



## American Journal of Cardiology Research and Reviews (DOI:10.28933/AJCRAR)



# INDUCTION OF EXPERIMENTAL TROMBOSES IN ANIMAL MODEL

Arthur Hipólito Pereira Leite<sup>1\*</sup>, Adriana Maria da Silva Telles<sup>2</sup>, Ana Lúcia Figueiredo Porto<sup>3</sup>

### ABSTRACT

**Introduction:** In vivo studies, related to thrombosis, allow a better understanding of the biological behavior of molecules with thrombolytic properties. **Goal:** To evaluate the methodological characteristics as well as the efficacy of thrombosis induced by the association of the blood stasis method and ferric chloride (FeCl<sub>3</sub>). **Methodology:** Review of published literature on the topic "Experimental thrombosis". This search was performed in the Pubmed, ScieceDirect, Scielo and Google Academic databases, by crossing the following descriptors: Thrombosis, Fibrinolytics and Cardiovascular Diseases. Articles, dissertations and theses written in Portuguese and English were selected without delimitation of the date of publication. **Results:** National and international studies have shown that the induction of thrombosis, by association of the methods mentioned above, is simple, cheap and reproducible. In addition, this combination of techniques allows adequate mimicking of the thrombogenic characteristics observed in humans. **Conclusion:** Studies in biological models are essential for understanding the mechanisms involved in thrombotic disorders.

**Keywords:** Cardiovascular diseases, Fibrinolytics, Thrombosis.

### \*Correspondence to Author:

Arthur Hipólito Pereira Leite

### How to cite this article:

Arthur Hipólito Pereira Leite, Adriana Maria da Silva Telles, Ana Lúcia Figueiredo Porto. INDUCTION OF EXPERIMENTAL TROMBOSES IN ANIMAL MODEL. American Journal of Cardiology Research and Reviews, 2019, 2:8

 **eSciPub**  
eSciPub LLC, Houston, TX USA.  
Website: <https://escipub.com/>

## INTRODUCTION

Cardiovascular diseases (CVD) represent one of the major causes of morbidity and mortality worldwide, characterizing the leading cause of death in Brazil, accounting for approximately 30% of deaths in different age groups. This prevalence is expected until 2020, leading to higher spending on medical services offered by the Unified Health System (SUS) (1). Thrombosis plays an important role in the pathogenesis of various cardiovascular diseases due to the accumulation of clots that block the passage of blood flow. These clots are formed through the conversion of fibrinogen to fibrin by the proteolytic action of thrombin (2). One of the therapeutic treatments offered to improve the survival of patients with thrombotic events is the intravascular administration of thrombolytic agents, which are currently in clinical use for dissolution of thrombi, particularly in cardiac blood vessels (3). These drugs are used to reestablish blood flow after an acute coronary occlusion, contributing to the clinical improvement of the patient (3). Despite their intense use, many of the fibrinolytic agents have some disadvantages such as short half-life, allergic reactions, low fibrin specificity, high cost, restricted sources and hemorrhagic complications, especially in the gastrointestinal tract (2). Thus, studies with experimental animals act as a tool capable of simulating the mechanisms involved in the genesis of thrombotic processes, contributing to the elucidation of these mechanisms, as well as to studies that aim at new therapeutic strategies for this pathology.

### Objective

The present proposal has as its main objective to evaluate the methodological characteristics as well as the efficacy of thrombosis by vascular injury induced by Ferric Chloride (FeCl<sub>3</sub>).

## METHODOLOGY

This work is characterized as a literature review, searching for scientific studies that focused on experimental FeCl<sub>3</sub>-induced thrombosis. An

extensive search was performed in the Pubmed, Science Direct, Scielo, and Google Scholar databases using the descriptors Thrombosis, Fibrinolytics, and Cardiovascular Diseases. As inclusion criteria were selected researches in rats and / or mice that performed thrombosis through chemical injury. We selected articles published in journals, dissertations and theses, published in Portuguese and / or English. There were no restrictions regarding the period of publication.

## RESULTS

Based on the studies available in the literature, several models for rodent thrombosis induction are observed. The most studied and reproduced model is based on the reduction of blood flow promoted by vascular stasis. This model, initially proposed by Reyers et al. In 1980 (4), promotes thrombosis through vascular ligation using silk threads. With stasis, blood flow is reduced, promoting the activation of blood clotting factors and consequently thrombus development. This method has been adapted over time, adapting to the specific objectives and methodologies adopted in each work. To improve the sensitivity and standardization of this technique, other models are associated with the ligation method, improving its reproducibility. The method of chemical injury by using Ferric Chloride (FeCl<sub>3</sub>) is one such model that promotes vascular thrombosis through endothelial injury and consequent exposure of collagen to blood coagulation factors. The interaction of these elements promotes thrombus formation and consequently reduction of vascular lumen (5). One of the benefits of this model is that different FeCl<sub>3</sub> concentrations generate lesions of different levels and, consequently, variable time of blood vessel occlusion. Thus, with the establishment of FeCl<sub>3</sub> concentration and application time, the technique has been reproducible. This model is simple and sensitive to antithrombotic drugs, which is why it is chosen as a model for several studies aimed at elucidating the genesis and treatment of thrombosis. The technique consists in the

deposition of filter paper, soaked with FeCl<sub>3</sub> on the vase, for a few minutes. Vascular injury is due to the ability of ferric chloride to penetrate the vascular wall, causing endothelial cell denudation and endothelium exposure, along with collagen fibers (6). Thus, there is activation of coagulation factors, resulting in thrombus formation and subsequent growth of the neointimal layer. In this model, the occlusion time is considered as the time from the beginning of the vascular lesion until the complete occlusion of the vessel through the interruption of blood flow, which can be measured by a Doppler flow measurement equipment (5).

## CONCLUSIONS

Among the models used for thrombosis induction, the FeCl<sub>3</sub> induction method stands out for its methodological practicality, considerable sensitivity and specificity, and is a low cost procedure. These factors contribute to a standardization of thrombus formation and consequently to the reproducibility of this method, being the most used technique in experimental thrombosis studies.

## References

1. Ruppert A, Lees M, Steinle T. Clinical burden of venous thromboembolism. *Current Medical Research and Opinion*, v. 26, n. 10, 2010.
2. Zhang X, Yun L, Peng L. Optimization of Douchi fibrinolytic enzyme production by statistical experimental methods. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical sciences*, v. 33, n. 1, 2013.
3. Raafata AL, Arabyb E, Lotfy S. Enhancement of fibrinolytic enzyme production from *Bacillus subtilis* via immobilization process onto radiation synthesized starch/dimethylaminoethyl methacrylate hydrogel. *Carbohydrate Polymers*, v.87, 2012.
4. Reyes I, Mussoni L, Donatti MB, Gaetano G. Failure of aspirin at different doses to modify experimental thrombosis in rats. *Thrombosis Research*, v. 18, n. 5, 1980.
5. Misra A, Prakash P, Aggarwal H. Anti-thrombotic efficacy of S007-867: pre-clinical evaluation in experimental models of thrombosis in vivo and in vitro. *Biochemical Pharmacology*, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.01.013>, 2018.

6. Yoshida WB. Tratamento convencional da trombose venosa profunda proximal: ainda uma boa opção? *Jornal Vascular Brasileiro*, v. 15, n. 1, 2016.



## RESUMO

**Introdução:** Estudos *in vivo*, relacionados à trombose, possibilitam um maior entendimento do comportamento biológico de moléculas com propriedades trombolíticas. **Objetivo:** Avaliar as características metodológicas, bem como a eficácia da trombose induzida pela associação do método de estase sanguínea e cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ). **Metodologia:** Revisão da literatura de trabalhos publicados com o tema “Trombose experimental”. A referida busca foi realizada nos bancos de dados Pubmed, ScieceDirect, Scielo e Google Acadêmico, mediante o cruzamento dos seguintes descritores: Trombose, Fibrinolíticos e Doenças cardiovasculares. Foram selecionados artigos, dissertações e teses escritos na língua portuguesa e inglesa, sem delimitação da data de publicação. **Resultados:** Estudos nacionais e internacionais demonstram que a indução da trombose, mediante associação dos métodos referidos acima, mostra-se simples, barata e reprodutível. Além disso, essa combinação de técnicas permite a mimetização adequada das características trombogênicas observadas em humanos. **Conclusão:** Estudos em modelos biológicos são imprescindíveis para a compreensão dos mecanismos envolvidos nas desordens trombóticas.

**Palavras-chaves:** Doenças cardiovasculares, Fibrinolíticos, Trombose.

## INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) representam uma das maiores causas de morbimortalidade em todo mundo, caracterizando a principal causa de morte no Brasil, sendo responsáveis por aproximadamente 30% dos óbitos nos diferentes grupos etários. Esta prevalência é esperada até o ano de 2020, acarretando um maior gasto em serviços médicos oferecidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (1). A trombose desempenha um importante papel na patogênese de diversas doenças cardiovasculares, devido ao acúmulo de coágulos que bloqueiam a passagem do fluxo

sanguíneo. Esses coágulos são formados através da conversão do fibrinogênio em fibrina, pela ação proteolítica da trombina (2). Um dos tratamentos terapêuticos oferecidos com o intuito de melhorar a sobrevida dos pacientes acometidos com eventos trombogênicos é a administração intravascular de agentes trombolíticos, que estão atualmente em uso clínico para a dissolução de trombos, em particular nos vasos sanguíneos cardíacos (3). Essas drogas são utilizadas para o reestabelecimento do fluxo sanguíneo após a ocorrência de uma oclusão coronariana aguda, contribuindo para a melhora clínica do paciente (3). Apesar do seu intenso uso, muitos dos agentes fibrinolíticos apresentam algumas desvantagens como uma meia-vida curta, reações alérgicas, baixa especificidade pela fibrina, elevado custo, fontes restritas e complicações hemorrágicas, principalmente no trato gastrointestinal (2). Assim, estudos realizados com animais experimentais, atuam como uma ferramenta capaz de simular os mecanismos envolvidos na gênese dos processos trombóticos, contribuindo para a elucidação desses mecanismos, bem como para estudos que objetivem novas estratégias terapêuticas para essa patologia.

## OBJETIVO

A presente proposta apresenta como objetivo central avaliar as características metodológicas, bem como a eficácia da trombose mediante lesão vascular, induzida por Cloreto Férrico ( $\text{FeCl}_3$ ).

## METODOLOGIA

Esse trabalho caracteriza-se como uma revisão da literatura, mediante busca de trabalhos científicos que apresentassem foco na trombose experimental, induzida por  $\text{FeCl}_3$ . Foi realizada uma extensa busca nos bancos de dados Pubmed, Science Direct, Scielo e Google Acadêmico, mediante utilização dos descritores Trombose, Fibrinolíticos e Doenças cardiovasculares. Como critérios de inclusão foram selecionados pesquisas em ratos e/ou camundongos que realizassem trombose por

meio de lesão química. Foram selecionados artigos publicados em periódicos, dissertações e teses, publicados em português e/ou inglês. Não houve restrições em relação ao período de publicação.

## RESULTADOS

Com base nos trabalhos disponíveis na literatura, observam-se diversos modelos para indução da trombose em roedores. O modelo mais estudado e reproduzido é o baseado na redução do fluxo sanguíneo, promovido pela estase vascular. Esse modelo, proposto inicialmente por Reyers e colaboradores em 1980 (4), promove a trombose por meio de ligadura vascular, mediante utilização de fios de seda. Com a estase, o fluxo sanguíneo é reduzido, promovendo a ativação dos fatores de coagulação sanguínea e consequentemente o desenvolvimento do trombo. Esse método sofreu adaptações ao longo do tempo, se adequando aos objetivos e metodologias específicas adotadas em cada trabalho. Para melhorar a sensibilidade e a padronização dessa técnica, outros modelos são associados ao método de ligadura, melhorando a sua reprodutibilidade. O método de lesão química, mediante uso de Cloreto Férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) é um desses modelos, que promove a trombose vascular por meio da lesão endotelial e consequente exposição do colágeno aos fatores de coagulação sanguínea. A interação desses elementos promove a formação do trombo e consequentemente redução da luz vascular (5). Um dos benefícios desse modelo é que diferentes concentrações de  $\text{FeCl}_3$  geram lesões de níveis diferentes e, consequentemente tempo variável de oclusão do vaso sanguíneo. Assim, com o estabelecimento da concentração de  $\text{FeCl}_3$  e do tempo de aplicação, a técnica tem se mostrado reprodutível. Este modelo é simples e sensível às drogas antitrombóticas, motivo pelo qual é escolhido como modelo para diversos estudos, que objetivam elucidar a gênese e o tratamento da trombose. A técnica consiste na deposição de papel filtro, embebido com  $\text{FeCl}_3$  sobre o

vaso, por alguns minutos. A lesão vascular é devida a capacidade do cloreto férrico de penetrar a parede vascular, causando desnudação de células endoteliais e exposição do endotélio, juntamente com as fibras de colágeno (6). Com isso, há ativação dos fatores de coagulação, resultando na formação do trombo e posterior crescimento da camada neoíntima. Neste modelo o tempo de oclusão é considerado como o tempo ocorrido após início da lesão vascular até a completa oclusão do vaso através da interrupção do fluxo sanguíneo, que pode ser medido por um equipamento de aferição de fluxo do tipo Doppler (5).

## CONCLUSÕES

Dentre os modelos utilizados para indução da trombose, o método de indução pelo  $\text{FeCl}_3$  destaca-se por apresentar praticidade metodológica, considerável sensibilidade e especificidade, além de ser um procedimento de baixo custo econômico. Esses fatores contribuem para uma padronização da formação do trombo e consequentemente para a reprodutibilidade desse método, sendo a técnica mais utilizada nos trabalhos de trombose experimental.

## REFERÊNCIAS

1. Ruppert A, Lees M, Steinle T. Clinical burden of venous thromboembolism. *Current Medical Research and Opinion*, v. 26, n. 10, 2010.
2. Zhang X, Yun L, Peng L. Optimization of Douchi fibrinolytic enzyme production by statistical experimental methods. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical sciences*, v. 33, n. 1, 2013.
3. Raafata AL, Arabyb E, Lotfy S. Enhancement of fibrinolytic enzyme production from *Bacillus subtilis* via immobilization process onto radiation synthesized starch/dimethylaminoethyl methacrylate hydrogel. *Carbohydrate Polymers*, v.87, 2012.
4. Reyes I, Mussoni L, Donatti MB, Gaetano G. Failure of aspirin at different doses to modify experimental thrombosis in rats. *Thrombosis Research*, v. 18, n. 5, 1980.
5. Misra A, Prakash P, Aggarwal H. Anti-thrombotic efficacy of S007-867: pre-clinical evaluation in experimental models of thrombosis in vivo and in vitro. *Biochemical Pharmacology*, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.01.013>, 2018.

6. Yoshida WB. Tratamento convencional da trombose venosa profunda proximal: ainda uma boa opção? *Jornal Vascular Brasileiro*, v. 15, n. 1, 2016.