupo. Sendo verificado nas posições de 90°, 180° e em forma de “S” (de acordo com norma de teste do Laboratório Braile Biomédica).

Os dados foram coletados numa planilha de dados eletrônica (Microsoft ExcelR 2013. Redmond, WA, EUA). Na análise estatística foram calculados os seguintes valores: as médias, mediana, os desvios-

padrão e medidas máximas e mínimas em cada grupo. Para a comparação das médias e dos desvios-padrão, aplicou-se análise de variância (Anova) e como teste de comparação das médias dos grupos aplicamos o teste de Tukey com a utilização de software SPSS (versão 20.0, IBM Corporation, New York, EUA). O nível de significância para todos os testes foi fixado em $\alpha = 0,05$, considerando o intervalo de confiança de 95%.

Na avaliação inicial da normalidade foram utilizados os testes de Kolgomorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Em ambos os testes, a variável porosidade não apresentou normalidade, quando estratificada por grupo. Mesmo não sendo um pressuposto restritivo à ANOVA, optou-se pela transformação logarítmica dos dados. Após essa transformação, os dados da variável porosidade atenderam os pressupostos de Normalidade e igualdade das variâncias entre os grupos (Homocedasticidade). A variável espessura atendeu os pressupostos.

RESULTADOS

Porosidade

Tabela 1 - Estatísticas descritivas e testes estatísticos da porosidade, por tipo de stent.

Variável	Tipo de stent			P-valor ¹
	Simple	Duplo	Triplo	
Porosidade (%) ²	80,69 ± 0,65 ^a	67,86 ± 1,15 ^b	59,87 ± 0,88 ^c	<0,001 ²

Média ± Desvio padrão

1 – P-valor da Análise de variância (ANOVA);

2 – Valores na linha, seguidos de letras diferentes, apresentam diferença estatisticamente significativa pelo Teste de comparações múltiplas de Tukey.

Para a porosidade (Tabela 1), as características são inversamente proporcionais, ou seja, ao acrescentar uma malha de stent, diminui-se significativamente a porosidade do stent. Sendo assim, o stent triplo apresentou porosidade menor que o duplo e simples. E o duplo foi menor que o simples (Figura 8).

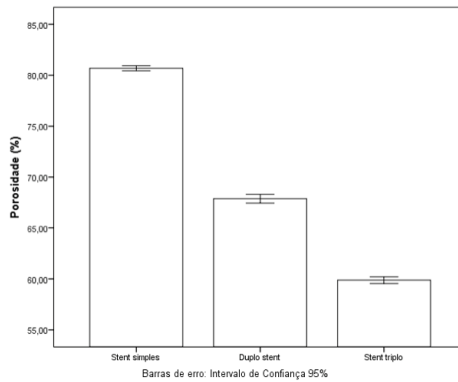


Fig. 8: Gráfico de barra com intervalo de confiança das medidas de porosidade, por tipo de stent.

Espessura

Tabela 2 - Estatísticas descritivas e testes estatísticos da espessura, por tipo de stent.

Variável	Tipo de stent			P-valor ¹
	Simple	Duplo	Triplo	
Espessura (mm) ²	0,28 ± 0,01 ^a	0,43 ± 0,01 ^b	0,56 ± 0,01 ^c	<0,001

Média ± Desvio padrão

1 – P-valor da Análise de variância (ANOVA);

2 – Valores na linha, seguidos de letras diferentes, apresentam diferença estatisticamente significativa pelo Teste de comparações múltiplas de Tukey.

É possível observar na Tabela 2 que o stent triplo apresentou uma maior espessura que os demais grupos, e tal diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$). Sendo o stent duplo com a segunda maior espessura, seguida do stent simples. Isso demonstra que, quanto mais stents estiverem sobrepostos, maior será sua espessura. E, ao acrescentar uma malha, o aumento na espessura já se tornará significativo.

Flexibilidade

Foram aferidos de cada grupo, com comprovação fotográfica:

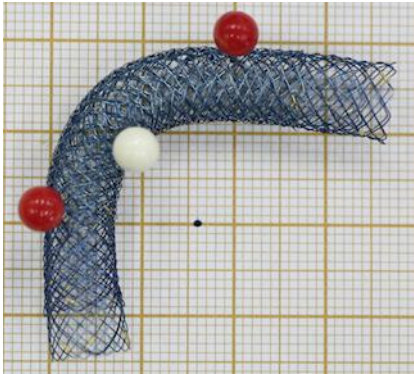


Fig. 9: Flexibilidade Angulo de 90° - 03 stents

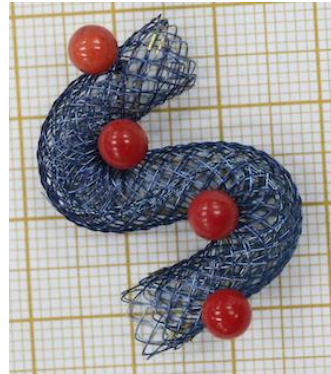


Fig. 10: Flexibilidade Angulo de 180° - 03 stents

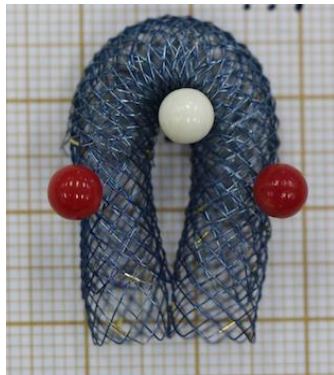


Fig. 11: Flexibilidade - 03 stents

DISCUSSÃO

A concepção de stent moduladores de fluxo, se baseia na porosidade e forma das células do stent, permitindo a passagem do fluxo do sangue para áreas nobres, diminuindo a tensão na parede do vaso e formação de trombo no saco aneurismático (Oliveira et al. 2016). O mecanismo de ação dos moduladores de fluxo, consiste em promover a diminuição velocidade do vortex que tem no aneurisma, causando a formação de trombo na parede arterial, sem obstruir os ramos nele contidos. Este mecanismo ainda não está bem esclarecido (Oliveira et al 2013).

Em estudos experimentais, demonstraram que a mudança no fluxo de velocidade máxima no aneurisma e a diminuição stress da parede, estão relacionados com a variação da porosidade do stent.

Quanto menor a porosidade maior os efeitos sobre a velocidade e o stress da parede (Oliveira et al. 2016). Mas o limite de diminuição da porosidade também é importante, visto que, se a porosidade for muito baixa, os ramos contidos no aneurisma podem ocluir. Benndorf et al. 2003 utilizou stents sobrepostos e sugeriu que a redução significativa dentro do aneurisma é causada pela redução da porosidade, provavelmente causando a trombose do aneurisma.

Os stents modulares do fluxo (SMF) devem possuir estrutura, com células fechadas, com a forma de retângulo, losango ou quadrado e a sua porosidade média ideal entre 60-76% (Lee 1999). Os SMF utilizados pela neurocirurgia, para tratamento dos aneurismas cerebrais têm a porosidade entre 45% e 70% (Gandhi 2014) e os de aorta e periférico dependendo do número de fios utilizados na sua construção 60% a 65% de porosidade (Carditis).

Cabe destacar que o uso de stents em doenças vasculares se mostra, por fim, um campo cada vez mais promissor e mais repleto de inovações, fazendo com que esse tratamento se torne um método cada vez mais seguro e eficaz. Portanto o triplo stent é uma técnica inovadora que foi criada com o objetivo de diminuir a porosidade e possibilitar a correção de aneurismas complexas e manter os ramos viscerais prévios.

CONCLUSÃO

Concluimos que a porosidade do triplo e duplo stent é de 60% e 69% respectivamente, na média, e está dentro dos padrões ideais para modulador de fluxo. O único stent apresenta uma média 81%, não compatível com para este fim.

REFERÊNCIAS

1. Aquino M. 2012. “Gradiente de pressão na correção endovascular do aneurisma da aorta em suínos com triplo stent”. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
2. Benndorf, R. et al. 2003. “Angiotensin II type 2 receptor inhibits vascular endothelial growth factor-induced migration and in vitro tube formation of human endothelial cells”. *Circ Res* 93: 438–47.
3. Bouillot, P. et al. 2016. “Virtual-versus-Real Implantation of Flow Diverters: Clinical Potential and Influence of Vascular Geometry”. *American Journal of Neuroradiology* 37, no. 11 (june): 1-8.

4. Augsburger, L. et al. Hemodynamical effects of Cardiatis braided stents in sidewall aneurysm silicone models using PIV. Disponível em: <http://www.cardiatis.com/images/stories/info/etude%20luca%20in%20vitro.pdf>.
5. Geremia, G. et al. 1994. "Embolization of experimentally created aneurysms with intravascular stent devices". *AJNR Am J Neuroradiol.* 15, no. 7:1223-31.
6. Henry, M. et al. 2013. "The multilayer flow modulator stent for the treatment of arterial aneurysms". *J Cardiovasc Surg (Torino)* 54, no.6 (Dec):763-83.
7. Pitta, G. B. B. et al. 2012. "Stents em tripla camada no tratamento endovascular do aneurisma de aorta abdominal em expansão". *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 27, no. 1:123-4.
8. Oliveira, A. F. M. L. et al. 2013. "Stent Multilayer – a new alternative in the treatment of Aneurysms, Literature Review". *Cadernos UniFOA* 8, no. 1 (abril): 95-100.
9. Oliveira, J. R. et al. 2016. "Alterações do padrão do fluxo sanguíneo após tratamento endovascular do aneurisma sacular da aorta abdominal com triplo stent: modelo em suínos". *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões* 43, no. 3 (may-june): 154-159.
10. TANG, A. Y-S. et al. 2013. "The effects of stent porosity on the endovascular treatment of intracranial aneurysms located near a bifurcation". *J. Biomedical Science and Engineerin,* 6, no. 8 : 812-822.
11. Lee, T. H. et al. 1999. "Derivation and prospective validation of a simple index for prediction of cardiac risk of major noncardiac surgery". *Circulation.* 100, no. 10:1043-9.