

Tratamento de trombose intravascular com ultra-som de baixa freqüência e microbolhas

Low frequency ultrasound and intravenous microbubbles for the treatment of acute intravascular thrombi

Jeane Mike TSUTSUI¹, Wilson MATHIAS JR², Feng XIE³, John LOF⁴, José Antônio Franchini RAMIRES⁵, Thomas R. PORTER⁶

RESUMO

Introdução: Estudos experimentais têm demonstrado que ultra-som terapêutico (UST) de baixa freqüência e microbolhas (MB) podem ser utilizados para dissolver trombos intravasculares. Recentemente, novas modalidades de imagem de ultra-som diagnóstico (USD) que utilizam baixo índice mecânico foram desenvolvidas e permitem a detecção de pequenas quantidades de MB, sem causar sua destruição. Assim, a monitoração das MB dentro do trombo com USD tem o potencial de otimizar o processo de trombólise com UST. **Objetivo:** Estudar o valor do UST+ MB na recanalização de trombos arteriais e o papel do USD na otimização do tratamento em modelo experimental. **Métodos:** Em modelo canino de trombose de enxerto arteriovenoso agudo, foram aplicados três tipos randomizados de tratamento: MB injetadas por via endovenosa com aplicação de UST (1 MHz) guiada pelo USD para determinar o momento de maior concentração de MB no trombo (n=12), MB injetadas por via endovenosa com aplicação de UST não guiada (n=6), e aplicação de UST sem MB (controle, n=6). O sucesso do tratamento foi definido como fluxo escore 3 no enxerto pela angiografia. **Resultados:** Sucesso do tratamento foi maior no grupo MB+UST+USD que nos demais grupos (p<0,01). A recanalização angiográfica dos trombos ocorreu em 17% no grupo controle, 33% no grupo MB+UST sem USD, e 92% no grupo MB+UST+USD ao final dos 45 minutos de tratamento. **Conclusão:** UST+MB parece ser efetivo para dissolver trombos, quando a visibilização de MB no trombo é guiada com USD. Este método pode ser uma alternativa ao uso de trombolítico sistêmico para tratamento de trombose intravascular.

Descritores: Microbolhas; Ultra-som terapêutico; Terapia trombolítica.

SUMMARY

Background: It has been demonstrated by experimental studies that low-frequency therapeutic ultrasound (TUS) and microbubbles (MB) are able to recanalize intravascular thrombi. The recent development of low-mechanical index techniques which are sensitive enough to image even small number of MB with minimal destruction offers the potential for detecting and quantifying MB within the thrombus. **Objective:** In this study we sought to determine the effectiveness of diagnostic ultrasound (DUS) guidance in improving the effectiveness of TUS and MB for the treatment of deeply located acute intravascular thrombi using an experimental model. **Methods:** In a canine arteriovenous graft occluded by thrombus, three group of treatments were randomized: intravenous MB and TUS (1 MHz) applied when simultaneous DUS indicated a sustained presence of MB (n=12), intravenous MB and TUS applied intermittently without the guidance of DUS (n=6), and intravenous saline and TUS applied intermittently (control group, n=6). Success was defined as return of rapid flow within the graft (grade 3 flow by angiography). **Results:** Success was higher in the group who received MB+TUS+DUS than the other groups (p<0.01). Angiographic clearance of thrombus and restoration of grade 3 flow at 45 minutes of treatment were seen in 17% of grafts in control group, 33% in the group who received MB+TUS without guidance, and 92% in the group who received MB+TUS+DUS. **Conclusion:** The use of TUS with intravenous MB seems effective for dissolving intravascular thrombi when performed with DUS guidance. This may be an alternative method for the treatment of deep venous thromboses.

Descriptos: Microbubbles; Therapeutic Ultrasound; Thrombolytic Therapy.

Instituição:
Instituto do Coração - HC/FMUSP

Correspondência:
Jeane Mike Tsutsui
Instituto do Coração (InCor), Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo
Av. Dr. Enéas Carvalho Aguiar, 44 - CEP: 05403-900
Fone: (011) 3069-5646 / Fax: (011) 3069-5646
E-mail: jeane.tsutsui@incor.usp.br

Recebido em: 05/05/2006 - Aceito em: 25/08/2006

- 1 - Doutora em Cardiologia pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), Médica Supervisora do Serviço de Ecocardiografia – InCor, Médica Colaboradora da Equipe de Cardiologia do Laboratório Fleury.
- 2 - Professor Livre-Docente de Cardiologia pela Faculdade de Medicina da USP, Diretor do Serviço de Ecocardiografia do InCor.
- 3 - Faculty of Cardiology Department - University of Nebraska Medical Center.
- 4 - Director of Experimental Laboratory of the University of Nebraska Medical Center
- 5 - Professor Titular da Disciplina de Cardiologia da Faculdade de Medicina da USP, Diretor da Divisão Clínica do Instituto do Coração- InCor.
- 6 - Director of the Echocardiography Laboratory, Professor of Medicine - University of Nebraska Medical Center, Omaha, Nebraska, USA.

Introdução

A abrupta formação de trombo intravascular é o mecanismo fisiopatológico de uma série de quadros clinicamente importantes, como as síndromes coronárias agudas, acidente vascular cerebral, e trombose venosa profunda. Embora a terapia trombolítica ou recanalização mecânica são atualmente utilizadas para tratamento destas condições, sua eficácia, disponibilidade e segurança ainda não são ideais. Portanto, novas abordagens terapêuticas para o tratamento não invasivo de vasos trombados podem ser de grande valor.

Já foi demonstrado que ultra-som terapêutico (UST) de baixa frequência (1MHz) e microbolhas (MB) são capazes de recanalizar trombos intravasculares^{1,2}. Embora o mecanismo exato da dissolução ainda seja desconhecido, este parece estar relacionado a aceleração axial de fluidos decorrente da ruptura de microbolhas^{3,4}. Um ponto que limita a aplicação deste tratamento na prática clínica é que a efetividade do UST e MB é reduzida na presença de condições de atenuação⁵. Recentemente, técnicas de ultra-som diagnóstico (USD) que utilizam baixa energia ultra-sônica têm sido desenvolvidas, e permitem a detecção de pequeno número de MB dentro dos vasos sem causar sua destruição. Esta técnica possui o potencial para detectar e quantificar MB dentro do trombo. O objetivo deste estudo foi determinar o valor do USD para otimizar o tratamento de trombo intravascular utilizando UST e MB.

Método

Preparação Animal

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Uso de Animais da Universidade de Nebraska. Um cão pesando 27 Kg foi submetido a implante cirúrgico de enxerto arteriovenoso sob anestesia geral usando acepromazine 0,5 mg/kg intramuscular seguido de isoflurano 1,2-3,0%. Um enxerto de hemodiálise de 6 mm de diâmetro e 25 cm de extensão (Gore-Tex; W.L. Gore & Associates, Flagstaff, AZ) foi implantado entre a artéria femoral e veia femoral bilateralmente, em forma de alça. Após 4 semanas do implante, repetidos processos de trombose foram induzidos no mesmo enxerto (total de 24

oclusões). Para isto, o cão era anestesiado uma vez por semana, a pele sobre o enxerto era esterilizada e uma cânula de 4-Fr era inserida por via percutânea na porção proximal do enxerto. Angiografia usando Iohexol 300 (Ominipaque 300, Nycomed Princeton, NJ) era realizada para caracterizar patência do enxerto. Então, uma sutura dupla com fio cirúrgico era feita no enxerto para produzir trombose do mesmo. Após um período médio de 4 horas, a sutura era removida e a oclusão trombótica confirmada pela angiografia e pelo Doppler (Siemens Acuson Sequoia; Mountain View, CA), como visto na (*Figura 1*).

Sistema de Ultra-Som Terapêutico

O UST usado neste estudo foi um sistema comercialmente disponível (Richmar Electronic Corp., Downer's Grove, IL), com transdutor de 1 MHz. A intensidade usada foi de 10 W/cm² no modo pulsado. Para reproduzir as condições de atenuação de ultra-som, geralmente encontradas na prática clínica, uma prótese mimetizando o tecido humano de 6 cm de espessura confeccionada pela Computerized Imaging Reference Systems, Inc (Norfolk, VA) foi colocada sobre o local do enxerto. Esta prótese atenua o ultra-som numa taxa de 0,49 dB/cm/MHz⁵.

Sistema de Ultra-Som Diagnóstico

A avaliação do trânsito de MB dentro do enxerto arteriovenoso trombado foi realizada utilizando-se um transdutor linear de 7 MHz equipado com modalidade de imagem com baixo índice mecânico (Siemens Acuson Sequoia; Mountain View, CA). O índice mecânico utilizado foi de 0,2. O transdutor do USD foi posicionado sobre a pele na porção média do enxerto, e perpendicular ao UST, para monitorar a presença e localização das MB no enxerto ocluído. Quando as MB atingiam o enxerto, o UST foi aplicado para destruí-las, e após esta destruição, aguardava-se o repreenchimento do enxerto pelas MB para nova aplicação.

Infusão de MB

As MB utilizadas neste estudo foram MB de lipídeo (MRX-815, ImaRx Therapeutics, Inc.; Tuc-

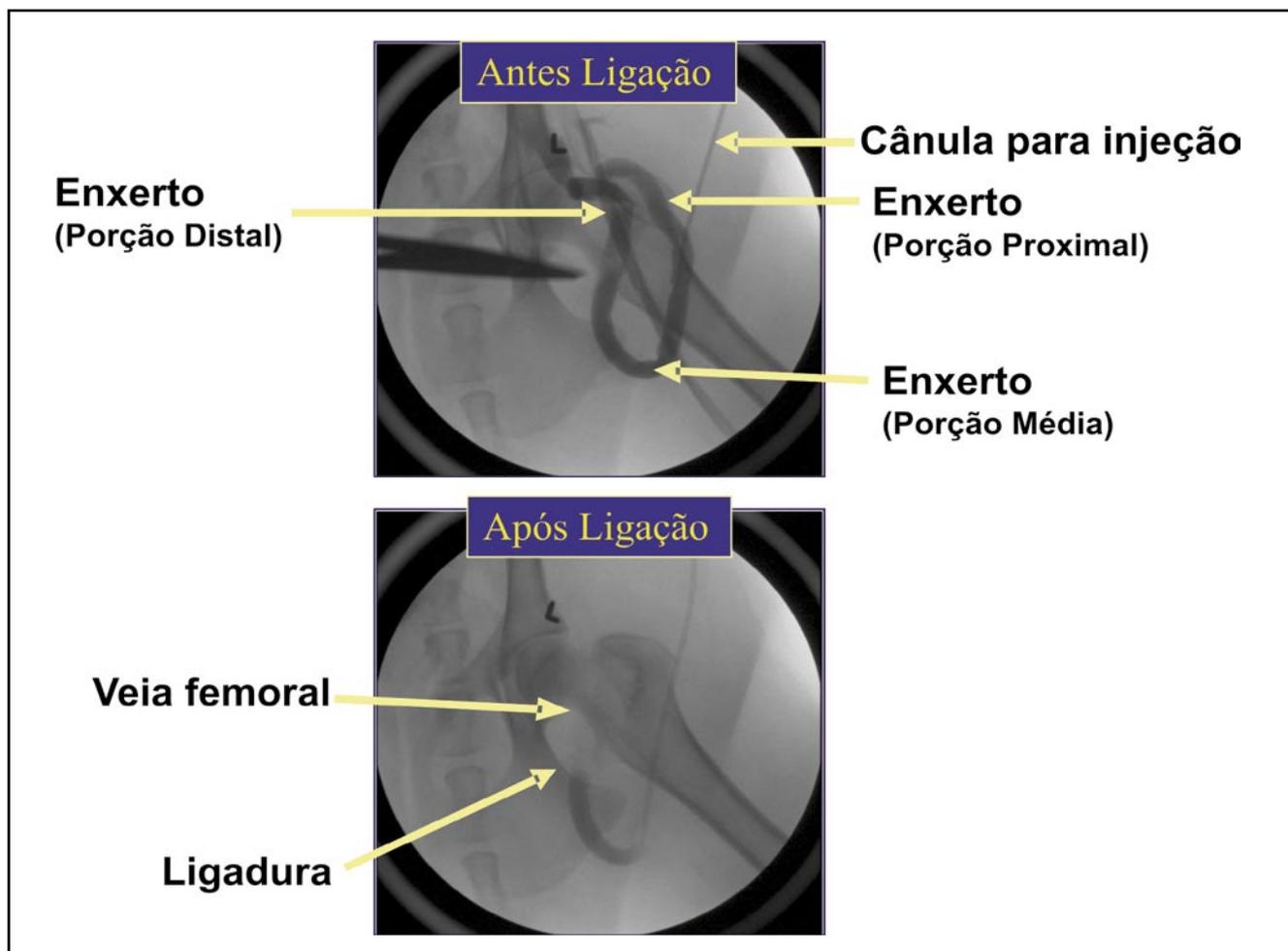


Figura 1 Angiograma do enxerto arteriovenoso utilizado no modelo experimental. Antes da ligação o enxerto era testado pela angiografia, mostrando preenchimento total pelo contraste em suas porções proximal, média e distal (painel superior). Após a ligação (painel inferior) ocorria formação de trombo com ausência de fluxo no enxerto e acúmulo de contraste somente no local da injeção (ponta da cânula de injeção).

son, AZ), injetadas por via endovenosa de forma contínua. O tamanho médio das MB foi de $1,0 \pm 0,1$ microns e a concentração foi de $1,5-3,0 \times 10^{10}/\text{ml}$. A infusão foi preparada diluindo-se 2 ml de MRX815 em 100 ml de solução salina, e administrada na taxa de 1,8 ml/min por 45 minutos.

Protocolo de Estudo

Após a confirmação da oclusão, um dos três tratamentos eram randomizados: MB por via endovenosa com aplicação de UST guiada pelo USD (grupo MB+UST+USD), MB por via endovenosa com aplicação de UST não guiada por USD (grupo MB+UST), e salina por via endovenosa com aplicação de UST não guiada por USD (UST somente). Todos os tratamentos foram realizados durante 45 minutos. Angiografias para verificar a patência do enxerto foram repetidas com 6, 12, 20, 25, 30, 40 e 45 minutos de tratamento. Escores

de fluxo foram utilizados para caracterizar sucesso angiográfico dos tratamentos. A ausência de fluxo visível foi caracterizada como fluxo 0 (zero). Fluxo além do local do trombo, porém sem preencher completamente o enxerto com desaparecimento lento do contraste, foi caracterizado como fluxo 1; fluxo além do local do trombo que completava completamente o enxerto porém com desaparecimento lento do contraste, foi caracterizado como fluxo 2; e fluxo completando todo o enxerto com rápido desaparecimento do contraste foi caracterizado como fluxo 3^{1,2,5}. O sucesso do tratamento foi definido como fluxo 3 no enxerto. Um escore de patência também foi dado para as porções proximal, média e distal do enxerto, sendo considerado escore 0 quando não havia evidência de enchimento angiográfico do enxerto pelo contraste, escore 1 quando havia menos de 30% de enchimento do lúmen, escore 2 quando havia enchimento de 31 a

70% do lúmen, escore 3 quando havia enchimento de 71 a 90% do lúmen e, finalmente, escore 4 quando havia mais de 90% de enchimento do lúmen.

Ao final do procedimento, qualquer trombose residual no enxerto foi removida manualmente com massagem ou mecanicamente com dilatação por balão, sendo que o enxerto não foi usado novamente por um período mínimo de 3 dias.

Análise Estatística

Dados quantitativos foram expressos como média \pm desvio padrão. O teste de Mann-Whitney foi usado para comparar os escores de fluxo entre os grupos estudados. O teste qui-quadrado foi usado para comparar as diferenças de proporções de enxertos que atingiram escore 3 aos 20, 30 e 45 minutos de tratamento. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

Vinte e quatro oclusões agudas foram estudadas, 12 receberam MB + UST + USD, 6 receberam MB + UST e 6 receberam somente UST. A duração média da oclusão do enxerto antes de iniciar o tratamento foi de $4,4 \pm 0,5$ horas.

Terapia com UST guiada pelo USD

A avaliação com USD permitiu detectar MB dentro do enxerto em tempo-real, sendo que MB puderam ser visibilizadas formando pequenos canais dentro do trombo mesmo antes de qualquer evidência angiográfica de fluxo (*Figura 2*). Foi detectada também alteração na velocidade de trânsito das MB durante o tratamento, de forma que o enchimento do enxerto após a aplicação do UST era mais rápido nas fases mais tardias do tratamento. A (*Figura 3*) é um exemplo de mudança no re-preenchimento do enxerto pelas MB, em função do tempo de tratamento.

Recanalização dos Enxertos Ocluídos

O sucesso de tratamento nos três grupos nos diferentes intervalos de tempo são apresentados na (*Tabela 1*). A recanalização angiográfica dos trombos ocorreu em 17% no grupo controle, 33% no

grupo MB+UST, e 92% no grupo MB+UST+USD ao final dos 45 minutos de tratamento ($p < 0,001$ comparado com os outros dois grupos). O escore de patência no final do tratamento foi maior no grupo que recebeu MB + UST + USD que nos demais grupos (*Figura 4*).

Discussão

Embora alguns estudos tenham demonstrado a eficácia de MB e UST para recanalizar trombos intravasculares agudos quando o ultra-som é aplicado diretamente sobre o vaso ocluído^{1,2}, a atenuação do ultra-som pode limitar a eficácia deste tratamento para trombos localizados mais profundamente. Estudos recentes têm demonstrado que o sucesso da terapia com MB e UST diminui de 83% para 43% ($p < 0,05$) quando uma prótese que mimetiza as condições de atenuação do tecido humano é utilizada entre o UST e o vaso trombosado⁵.

No presente estudo, nós demonstramos que a visibilização simultânea das MB com USD pode ser utilizada para melhorar a eficácia da trombólise com UST e MB, mesmo na presença de condições de atenuação. Nossos principais achados são que as MB podem ser vistas transitando através de pequenos canais dentro do trombo antes de qualquer evidência angiográfica de fluxo. Segundo, a visibilização de MB com USD como indicador de quando aplicar o UST resulta em recanalização mais rápida e eficaz do enxerto.

As oscilações não-lineares das MB induzidas pelo ultra-som podem causar aceleração axial de fluido, resultando em formações de microjatos e gradientes de alta velocidade na superfície do trombo⁴. Estudos in vitro demonstraram que estes jatos penetram no trombo e levam a sua fragmentação⁶. Para que este efeito seja mais efetivo, é necessário que as MB estejam presentes dentro do vaso ocluído, levando à desestabilização da infraestrutura do trombo. O rápido crescimento e colapso das MB dentro do trombo pode gerar perfurações no mesmo que levam a sua dissolução por um efeito mecânico.

Culp e colaboradores demonstraram a eficácia de MB e UST para dissolver trombos em enxertos arteriovenosos em modelo animal, usando injeções

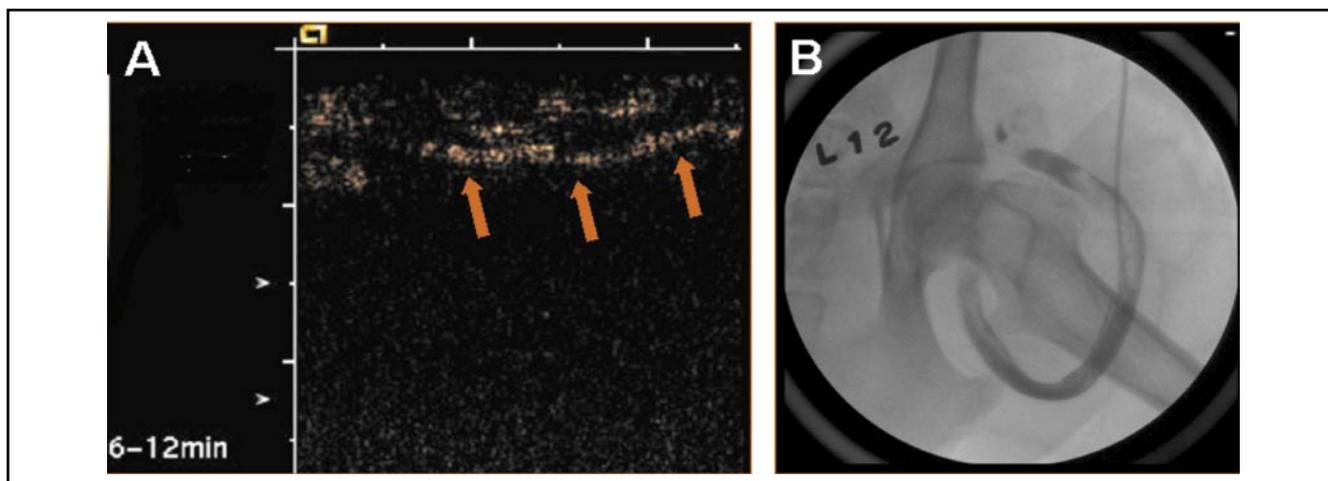


Figura 2 Imagem obtida com ultra-som diagnóstico utilizando baixo índice mecânico demonstrando a presença de microbolhas dentro do enxerto formando pequenos canais (painel A, setas) mesmo quando o enxerto encontrava-se totalmente ocluído pela angiografia (painel B).

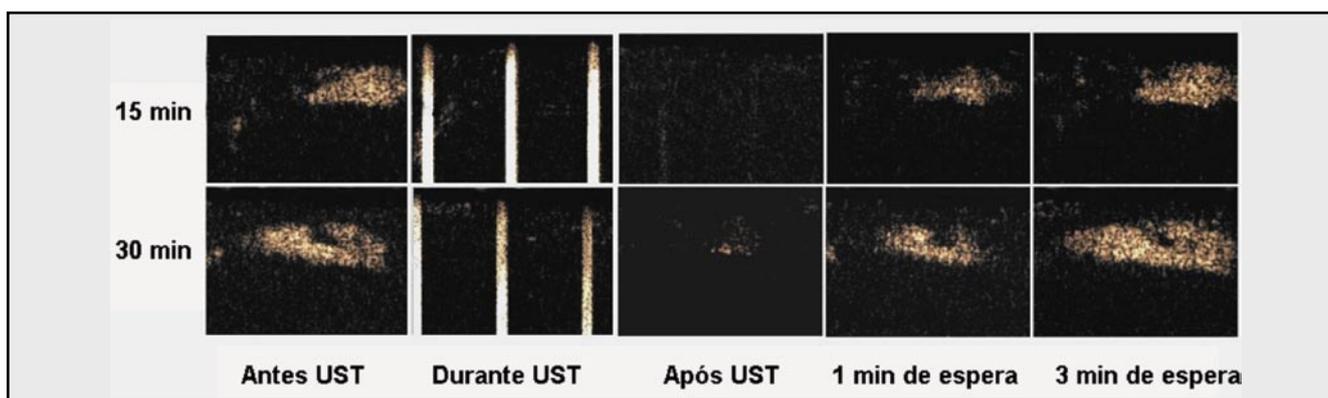


Figura 3 . Seqüência de imagens obtidas com ultra-som diagnóstico do enxerto arteriovenoso antes da aplicação do ultra-som terapêutico (UST), durante sua aplicação, e após a sua aplicação demonstrando o preenchimento do enxerto pelas microbolhas. Note que durante a aplicação ocorre a presença de linhas verticais na imagem devido a interferência pelo UST. Aos 15 minutos de tratamento (painel superior) o preenchimento pelas microbolhas ocorre mais lentamente que aos 30 minutos (painel inferior).

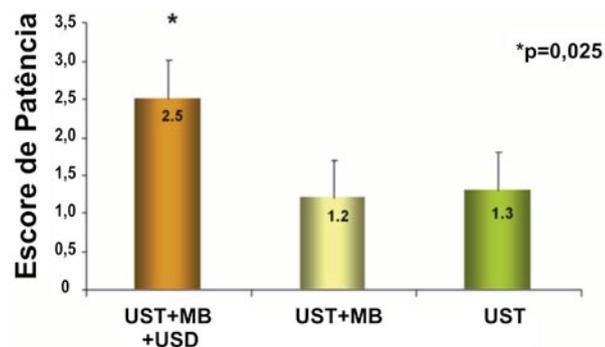


Figura 4 Escore de patência ao final dos 45 minutos de tratamento obtido pela análise do enchimento do lúmen pelo contraste angiográfico nas porções proximal, média e distal do enxerto angiográfico nos três grupos randomizados. MB = microbolhas; USD = ultra-som diagnóstico; UST= ultra-som terapêutico.

Tempo de tratamento	MB + UST + USD	MB + UST	UST somente
20 minutos	33%	0%	0%
30 minutos	58%*	0%	0%
45 minutos	92%*	33%	17%

Tabela 1 Taxa de sucesso com os diferentes tipos de tratamento * p<0,05 comparado com os demais grupos

de microbolhas de albumina diretamente no interior do trombo¹. Entretanto, as mesmas doses de MB injetadas por via endovenosa periférica atingiram taxa de sucesso em torno de 40%. Uma vez que o ultra-som foi aplicado em curtos intervalos

diretamente sobre o enxerto, uma grande quantidade de MB pode ter sido destruída antes mesmo de atingir o interior do trombo. Portanto, a taxa de sucesso foi a mesma observada em nosso estudo usando UST e MB sem a orientação de aplicação

pelo USD. A visibilização do trânsito de MB dentro do trombo com uma modalidade de imagem altamente sensível para detectar mesmo pequenas quantidades de MB dentro do vaso permitiu um melhor entendimento do tempo necessário para aplicação do UST durante o tratamento. Quando limitamos a aplicação do UST apenas quando o USD demonstra máximo enchimento do enxerto pelas MB, otimizamos o efeito mecânico e atingimos taxa de recanalização semelhante ao obtido com aplicação direta de MB dentro do enxerto, mesmo em condições de atenuação.

Limitações do Estudo

Embora o índice mecânico utilizado para a realização das imagens com USD tenha sido muito baixo (0,2) não podemos eliminar a possibilidade de efeitos de insonação na melhora da dissolução de trombo no grupo que recebeu MB + UST + USD. Não se espera que o efeito de oscilação induzido pelo transdutor de 7 MHz produza dissolução de trombo, porém, este efeito não foi medido e não pode ser descartado completamente.

A avaliação simultânea com USD e UST torna-se difícil uma vez que utilizamos dois transdutores diferentes. O futuro desenvolvimento de transdutores combinando ambas as tecnologias tem o potencial de facilitar o conceito de terapia ultrassônica guiada pela diagnóstica.

Conclusões

No presente estudo demonstramos que a taxa de sucesso de UST e MB injetadas por via endovenosa, mesmo na presença de condições de atenuação, pode ser otimizada com a utilização de USD para guiar a aplicação. O tratamento dos enxertos com MB e UST guiado pelo USD atingiu taxa de recanalização de 92%, e tem o potencial de ser usado em protocolos clínicos para tratamento de oclusão arterial e trombose venosa profunda.

Referências

1. Culp WC, Porter TR, Xie F, Guertzen TC, McCowan TC, Vonk BN et al. Microbubble potentiated ultrasound as a method of declotting thrombosed dialysis grafts: experimental study in dogs. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2001; **24**: 407-12.
2. Culp WC, Porter TR, McCowan TC, Roberson PK, James CA, Matchett W et al. Microbubble-augmented ultrasound declotting of thrombosed arteriovenous dialysis grafts in dogs. *J Vasc Interv Radiol.* 2003; **14**: 343-7.
3. Tachibana K, Tachibana S. Albumin microbubble echo-contrast material as an enhancer for ultrasound accelerated thrombolysis. *Circulation.* 1995; **92**: 1148-50.
4. Porter TR, Xie F. Ultrasound, microbubbles, and thrombolysis. *Progr Cardiovasc Dis.* 2001; **44**: 101-10.
5. Xie F, Tsutsui J, Lof J, Unger EC, Johannig J, Culp WC et al. Effectiveness of lipid microbubbles and ultrasound in declotting thrombosis. *Ultrasound Med Biol.* 2005; **31**: 979-85.
6. Kodama T, Tatsuno M, Sugimoto S, Uenohara H, Yoshimoto T, Takayama K. Liquid jets, accelerated thrombolysis: a study for revascularization of cerebral embolism. *Ultrasound Med Biol.* 1999; **25**: 977-83.