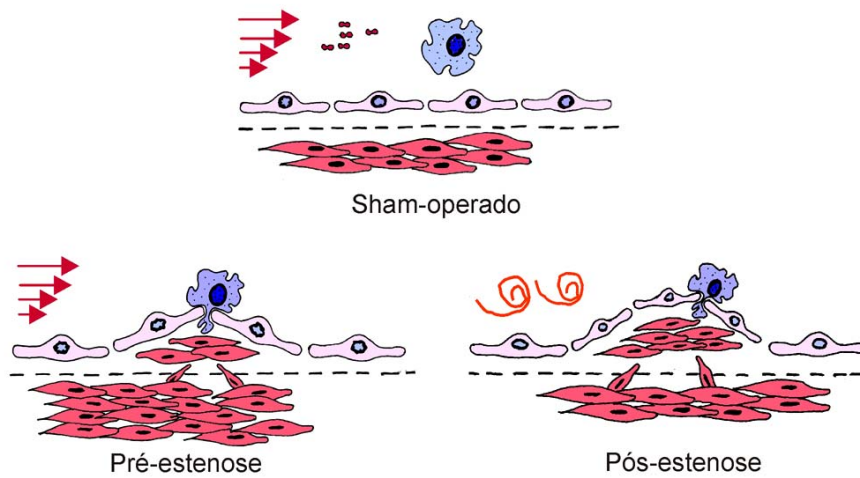


CIBELE MARIA PRADO

Estiramento ou fluxo turbilhonar e baixa tensão de cisalhamento influem diferentemente no remodelamento aórtico em ratos



CIBELE MARIA PRADO

**Estiramento ou fluxo turbilhonar e baixa tensão de
cisalhamento influem diferentemente no remodelamento
aórtico em ratos**

Tese apresentada ao Departamento de Patologia da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Patologia.

Área de Concentração: Patologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Marcos A. Rossi

Ribeirão Preto
2006

Prado, Cibele Maria

Estiramento ou fluxo turbilhonar e baixa tensão de cisalhamento influem diferentemente no remodelamento aórtico em ratos. Ribeirão Preto, 2006.

113 p. : il. ; 28cm

Tese de Doutorado, apresentada ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Área de concentração: Patologia Experimental.

Orientador: Rossi, Marcos Antonio.

1. Hipertensão
2. Tensão de cisalhamento na parede
3. Fluxo turbilhonar
4. Aterosclerose
5. Remodelamento arterial

FOLHA DE APROVAÇÃO

Cibele Maria Prado

Estiramento ou fluxo turbilhonar e baixa tensão de cisalhamento influem diferentemente no remodelamento aórtico em ratos.

Tese apresentada ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Patologia.

Área de Concentração: Patologia Experimental

Banca Examinadora

Prof. Dr. Marcos A. Rossi

Instituição: FMRP/USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha

Instituição: FMRP/USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. José Antonio Marin Neto

Instituição: FMRP/USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Vera Demarchi Aiello

Instituição: InCor/FMUSP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Paulo José Ferreira Tucci

Instituição: Unifesp –EPM

Assinatura: _____

Dedico este Trabalho

Aos meus pais ***Djalma O. Prado e Conceição Ap. Greve***

Que independente das dificuldades, nunca mediram esforços para que seus filhos pudessem ter o que a vida não lhes proporcionou. Com amor e dedicação sempre me apoiaram na minha formação e nas minhas decisões. Obrigada por tudo.

Aos meus irmãos ***Marcelo E. Prado, Cíntia M. Prado e Simone M. Prado***

Pelos momentos de descontração, conversas e brincadeiras. Mesmo nos vendo pouco, vocês não saem do meu coração.

À minha querida vó ***Olga Greve***

Mesmo sendo de outra geração, sempre nos estimulou a estudar. Tem um frase famosa: “Seu marido é o seu diploma!!!”.

Ao meu namorado ***Edson Zinni***

“... Por toda a verdade que você me fez enxergar, por toda a alegria que trouxe à minha vida, por tudo de errado que fez tornar-se correto e por todo o amor que encontrei em você...”.

Agradecimento Especial

Prof. Dr. Marcos A. Rossi

A você, que me ensinou a dar os primeiros passos nas atividades de pesquisa, minha gratidão pela orientação segura, dedicação e amizade. Pelo privilégio de tê-lo como meu “mestre”, compartilhando seus conhecimentos durante a realização desse trabalho.

“...As pessoas que deixam marcas em nossa alma são aquelas que vão fazer nossa vida seguir em frente..”

Agradecimentos

À Profa Dra. **Simone G. Ramos**, pela indispensável participação neste trabalho e também pelas proveitosas conversas durante as cirurgias. E as famosas pérolas...

Ao Prof. Dr. **Fernando Q. Cunha** por permitir o uso de seu laboratório para as avaliações da pressão sanguínea.

Ao Prof. Dr. **Jorge Elias Júnior** por ter realizado o ultrassom com doppler colorido.

Às amigas de laboratório: **Cristina T. Beneli**, por ser sempre muito amiga e estar ao meu lado; **Mara Rúbia N. Celes**, pela amizade, companheirismo e por sempre estar disposta a ajudar; **Érica C. Campos**, por ter me ajudado durante a minha grave crise alérgica e também por ser minha companheira de “sela”; **Gisele Faria**, pela amizade e companhia; **Andiara De Rossi**, pela amizade e proveitosas conversas durante nossas viagens e ao amigo **Lenaldo B. Rocha** (“bendito o fruto entre as mulheres”) pela amizade e proveitosas conversas. E as recém-chegadas amigas do laboratório de Patologia Pulmonar: **Cristiane Tefé da Silva**, pelas agradáveis conversas e conselhos, **Marcela Oliveira**, **Karina Mata** e **Daniella Nunes** pela amizade e agradáveis conversas após o almoço.

Ao amigo **José Carlos Alves-Filho (Zeca)**, por ter me ajudado nas avaliações da pressão arterial, muitas vezes, até altas horas.

À querida amiga **Priscila de Freitas Barbosa**, que mesmo não estando mais aqui, sempre me recordo e tenho saudades.

À **Lígia G.V.B. Santoro**, técnica do laboratório de Patologia Cardiovascular, pelo auxílio técnico no processamento do material para microscopia eletrônica de transmissão e varredura e microscopia óptica de alta resolução. Além disso, foi uma grande amiga e conselheira para assuntos aleatórios.

À **Maria Elena Riul**, técnica do laboratório de Patologia Cardiovascular, pelo auxílio técnico no processamento do material para microscopia óptica comum e colorações especiais. Obrigado pela amizade e por sempre estar disposta a ajudar.

À **Mônica A. Abreu**, técnica do laboratório de Patologia Cardiovascular, pelo auxílio técnico no processamento do material para microscopia eletrônica de transmissão, microscopia óptica de alta resolução e imunoistoquímica. Obrigada pela amizade, jantares “maravilhosos” e agradáveis momentos de descontração.

À **Elaine Medeiros Floriano**, técnica do laboratório de Patologia Pulmonar, pelo auxílio técnico no processamento do material para microscopia óptica comum sempre que necessitei. Obrigada pela valiosa amizade e por sempre se oferecer a ajudar em qualquer situação.

Aos funcionários e ex-funcionários do Biotério, **Paulo H. da Silva, Maria Ap. Apolinário Caetano (Cida), Ivone P. da Silva, Luciana G.A. Campanini** por cuidar dos nossos animais com tanto carinho. **D. Ivone e Cida**, vocês são inesquecíveis...

Às secretárias do Departamento de Patologia, **Neide T. Gonçalves, Rosângela M.C. de Paula, e Edna P. Silva** pelos serviços prestados, dedicação, apoio, informações e tempo que me dispensaram. Embora não mais presente aqui, meus agradecimentos à **Regina Mara C.F. Bueno**.

A **todos os amigos pós-graduandos do Departamento de Patologia** pelos agradáveis momentos durante as festas de confraternização.

À **Rose e D. Eunice**, ex-funcionárias da limpeza, pela amizade, convívio e momentos de descontração. Às novas funcionárias, **Vanessa e Karina**, obrigada pela atenção e auxílio.

À **todas as pessoas** que, de algum modo, contribuíram para a realização deste trabalho.

À **CAPES**, pela bolsa de estudos concedida, e **FAPESP** pelo auxílio à pesquisa (2001/09879-8).

A ciência será sempre uma busca, jamais um descobrimento.

É uma viagem, nunca uma chegada.

(Karl Popper, filósofo austríaco)

Pensamento é impossível sem uma imagem.

(Aristóteles, 325 A.C.)

RESUMO

PRADO CM. Estiramento ou fluxo turbilhonar e baixa tensão de cisalhamento influem diferentemente no remodelamento aórtico em ratos. Tese (Doutorado) – Departamento de Patologia – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2006.

O presente estudo foi realizado para investigar a relação entre forças hemodinâmicas locais e remodelamento intimal e medial nos segmentos pré-estenose e pós-estenose da parede da aorta abdominal de ratos submetidos à estenose acentuada. Foram utilizados ratos Wistar machos divididos em dois grupos: *sham*-operado, grupo controle em que a aorta foi apenas manipulada, e grupo estenosado, animais submetidos à cirurgia de estenose da aorta abdominal. As aortas demonstraram duas respostas remodeladoras distintas e diferentes ao estímulo hemodinâmico induzido pela coarctação infra-diafragmática. A primeira é o remodelamento no segmento pré-estenótico hipertensivo com tensão circunferencial da parede aumentada associada com estresse tensional normal, fluxo laminar e tensão de cisalhamento normal. As células endoteliais eram heterogêneas, aumentadas em tamanho e alongadas em direção ao fluxo. Além disso, observou-se conspícuas placas neointimais difusamente distribuídas e espessamento medial. Nossos achados sugerem que a tensão circunferencial da parede aumentada devido a hipertensão tem papel fundamental no remodelamento desse segmento através de efeitos biomecânicos sobre o estresse oxidativo e expressão aumentada de TGF- β . A segunda é o remodelamento no segmento pós-estenótico normotenso com fluxo turbilhonar e baixa tensão de cisalhamento na parede associados a tensão circunferencial da parede e estresse tensional normais. As células endoteliais apresentavam-se semelhantes aos controles, exceto por alterações fenotípicas focais associadas à presença de conspícuas placas neointimais focalmente distribuídas, similares mas muito maiores que as encontradas no segmento pré-estenose. Mais estudos são necessários para se determinar como as forças mecânicas do fluxo turbilhonar e da baixa tensão de cisalhamento na parede são detectadas e traduzidas em sinais bioquímicos para as células e convertidas em alterações fenotípicas patofisiologicamente relevantes.

Palavras-chave: hipertensão, tensão de cisalhamento na parede, fluxo turbilhonar, aterosclerose, remodelamento arterial.

ABSTRACT

PRADO CM. **Stretch or turbulent flow and low wall shear stress differentially affect aorta remodeling in rats.** Thesis (Doctoral) – Department of Pathology – Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2006.

The present investigation was carried out to evaluate the relationship between local hemodynamic forces and intimal and medial remodeling in the proximal and distal segments of the arterial walls of rats in relation to severe stenosis of the aorta. Male Wistar young rats were divided randomly into: operated group, animals submitted to surgical abdominal aorta stenosis, and sham-operated group, a control group of animals submitted to sham operation to simulate abdominal aorta stenosis. Constricted aortas showed two distinct adaptive remodeling responses to hemodynamic stimuli induced by coarctation. The first is remodeling in the hypertensive prestenotic segment with increased circumferential wall tension associated with normal tensile stress, laminar flow/normal wall shear stress. The remodeling in this segment is characterized by enlarged heterogeneous endothelial cells, elongated in the direction of the blood flow, diffusely distributed neointimal plaques, appearing as discrete bulging toward the vascular lumen, and medial thickening. Our findings suggest that increased circumferential wall tension due to hypertension play a pivotal role in the remodeling of the prestenotic segment through biomechanical effects on oxidative stress and increased TGF- β expression. The second is remodeling in the normotensive poststenotic segment with turbulent flow/low wall shear stress and normal circumferential wall tension and tensile stress. The remodeling in this segment is characterized by groups of endothelial cells with phenotypic alterations and focally distributed neointimal plaques, similar but many of them larger than those found in the prestenotic segments. Further studies are needed to determine how the mechanical forces of turbulent flow/low shear stress are detected and transduced into biochemical signaling by the cells of the artery walls and then converted into pathophysiologic relevant phenotypic changes.

Keywords: hypertension; wall shear stress; turbulent flow; atherosclerosis; aorta remodeling.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 Considerações gerais	21
3.2 Delineamento experimental	21
3.3 Sacrifício e Coleta do material	23
3.4 Microscopia óptica comum	23
3.5 Microscopia óptica de alta resolução (metacrilato)	24
3.6 Análise ultraestrutural	25
3.7 Avaliação da pressão arterial	27
3.8 Avaliação do fluxo sanguíneo	28
3.9 Análise do estiramento (<i>stretch</i>) da parede da aorta	28
3.10 Avaliação de lipídios e proteínas	29
3.11 Análise do coração	29
3.12 Análise imunoistoquímica	30
3.13 Análise morfométrica da aorta	31
3.14 Análise estatística	32
4. RESULTADOS	34
4.1 Estado geral dos animais	34
4.2 Pressão arterial	37

4.3	Fluxo sanguíneo	38
4.4	Estiramento da parede da aorta	41
4.5	Estudo morfológico	43
4.6	Análise morfométrica	46
4.7	Análise ultraestrutural	53
4.8	Estudo imunoistoquímico	58
5.	DISCUSSÃO	62
6.	CONCLUSÕES	72
	REFERÊNCIAS	74
	ANEXOS	84
	APÊNDICE	92

1. Introdução

O conceito atual de aterosclerose é de um processo inflamatório direcionado por células inflamatórias, em particular macrófagos, em associação com a deposição subendotelial (intimal) de lipídios na parede arterial [Ross, 1999]. Acredita-se ser resultado de uma resposta ao dano iniciado por fatores circulantes e modulada pela anatomia local e pela hemodinâmica [Newby, 2000]. A lesão característica representa o resultado de ciclos de acúmulo de macrófagos derivados de monócitos e de migração e proliferação de células musculares lisas que ocorrem principalmente na túnica íntima [Celermajer, 1997; Kádár & Glasz, 2001; Lusis, 2000]. Afeta primariamente as artérias elásticas (aorta, carótidas e ilíacas) e as artérias musculares de grande e médio calibres (coronárias e poplíteas). A doença quase sempre começa na infância, embora os sintomas, habitualmente, só se tornem evidentes na meia-idade ou mais tarde, quando as lesões arteriais precipitam lesão orgânica [Ross, 1999]. As conseqüências terminais da aterosclerose, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral constituem juntos a causa mais importante de morte no mundo desenvolvido. É a mais importante causa de morbidade em pacientes hipertensos e diabéticos e é grandemente responsável pela insuficiência cardíaca [Newby, 2000].

A aterosclerose tem etiopatogenia complexa. Apesar do crescente entendimento das lesões básicas da aterosclerose e dos eventos celulares que conduzem ao desenvolvimento da lesão, os mecanismos precisos pelos quais os vários fatores de risco iniciam ou contribuem para a aterogênese não são claros. É provável que os fatores de risco afetem mais que um passo no processo aterogênico. Parece ser multifatorial, com fatores ambientais, alimentares,

hemodinâmicos, genéticos, fazendo parte de seu desenvolvimento [Ross, 1993; Schimtz et al., 1998; Stocker & Keaney Jr, 2004]. Embora a aterosclerose geralmente só se torne clinicamente evidente na meia-idade, ou mais tarde, quando as lesões arteriais precipitam lesão orgânica [Ross, 1999], trata-se de uma doença lentamente progressiva que começa na infância e evolui no decorrer de várias décadas [Strong, 1991].

A hipertensão arterial é importante para o desenvolvimento da aterosclerose e a disfunção endotelial parece ser um mecanismo básico fundamental [Kiousky, 1999; Rossi & Colombini-Netto, 2001]. As células disfuncionais apresentam produção realçada de espécies reativas do oxigênio, principalmente o superóxido [Barton et al., 2001a; Taddei et al., 1998; Zalba et al., 2001], o que contribui para a desregulação do processo fisiológico, conduzindo as alterações estruturais e funcionais presentes na hipertensão [Zalba et al., 2000]. As mudanças típicas associadas à hipertensão nas artérias elásticas e musculares são espessamento da íntima e média e aumento do tecido conjuntivo. Essas mudanças são conseqüências das alterações na biologia dos componentes celulares e não celulares da parede arterial. É concebível que estas alterações podem alterar a função desta camada e promover a aterogênese [Touyz, 2000].

Independente do perfil dos fatores de risco próprios de um paciente, da espécie, do modelo animal ou do tipo de alteração genética natural ou artificial, as lesões precoces ricas em lipídios da aterosclerose mostram um padrão marcadamente definido na vasculatura arterial. Desde que os patologistas Rokitansky (1852) e Virchow (1860) descreveram a natureza focal da formação da placa aterosclerótica na árvore vascular, o envolvimento de forças hemodinâmicas na patogênese da aterosclerose tem sido correntemente assinalado [Zarins et al., 1983]. Tipicamente, a distribuição focal dessas lesões desenvolve-se em regiões de curvatura, bifurcação e ramificação de vasos, sugerindo que a dinâmica do fluido e a

geometria do vaso poderiam ter um papel na formação da placa [Taxon, 1995; Zand et al., 1999]. Caro et al. (1969, 1971) relataram que a aterosclerose geralmente se desenvolve em regiões relacionadas com baixa tensão de cisalhamento na parede (*wall shear stress*). A esse conhecimento foi adicionado, na década de 80, que as placas desenvolvem-se em áreas de baixa tensão de cisalhamento geralmente associadas com separação de fluxo e fluxo reverso [Ku et al., 1985; Zarins et al., 1983]. As regiões de curvatura, bifurcação e ramificação de vasos, onde ocorre distúrbio de fluxo, são áreas propensas às lesões e as geometrias associadas com fluxo laminar uniforme e tensão de cisalhamento na parede relativamente constante, como regiões tubulares retas da aorta, tendem a ser áreas protegidas das lesões [Bevilacqua et al., 1989]. Estudos *in vivo* e *in vitro* sugerem que baixa ou alta tensão de cisalhamento na parede causa espessamento da camada intimal [Caro et al., 1969; Friedman et al., 1981; Ku et al., 1985]. A tensão de cisalhamento na parede pode mudar a morfologia e a orientação da camada de células endoteliais. Estas, sujeitas à elevada tensão de cisalhamento, tendem a se alinhar em direção do fluxo e aquelas sob baixa ou oscilatória tensão de cisalhamento na parede tornam-se arredondadas e não apresentam padrão de alinhamento [Levesque & Nerem, 1985; Levesque et al., 1986]. Além do mais, a exposição da parede arterial a uma baixa tensão de cisalhamento pode aumentar a permeabilidade intercelular e conseqüentemente aumentar a vulnerabilidade dessas regiões dos vasos à aterosclerose [Okano & Yoshida, 1994], bem como, à estagnação sangüínea, permitindo a entrada aumentada de partículas sangüíneas aterogênicas [Glagov et al., 1988; Walpola et al., 1995].

A tensão de cisalhamento (devida ao fluxo sangüíneo) e estiramento do vaso (*stretch*) (devido a pressão sangüínea) são implicadas como as mais importantes forças hemodinâmicas envolvidas na aterogênese. A árvore arterial é constantemente exposta a essas forças variando

amplamente em magnitude, frequência e direção [Lehoux, 2006; Resnick et al., 2003]. A tensão de cisalhamento é paralela à parede do vaso e representa a força friccional que o fluxo sanguíneo exerce na superfície endotelial. Somente a superfície interna da parede do vaso, isto é, as células endoteliais, são expostas à força friccional de cisalhamento [Ando et al., 1994; Bakker & Gans, 2000; Zarins & Glagov, 1995]. A pressão sanguínea estende a parede do vaso, gerando forças radiais e tangenciais que dependem da pressão aplicada e dimensões do vaso (diâmetro e espessura) (Lehoux, 2006). O estiramento do vaso pode ser avaliado por 2 fatores *in vivo*: tensão circunferencial da parede (*circumferential wall tension*) e estresse tensional (*tensile stress*). Estas forças não são restritas ao endotélio, também as células musculares lisas e a camada adventícia são expostas ao estiramento [Ando et al., 1994; Ali & Schumacker, 2002]. A tensão circunferencial da parede é devida à pressão transmural enquanto o estresse tensional age perpendicularmente e representa a força dilatadora da pressão sanguínea na parede do vaso. Tem sido sugerido que um alto estímulo de estiramento apresenta um papel importante na progressão da aterosclerose [Carallo et al., 1999; Chien et al., 1998; Dobrin, 1995; Lehoux & Tedgui, 1998].

Tem sido também demonstrada a participação de forças não usuais, como o turbilhonamento e o fluxo reverso [Wissler & Vesselinovitch, 1983]. A ausência de fluxo laminar normal pode reduzir a produção de óxido nítrico (NO) endotelial e aumentar a produção de certas moléculas de adesão [De Caterina et al., 1995; Nagel et al., 1994]. A tensão de cisalhamento na parede do vaso em região de fluxo turbilhonar ou não laminar produz diferentes efeitos sobre as células endoteliais se comparados a tensão de cisalhamento na parede do vaso com fluxo laminar. Estas áreas correspondem à áreas de localização da placa aterosclerótica e hiperplasia neointimal [Bakker & Gans, 2000; Ku et al., 1985; Malek et

al., 1999; Prado et al., 2006]. Nas últimas décadas, todavia, tem havido uma grande mudança na visão mecanicista da biologia vascular, colocando ênfase primária no envolvimento ativo de células da parede do vaso, em particular endotélio e músculo liso, nos processos de doenças vasculares, particularmente no desenvolvimento do processo de aterosclerose [Gimbrone Jr & Topper, 1998; Ross, 1999]. Nesse contexto, uma hipótese alternativa ligando forças hemodinâmicas e aterosclerose tem emergido, a qual tem gerado um grande número de novas visões mecanicistas. A premissa central dessa nova hipótese de trabalho é a de que o revestimento endotelial, como o componente celular em contato direto com o sangue fluindo, seria o sensor primário da tensão na parede vascular e funcionaria como transdutor desses estímulos biomecânicos em respostas biológicas na parede arterial [Davies, 1995; Gimbrone Jr et al., 1997; Resnick & Gimbrone Jr, 1995]. A questão central seria como estas forças mecânicas são percebidas pelas células da parede do vaso sanguíneo e traduzidas em alterações fenotípicas patofisiologicamente relevantes.

2. Objetivos

Os objetivos do presente trabalho foram o estudo das alterações morfológicas e das alterações funcionais que ocorrem nas regiões pré-estenose e pós-estenose da parede da aorta abdominal de ratos submetidos à estenose acentuada. A estenose cria um meio hipertensivo na região pré-estenose e turbilhonamento sanguíneo na região pós-estenose. A importância da hipertensão arterial e turbilhonamento sanguíneo puderam, com este modelo, ser avaliados como fenômenos biológicos distintos na gênese de lesões intimais.

3. Materiais e Métodos

3.1 Considerações gerais

Foram utilizados ratos Wistar (número total=120, número utilizado=100), machos, pesando em média $149,10 \pm 1,30$ gramas, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP). Os animais foram alocados individualmente em gaiolas construídas com polipropileno e tampas de aço inoxidável perfurado, lavadas diariamente. Foram divididos em dois grupos: grupo *sham*-operado e grupo estenosado. O termo *sham*-operado foi utilizado por ser de uso corrente e corriqueiro. A dieta sólida foi ração normal de laboratório e dieta líquida foi água de torneira *ad libitum* fornecida em tubos graduados de Richter. A composição aproximada da dieta normal é (g/100g): proteína 21.0; gordura 3,5; carboidratos 60.0; sais 5,3; complexo vitamínico 2.0 e cinzas (dados fornecidos pelo produtor – Nuvital, Colombo, Paraná). Esta dieta provê aproximadamente 3,5 Kcal/g. O peso dos animais, o consumo de dieta líquida e sólida foram avaliados 2 vezes por semana. O presente projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Processo 015/2004 – Anexo A).

3.2 Delineamento Experimental

A cirurgia de estenose da aorta abdominal foi baseada na técnica descrita por Béznak (1955) e modificada por Rossi & Peres (1992). Os animais foram anestesiados com éter (Merck KGaA, Alemanha). Realizou-se a tricotomia do flanco esquerdo, fixação em decúbito lateral direito em mesa cirúrgica e antissepsia da pele com álcool iodado. Através de incisão

cirúrgica de cerca de 3 cm de extensão, oblíqua, paralela e 1 cm abaixo do rebordo costal esquerdo, os planos foram dissecados até a cavidade peritoneal. Após a exposição da aorta, esta foi dissecada logo acima da adrenal por onde se passou um fio de algodão. A seguir, uma agulha romba de 0,94 mm foi colocada paralela à aorta, atando-se com nó duplo o fio de algodão. Com a retirada da agulha, a artéria passou a apresentar estenose local com diâmetro correspondente ao daquela. Após o término desses procedimentos, a parede abdominal foi suturada com pontos separados de fio de algodão em dois planos, peritônio-músculos e pele, e realizada limpeza local com álcool iodado. Os animais *sham*-operados foram submetidos a procedimento cirúrgico semelhante, diferindo apenas no trato com a aorta, apenas manipulada.

Para a descoberta do diâmetro da agulha a ser utilizada durante a cirurgia foram utilizados animais com peso médio de 150 g e agulhas com diâmetro de 0,80 e 0,94 mm. A obstrução desejada era aproximadamente de 80% baseado em dados do laboratório [Rossi & Carillo, 1991; Rossi & Peres, 1992] e da literatura [Béznak, 1955]. As aortas foram retiradas como descrito posteriormente. A agulha de 0,94 mm propiciou uma obstrução de aproximadamente 81%. A agulha de 0,80 mm, embora tivesse propiciado uma estenose acima de 85%, determinou alta taxa de mortalidade, cerca de 90%, devido insuficiência cardíaca aguda (a causa imediata de morte era edema agudo de pulmão).

3.3 Sacrifício e Coleta do material

Ao final de 4 semanas, os animais foram pesados e sacrificados após anestesia superficial pelo éter. Foi realizada uma incisão abdominal mediana e a cavidade torácica aberta expondo o coração ainda pulsando. Os corações foram rapidamente excisados, lavados em solução

salina a 0,9% gelada (4° C – Anexo D), enxugados com papel de filtro, pesados e fixados *in toto* em formol a 3,7% em PBS (Anexo B). Após 30 minutos, o fixador foi trocado e ambos os ventrículos de cada coração foram isolados e cortados em 2 fragmentos por um corte transversal medioventricular.

As aortas foram colhidas desde o cajado até o ponto imediatamente após a estenose e lavadas a uma pressão média de perfusão de 100 mmHg com solução salina a 0,9% gelada (4° C), com o auxílio de uma cânula de polipropileno inserida na extremidade proximal. Em seguida, foi realizada perfusão de fixação com formol a 3,7% em PBS ou outro fixador apropriado para microscopia eletrônica. Após o período de fixação, as aortas foram limpas, com o mínimo de manipulação, sob lupa Zeiss Stemi 2000-C (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), recortadas e divididas em 2 porções: pré-estenose e pós-estenose (Figura 1). Os fragmentos de aorta dos animais *sham*-operados também foram divididos em duas porções em regiões semelhantes aos estenosados.

3.4 Microscopia óptica comum

Após 24 horas de fixação, os corações e as aortas (n=8 por grupo) foram desidratados em soluções crescentes de álcool (80%, 95%, 30 minutos cada e 100%, 4 trocas de 1 hora cada). Após o último álcool, três banhos de xilol (30 minutos cada), dois banhos de parafina (2 horas cada) e inclusão em parafina. Cada bloco de parafina foi cortado seriadamente na mesma direção e as secções coradas com hematoxilina eosina (5 µm de espessura) e picrossirius vermelho (7 µm de espessura) (Anexo C).

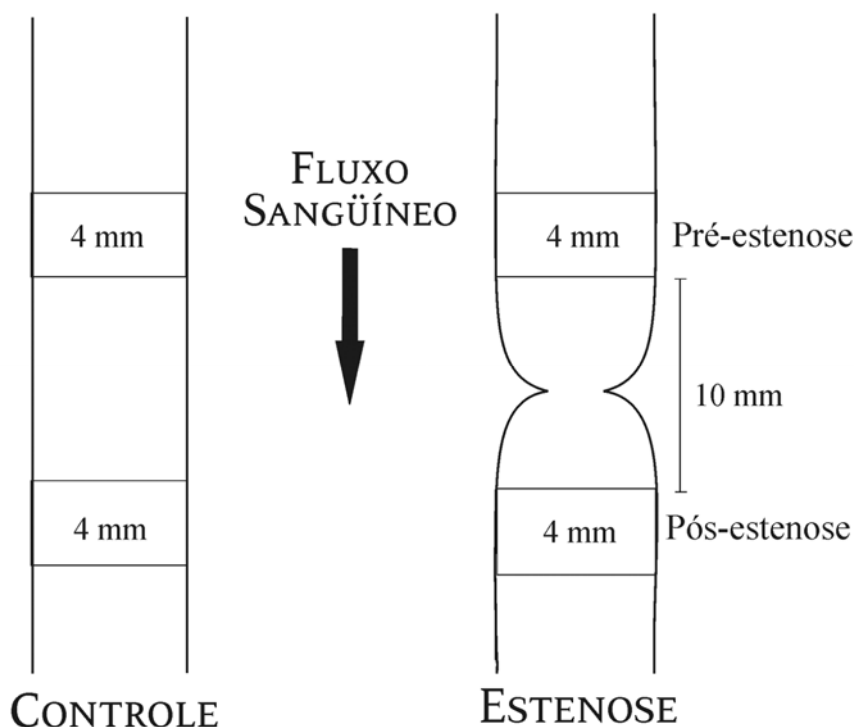


Figura 1: Esquema representativo da divisão da aorta dos animais *sham*-operados e estenosados.

3.5 Microscopia óptica de alta resolução (metacrilato)

Após 24 horas de fixação, as aortas (n=8 por grupo) foram desidratadas em soluções crescentes de álcool (70%, 95% e 100%, 3 trocas 1 hora cada), passadas pela solução pré-infiltradora (24 horas), solução infiltradora (24 horas) e incluídas em resina em suportes apropriados (Historesin® - Leica Instruments GmbH, Heidelberg, Alemanha) (Anexo D). As aortas foram deixadas por pelo menos 24 horas em estufa a 60°C para o endurecimento da resina. Cortes de 2,5 µm foram obtidos em micrótomo Sorvall JB4-A (DuPont Company, Newtown, CT, EUA), estirados em banho-maria à temperatura ambiente, colocados em lâminas de vidro e secos em platina aquecedora a uma temperatura de 55-60°C por

aproximadamente 24 horas. Logo após os cortes foram corados com azul de toluidina (Anexo C).

3.6 Análise ultraestrutural

Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As aortas (n=5 por grupo) foram lavadas com solução salina a 0,9% gelada (4° C), seguida de uma perfusão de fixação com aldeído glutárico a 2,5% (Anexo B) em tampão cacodilato de sódio 0,2M (pH 7,3) (Anexo D). Foram limpas dos tecidos adjacentes sob lupa Zeiss Stemi 2000-C (Carl Zeiss), separadas em porções pré-estenose e pós-estenose e fixadas no mesmo fixador por 2 horas. As amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% (Anexo B) em tampão cacodilato de sódio 0,2M por 2 horas. A desidratação foi realizada em série crescente de acetona (30%, 50%, 90% e 95%, 10 minutos cada e 100%, 3 trocas de 20 minutos cada). O material foi infiltrado com a mistura de resina e acetona 3:1, 1:1 e 1:3 (1 hora cada), resina pura (3 trocas de 1 hora cada) e inclusão em resina Araldite 502 (Polysciences Inc., Warrington, PA, EUA) (Anexo D). Cortes de 0,75 µm foram obtidos com navalha de vidro, corados com azul de toluidina e examinados em microscópio óptico para seleção das áreas posteriormente submetidas a cortes ultrafinos. Estes foram obtidos com navalha de diamante em ultramicrótomo Sorvall MT-5000 (DuPont Company, Newtown, CT, EUA), colocados em grades de cobre de 200 *mesh* (Polysciences Inc., Warrington, PA, EUA), duplamente contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo (Anexo C), observados e fotografados em microscópio eletrônico Zeiss EM109 (Carl Zeiss) a 80 kV.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para obtenção das aortas (n=5 por grupo) para estudo de MEV, os animais foram primeiramente anestesiados com éter e, em seguida, foi injetada uma solução de heparina sódica 100 UI/100g (Heparin®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, São Paulo) diretamente no coração do animal. Após 2 minutos, eles foram sacrificados da maneira descrita anteriormente. Em uma cânula inserida na extremidade proximal da aorta lavou-se o fragmento com solução salina balanceada de Hank à temperatura ambiente (Anexo D) e, em seguida, passou-se o fixador Karnovsky modificado gelado (4° C) (Anexo B). As aortas foram limpas dos tecidos adjacentes sob lupa Zeiss Stemi 2000-C (Carl Zeiss) e imersas no mesmo fixador *overnight* a 4°C. Em seguida, foram perfundidas com HCl 1% por 30 segundos, seguidas por 3 trocas de tampão cacodilato de sódio 0,1M (15 minutos cada) (Anexo D). Após a pós-fixação foi feita em solução de tetróxido de ósmio a 1% e tampão cacodilato de sódio 0,2M (pH 7,4) por 2 horas. As aortas foram desidratadas em série crescente de álcool (50%, 70% e 95%, 10 minutos cada e 100%, 2 trocas de 20 minutos cada). O material foi seco pelo método do ponto crítico com dióxido de carbono (CO₂) em aparelho Bal-Tec CPD 030 (Bal-Tec AG, Balzers, Liechtenstein), fixado em *stubs* perfurados (para que a aorta permanecesse em posição horizontal sobre o suporte) com cola de prata Provac Ag RHC 140 (Provac AG, Balzers, Liechtenstein) e, em seguida, realizado a metalização com ouro-paládio (60 mm x 0,1 mm) (3 trocas de 4 minutos cada) em equipamento Emitech K 650 (Emitech Ltda, Ashford, Kent, Inglaterra). O material foi observado em microscópio eletrônico de varredura Zeiss DSM 940A (Carl Zeiss) a 15 kV.

3.7 Avaliação da pressão arterial

A pressão arterial média (n=8 por período e por grupo) foi avaliada no pré-operatório e após 24 horas, 14 e 28 dias da cirurgia nas porções pré-estenose e pós-estenose. Os animais foram anestesiados com a associação de xilazina (Coopazine®, Coopers Brasil, São Paulo) na dose de 8 mg/Kg e cloridrato de cetamina (Agener®, União Química, Embu-Guaçu, São Paulo) na dose de 74 mg/Kg, administrados via intra-peritoneal. Para a análise da pressão na região pré-estenose, a artéria carótida foi isolada, clampeada e realizada uma incisão puntiforme na superfície anterior onde foi introduzido o cateter (cânula PE-10 + PE-50). A cânula (PE-50) preenchida com salina heparinizada foi conectada a um transdutor de pressão arterial e venosa TRA 021- Power Lab/415 (ADInstruments, Castle Hill, Austrália) onde foram realizados os registros de pressão arterial pulsátil e pressão arterial média. A pressão na região pós-estenose foi verificada através da artéria femoral onde os mesmos procedimentos foram realizados. As pressões foram avaliadas durante 10 minutos sendo registrado o valor médio no período.

3.8 Avaliação do fluxo sanguíneo

Após 28 dias da cirurgia, foram selecionados, ao acaso, animais (n=8 por grupo) para observação do fluxo sanguíneo nas regiões pré-estenose e pós-estenose. Para esta análise foi utilizado um aparelho de ultra-sonografia Acuson modelo Aspen (Acuson Corp., Mountain View, Califórnia, EUA) com Doppler colorido e transdutor eletrônico linear multifrequencial. Os estudos foram realizados com 11 MHz e os animais anestesiados com éter.

A tensão de cisalhamento na parede (TC) (*wall shear stress*) foi calculada usando a fórmula de Poiseuille: $\tau = 4\eta\text{BFR}/\pi(Kr)^3$, onde τ é TC (dyne/cm²), η é a viscosidade do sangue (0,03), BFR é a velocidade do fluxo sanguíneo (mL/s), π é 3,14, K é 1,25 (índice de encolhimento, que é a taxa de variação do diâmetro arterial antes e depois da inclusão do material em parafina [Zarins et al., 1986]) e r é o raio arterial (cm) [Song et al., 2000].

3.9 Análise do estiramento (*stretch*) da parede da aorta

O estiramento do vaso pode ser avaliado por 2 fatores *in vivo*: tensão circunferencial da parede (TCP) (*circumferential wall tension*) e estresse tensional (ET) (*tensile stress*). A tensão circunferencial média da parede foi calculada pela Lei de Laplace com a seguinte fórmula $\text{TCP} = \text{PAM} \times (\text{DI}/2)$, onde a tensão circunferencial da parede é expressa em dyne/cm, PAM é a pressão arterial média (dynes/cm²) e DI é o diâmetro interno (cm) [Carallo et al., 1999]. O diâmetro interno do vaso foi multiplicado por 1,25 (índice de encolhimento, que é a taxa de variação do diâmetro arterial antes e depois da inclusão do material em parafina [Zarins et al., 1986]).

O estresse tensional foi calculado por $\text{ET} = \text{TCP}/\text{EIM}$, onde o estresse tensional é expresso em dyne/cm², TCP é a tensão circunferencial da parede (dyne/cm) e EIM é a espessura da parede (camada íntima mais camada média) expressa em cm [Carallo et al., 1999].

3.10 Avaliação de lipídios e proteínas

Amostras de sangue (n=10 em cada grupo) foram obtidas da veia da cauda no dia do sacrifício, com os animais anestesiados com éter. As concentrações de colesterol total e HDL

colesterol foram obtidas através de *kits* comerciais (Cobas Mira, Roche) e o nível de albumina e proteínas totais através da reação de biureto.

3.11 Análise do coração

O índice de peso do coração foi calculado dividindo-se o peso do coração pelo peso corporal do animal. A taxa de crescimento (g/dia) foi calculada subtraindo-se o peso final do peso inicial do animal dividido pelo número de dias do experimento. O peso esperado do coração foi obtido através de uma curva controle (peso corporal x peso coração). Usando este método foi possível comparar o peso úmido dos corações dos animais de ambos os grupos ao peso úmido previsto de corações de animais de mesmo peso corporal.

Análise morfométrica do coração

A análise morfométrica do coração (n=10 em cada grupo) foi realizada através do programa ImageJ (desenvolvido pelo U. S. National Institute of Health e disponível na Internet <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>). Foram utilizados os corações incluídos em parafina e corados com hematoxilina eosina para esse estudo. Foram avaliadas as áreas dos ventrículos direito e esquerdo e a espessura da parede livre do ventrículo esquerdo, ventrículo direito e septo.

3.12 Análise imunoistoquímica

As aortas (n=6 por grupo) foram coletadas e processadas pela maneira descrita anteriormente no item Microscopia óptica comum. Os cortes histológicos foram colocados em lâminas silanizadas. Estas foram desparafinizadas e colocadas em tampão citrato (pH 6,0) (Anexo D) na panela à vapor para recuperação antigênica, por 40 minutos. Após voltarem à temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos com PBS (Anexo D). O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com 3% H₂O₂ por 20 minutos e lavadas 3 vezes por 5 minutos com PBS. Foram incubadas com soro normal de cavalo por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi colocado o anticorpo primário e incubado *overnight* a 4°C. Os anticorpos primários incluíram: anti-iNOS (sintase do óxido nítrico induzível) (polyclonal rabbit anti-iNOS; LabVision Co., Fremont, Califórnia, EUA; diluído 1:25); anti-nitrotirosina (polyclonal rabbit anti-nitrotyrosine; Upstate, Lake Placid, Nova Iorque, EUA; diluído 1:100); anti-eNOS (sintase do óxido nítrico endotelial) (polyclonal rabbit anti-eNOS; LabVision Co., Fremont, Califórnia, EUA; diluído 1:150) e anti-TGFβ (fator de crescimento transformador beta) (polyclonal rabbit anti-TGF-β1/2/3; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, Califórnia, EUA; diluído 1:100). As lâminas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos com PBS. O anticorpo secundário foi diluído 1/100 em BSA e incubado por 1 hora a 37°C e lavadas 3 vezes por 5 minutos com PBS. Foram incubadas com reagente ABC por 30 minutos e lavadas 3 vezes por 5 minutos com PBS. Em seguida, incubadas com diaminobenzidina (DAB – Sigma, St. Louis, EUA) por 1 minuto e coradas com hematoxilina de Harris por 6 segundos (Anexo C). Lavadas com água amoniacal, diafanizadas, desidratadas e montadas em Permount (Fisher Scientific, Nova Jersey, EUA). Para as lâminas controles, a especificidade da imunomarcção foi testada pela omissão do anticorpo primário no meio de incubação. A

avaliação da imunoreatividade foi realizada por um observador treinado, identificando-se a intensidade e a extensão da marcação. Foram colocados três cortes seriados por lâmina de cada região. Assim, pode-se obter um valor médio para cada região por animal. As lâminas foram graduadas em uma escala arbitrária de 0 a 3 cruces: 0=sem marcação; 1=marcação fraca; 2=marcação moderada e 3=marcação forte.

3.13 Análise morfométrica da aorta

A análise morfométrica da aorta (n=8 em cada grupo) foi realizada utilizando o programa Leica Qwin (Leica Imaging Systems Ltd, Cambridge, Inglaterra) em conjunto com um microscópio Leica (Leica DMR, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Inglaterra), videocâmera (Leica DC300F, Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Suíça) e um computador *on-line*. Foram utilizadas as aortas incluídas em metacrilato para esse estudo. Verificou-se a espessura da camada íntima, da camada média e o número de unidades lamelares da camada média (aumento 400x). Também foi verificada a área da luz do vaso e o perímetro (aumento 50x). O diâmetro foi calculado de acordo com a fórmula $d=2\sqrt{a/\pi}$, onde a é área expressa em mm^2 . A espessura da camada íntima foi definida como o endotélio e camada subendotelial até a superfície interna da lâmina elástica interna, a espessura da camada média definiu-se entre a lâmina elástica interna e a lâmina elástica externa. Foram coletadas 50 medidas de íntima e 20 medidas de média, por porção, distribuídas por toda a circunferência do vaso, de cada animal.

A quantidade relativa de colágeno nas camadas íntima e média foi avaliada morfometricamente em lâminas de material parafinado e coradas com picrossírius vermelho. Foram medidas 5 áreas por região (pré-estenose e pós-estenose) por animal, selecionadas

aleatoriamente por toda a circunferência do vaso. O aumento usado foi de 200x e quantidade de colágeno expressa em porcentagem de área medida.

3.14 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando-se o programa estatístico Graph Pad Prism 4 (Graph Pad Software In., San Diego, Califórnia, EUA). O teste t foi utilizado para comparação entre duas variáveis. Comparações entre a taxa de fluxo sanguíneo, tensão de cisalhamento, tensão circunferencial da parede e estresse tensional foram feitas pela análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni. Comparações entre os graus de intensidade da imunoreatividade foram feitas pelo teste Mann-Whitney. Os dados da fração de colágeno do complexo íntima-média e espessura do complexo íntima-média foram analisados pelo teste de correlação de Person. O nível de significância escolhido foi de 5% e os dados, quando não especificados, são apresentados como a média \pm erro padrão da média.

Os dados da taxa de fluxo sanguíneo, da tensão circunferencial da parede e do estresse tensional foram apresentados sob a forma de *box and whisker plot*. Este gráfico mostra o conjunto de todos os dados, sendo particularmente útil para comparar vários conjuntos de dados. O *box* representa o segundo e terceiro quartis, de baixo para cima, e tem uma barra transversal indicando a mediana dos valores. As linhas (*whisker*) acima e abaixo do *box* representam os pontos mais remotos, primeiro (inferior) e quarto quartis.

4. Resultados

4.1 Estado geral dos animais

Do total de animais utilizados no estudo, 19,5 % morreu de edema pulmonar após a cirurgia de estenose da aorta abdominal. Estes animais que morreram no período inicial em até 7 dias após a cirurgia, apresentavam os pulmões congestos, aumentados de volume e derrame pleural na cavidade torácica. Apenas 1 (5%) animal controle morreu no período experimental, 3 dias após a cirurgia *sham*. Esses animais foram desconsiderados.

O diâmetro da agulha utilizada de 0,94 mm reduziu em $80,97 \pm 2,51\%$ a luz do vaso na área de estenose. Em busca de um maior grau de estenose e conseqüentemente maiores hipertrofia cardíaca e pressão arterial na porção pré-estenose, tentou-se utilizar uma agulha de 0,8 mm de diâmetro. A taxa de mortalidade aumentou para 90% e os animais morreram com um quadro de insuficiência cardíaca aguda.

Não houve diferença no consumo médio de ração entre os animais *sham*-operados ($26,80 \pm 1,04$ g) e estenosados ($24,06 \pm 0,74$ g). O mesmo foi observado com a ingestão média de água ($34,66 \pm 1,81$ mL e $31,14 \pm 1,41$ mL, respectivamente) (Figura 2/Tabela 1). O peso corporal dos animais estenosados manteve-se significativamente menor desde a 1ª semana até o final do experimento, embora ambos os grupos apresentassem o mesmo peso corporal inicial e ingestão de líquido e ração semelhantes (Figura 3). O peso corporal final dos *sham*-operados foi de $356,7 \pm 10,64$ g, 10,5% maior que o peso dos estenosados ($319,1 \pm 7,58$ g) (Tabela 2).

Os níveis de proteínas totais e albumina dos animais *sham*-operados ($5,65 \pm 0,43$ mg/100mL e $3,57 \pm 0,23$ mg/100mL, respectivamente) foram semelhantes aos dos estenosados ($5,81 \pm 0,47$ mg/100mL e $3,39 \pm 0,19$ mg/100mL). Do mesmo modo, o colesterol total e HDL

colesterol dos *sham*-operados ($59,93 \pm 5,02$ mg/100mL e $42,83 \pm 2,60$ mg/100mL, respectivamente) foram semelhantes aos dos estenosados ($57,94 \pm 4,11$ mg/100mL e $41,65 \pm 2,87$ mg/100mL) (Tabela 1).

Tabela 1. Ingestão média diária de água e ração, concentração plasmática de colesterol total e HDL colesterol, níveis de proteínas totais e albumina em animais *sham*-operados e estenosados.

	Ingestão de água (mL/dia) por animal	Ingestão de ração (g/dia) por animal	Colesterol total (mg/100 mL)	HDL colesterol (mg/100 mL)	Proteínas totais (g/100 mL)	Albumina (g/100 mL)
<i>Sham</i> -operado	34,66±1,81	26,80±1,04	59,93±5,02	42,83±2,60	5,65±0,43	3,57±0,23
Estenose	31,14±1,41	24,06±0,74	57,94±4,11	41,65±2,87	5,81±0,47	3,39±0,19

Os dados são a média \pm erro padrão.

Tabela 2. Peso corporal (inicial e final), taxa de crescimento, peso do coração e índice de peso do coração dos animais *sham*-operados e estenosados.

	Peso corporal (g)		Taxa de crescimento (g/dia/rato)	Peso do coração (mg)		Índice de peso do coração (g/kg)
	Inicial	Final		Observado	Esperado	
<i>Sham</i> -operado	147,6±2,20	356,7±10,64	6,97±0,32	1206±48,66	----	3,37±0,06
Estenose	150,8±1,00	319,1±7,58**	5,61±0,27**	1448±63,47**	1200	4,60±0,28***

Os dados são a média \pm erro padrão **p<0.01 ***p<0.001

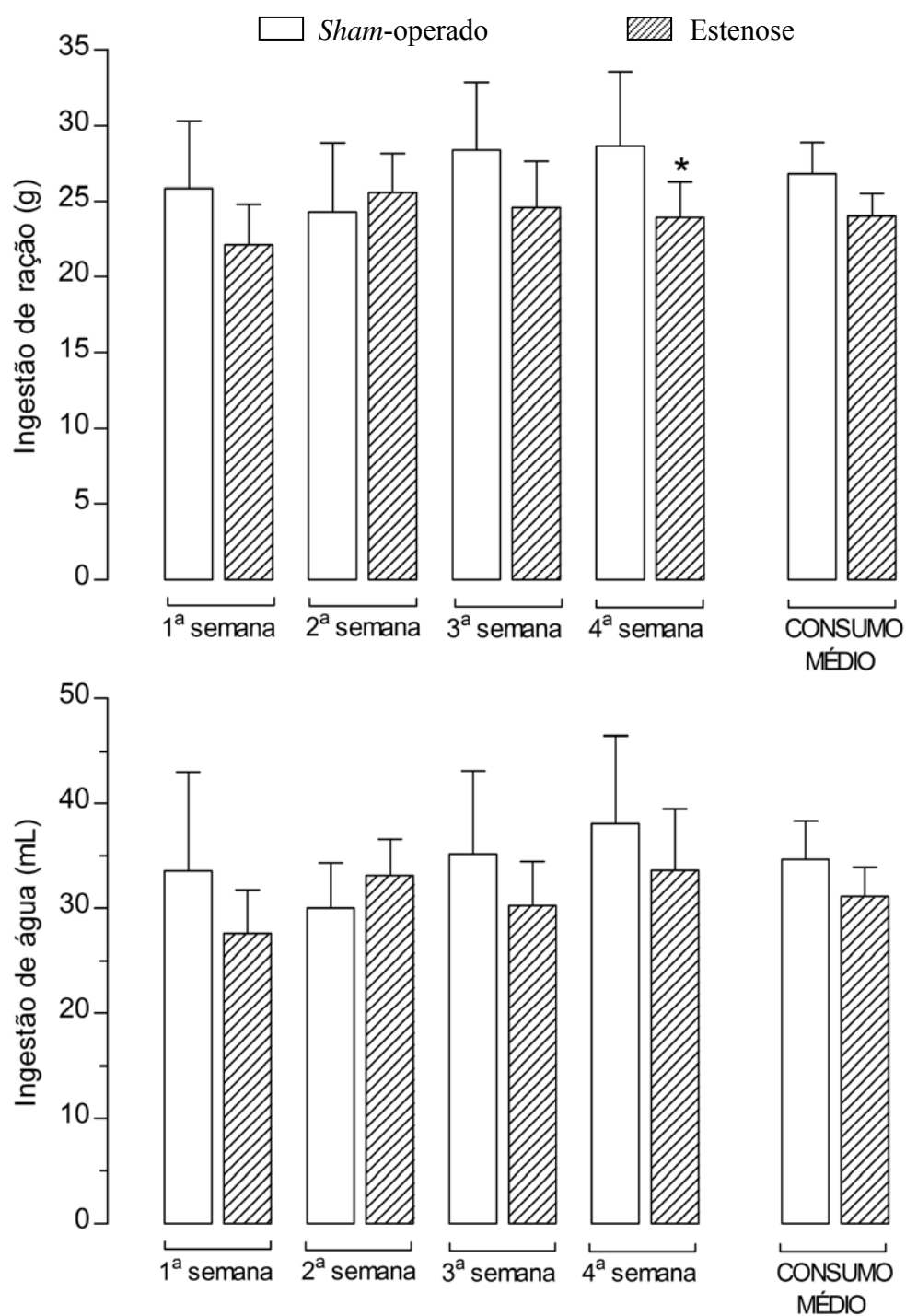


Figura 2: Ingestão média semanal e consumo médio de ração dos animais *sham*-operados e estenosados. Ingestão média semanal e consumo médio de água dos animais *sham*-operados e estenosados. Não houve diferença no consumo médio de ração e água entre ambos os grupos. * $p < 0.05$. Média \pm desvio padrão

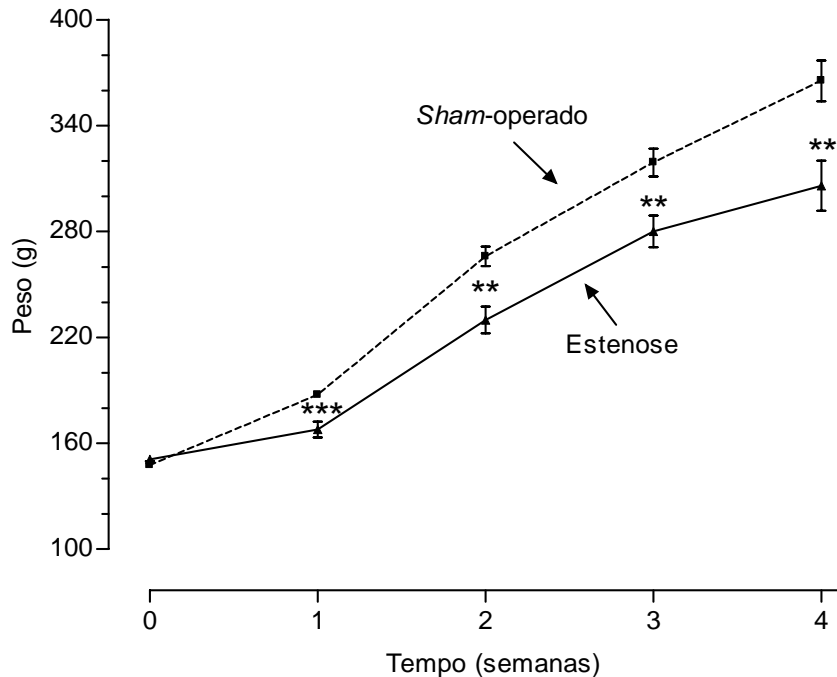


Figura 3: Evolução do peso corporal dos animais *sham*-operados e estenosados durante as 4 semanas. O peso corporal final dos *sham*-operados foi 10,5% maior que o peso dos estenosados. ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.

4.2 Pressão Arterial

Houve um aumento progressivo na pressão carotídea seguinte a constricção da aorta abdominal. Após 24 horas, o aumento foi de 7,8% ($p > 0.05$). Em 15 dias, o aumento tornou-se significativo (13,2%, $p < 0.01$) e, ao final do experimento foi de 24,3% ($p < 0.0001$). Por outro lado, a pressão femoral dos animais estenosados foi similar as pressões carotídea e femoral dos *sham*-operados. Ambas as pressões, carotídea e femoral, no período pré-operatório foram semelhantes entre os grupos. Os valores médios das pressões carotídea e femoral são mostrados durante o período de 4 semanas na figura 4.

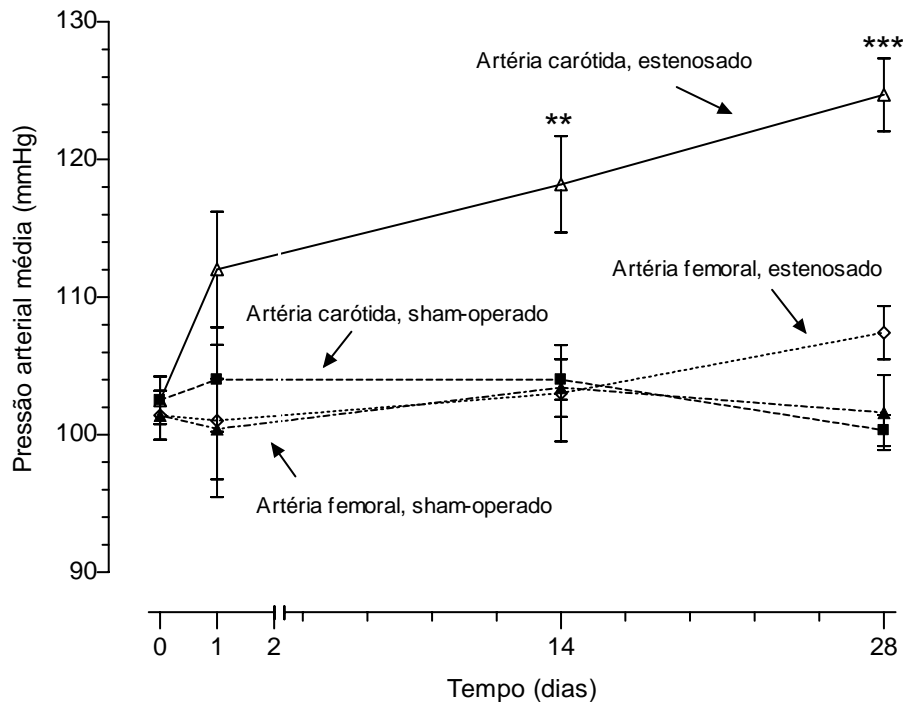


Figura 4: Pressão arterial média carotídea e femoral nos animais *sham*-operados e estenosados durante o período de estudo. Houve um aumento progressivo na pressão carotídea nos animais estenosados. A pressão femoral nos animais estenosados foi semelhante as pressões carotídea e femoral dos animais controles. ** $p < 0.01$
 *** $p < 0.0001$

4.3 Fluxo sanguíneo

Após 4 semanas da cirurgia, a taxa de fluxo sanguíneo no segmento pré-estenose foi similar a observada nos *sham*-operados, $58,10 \pm 3,72$ mL/min e $51,24 \pm 3,60$ mL/min, respectivamente. Em contraste, no segmento pós-estenose, $26,85 \pm 3,00$ mL/min, foi marcadamente reduzido em comparação com os *sham*-operados, $43,28 \pm 3,70$ mL/min (Figura 5).

A avaliação do fluxo sanguíneo através do ultra-som com Doppler colorido demonstrou fluxo laminar nas aortas controles representado pela coloração vermelho-alaranjado (Figura 6A) e o espectro deste fluxo é caracterizado por uma janela sistólica “limpa” (Figura 6B). Os

animais estenosados apresentaram fluxo laminar preservado no segmento pré-estenose e fluxo turbilhonar no segmento pós-estenose representado por uma mistura de cores azul, verde, amarelo e laranja (Figura 6C). O espectro deste fluxo é caracterizado pelo borramento da janela sistólica como observado na Figura 6E.

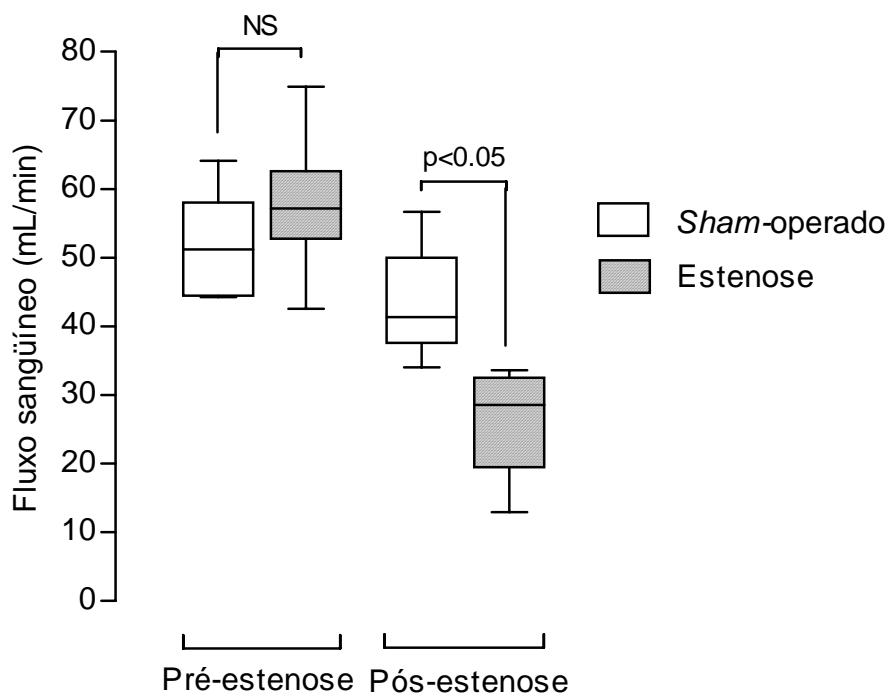


Figura 5: Taxa de fluxo sanguíneo (mL/min) nas aortas dos animais estenosados nos segmentos pré-estenose e pós-estenose e segmentos correspondentes dos *sham*-operados no 28º dia do experimento. A taxa de fluxo sanguíneo no segmento pós-estenose dos animais operados foi significativamente menor se comparada a mesma região dos controles.

O valor médio da tensão de cisalhamento na parede no segmento pré-estenose ($43,72 \pm 2,80$ dyne/cm²) não foi diferente dos *sham*-operados ($51,31 \pm 7,73$ dyne/cm²). O valor no segmento pós-estenose ($24,48 \pm 3,09$ dyne/cm²) foi significativamente reduzido se comparado aos controles ($45,95 \pm 6,60$ dyne/cm²) (Figura 7).

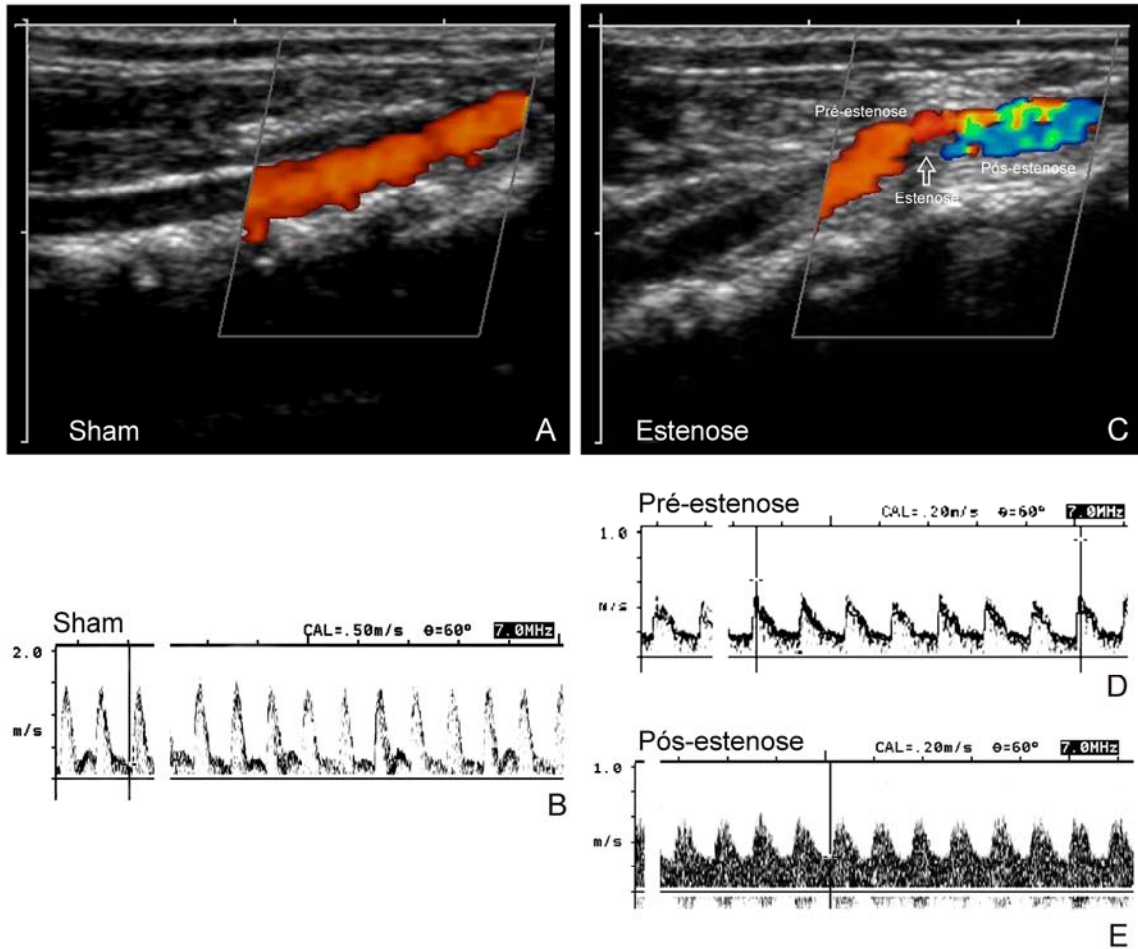


Figura 6: Avaliação do fluxo sanguíneo através de ultra-som com Doppler colorido. A aorta dos animais *sham*-operados demonstrou fluxo laminar representado pela coloração vermelho-alaranjado (Fig. 6A) e o espectro deste fluxo é caracterizado por uma janela sistólica “limpa” (Fig. 6B). Os animais estenosados apresentaram no segmento pré-estenose fluxo laminar e janela sistólica “limpa” preservados (Fig. 6D) e fluxo turbilhonar no segmento pós-estenose representado por uma mistura de cores azul, verde, amarelo e laranja (Fig. 6C). O espectro deste fluxo é caracterizado pelo borramento da janela sistólica como observado na Figura 6E.

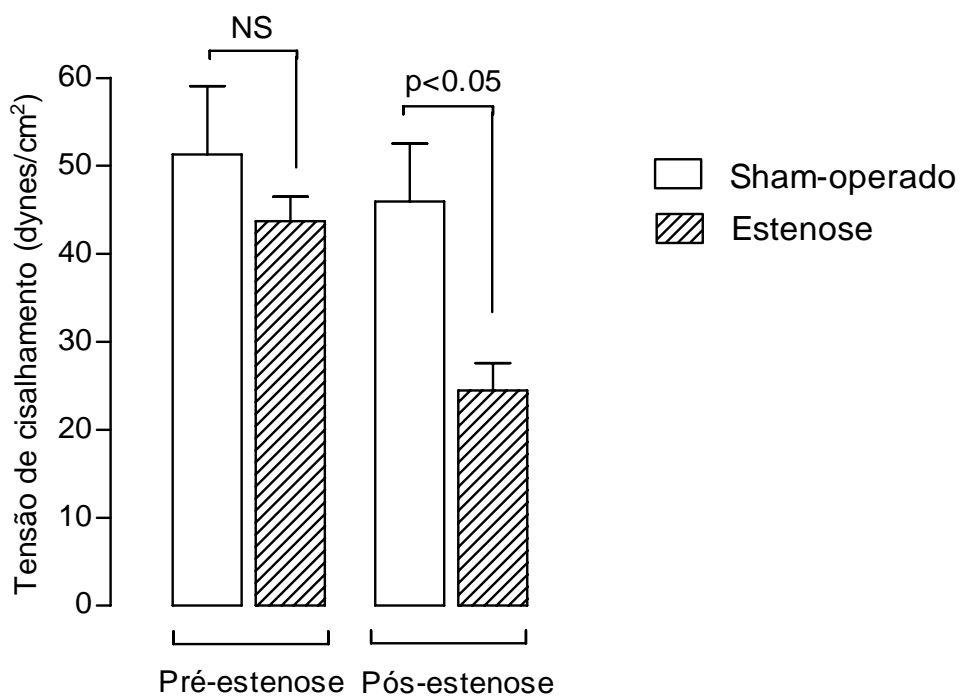


Figura 7: Tensão de cisalhamento na parede das aortas dos animais estenosados nos segmentos pré-estenose e pós-estenose e segmentos correspondentes dos *sham*-operados no 28º dia do experimento. A tensão de cisalhamento na parede no segmento pós-estenose dos animais operados foi significativamente menor se comparada a mesma região dos controles. Não houve diferença na tensão de cisalhamento na parede no segmento pré-estenose entre os animais controles e estenosados.

4.4 Estiramento da parede da aorta

O valor médio da tensão circunferencial da parede no segmento pré-estenose ($1,63 \times 10^4 \pm 0,05$ dyne/cm) foi significativamente maior em comparação ao segmento correspondente dos *sham*-operados ($1,27 \times 10^4 \pm 0,02$ dyne/cm). O valor no segmento pós-estenose ($0,95 \times 10^4 \pm 0,02$ dyne/cm) não foi diferente dos *sham*-operados ($0,94 \times 10^4 \pm 0,02$ dyne/cm) (Figura 8).

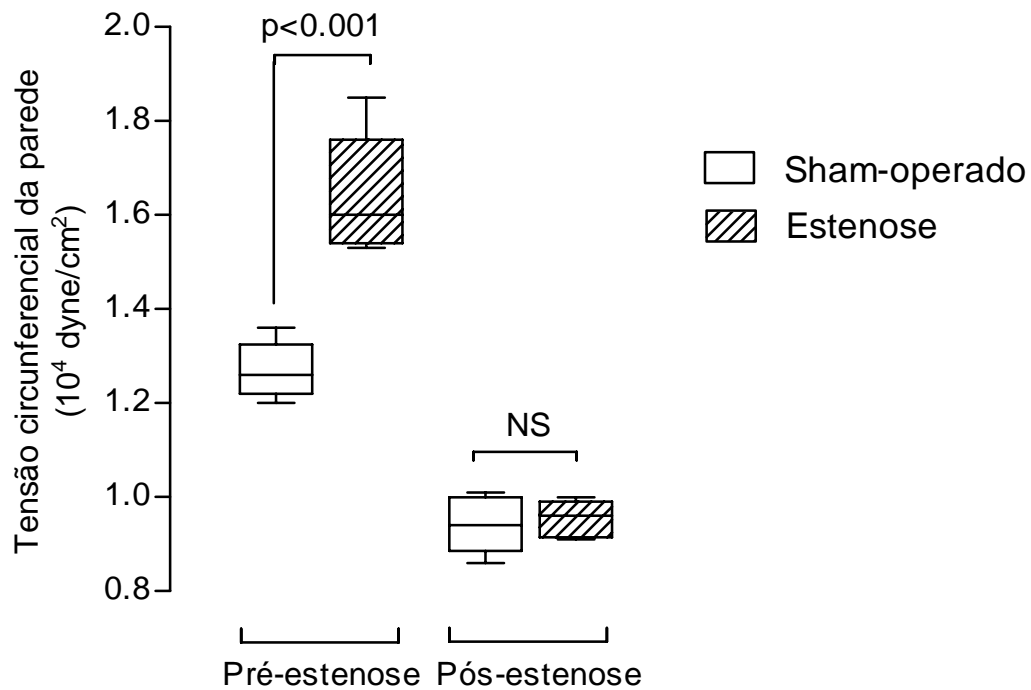


Figura 8: Tensão circunferencial da parede das aortas dos animais estenosados nos segmentos pré-estenose e pós-estenose e segmentos correspondentes dos *sham*-operados no 28º dia do experimento. A tensão de cisalhamento na parede no segmento pré-estenose dos animais operados foi significativamente maior se comparada a mesma região dos controles. Não houve diferença na tensão de cisalhamento da parede no segmento pós-estenose entre os animais controles e estenosados.

O estresse tensional dos animais estenosados e *sham*-operados foi similar nos segmentos pré-estenose ($128,8 \times 10^4 \pm 5,28$ dyne/cm² e $127,5 \times 10^4 \pm 5,69$, respectivamente) e pós-estenose ($96,06 \times 10^4 \pm 5,58$ dyne/cm² e $98,99 \times 10^4 \pm 5,28$ dyne/cm²) (Figura 9).

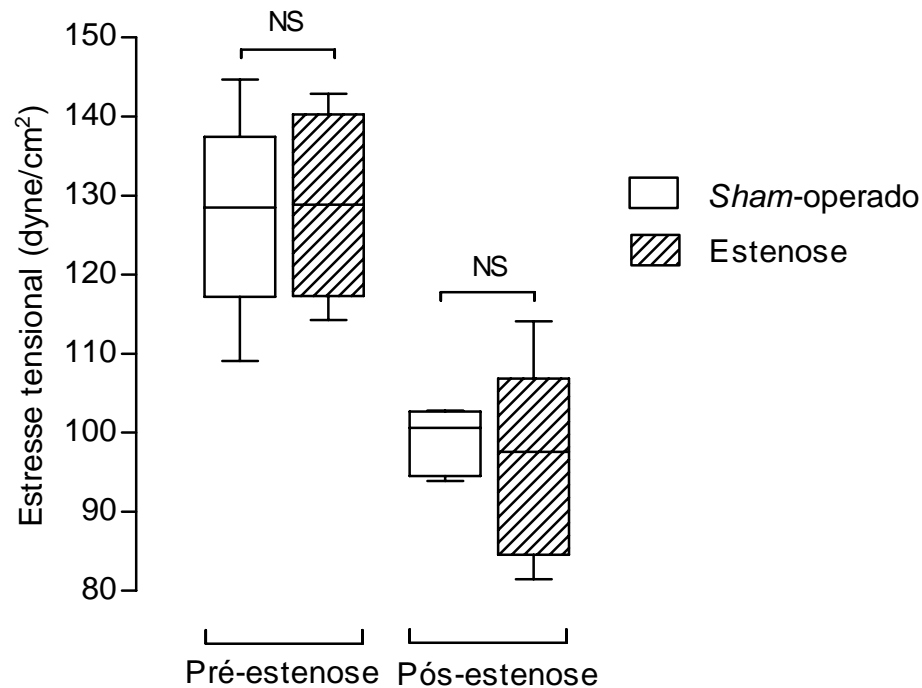


Figura 9: Estresse tensional da parede das aortas dos animais estenosados nos segmentos pré-estenose e pós-estenose e segmentos correspondentes dos *sham*-operados no 28º dia do experimento. Não houve diferença entre os valores observados nos segmento pré-estenose e pós-estenose em ambos os grupos.

4.5 Estudo morfológico

Parede da aorta

Macroscopicamente, as aortas dos animais *sham*-operados e estenosados pareceram similares, exceto a área de estenose. O uso de material incluído em plástico permitiu secções mais finas com adequada resolução dos detalhes estruturais. As aortas demonstraram marcantes alterações nos animais estenosados se comparados aos *sham*-operados. O segmento pré-estenose apresentou espessamento intimal difuso com células endoteliais aumentadas em tamanho e conspícuas placas neointimais difusas, compostas de células musculares lisas e raras células mononucleares com colágeno e fibras elásticas envolvendo-as, e espessamento

medial, contrastando com a delicada estrutura da íntima e a média da aorta do grupo controle. No segmento pós-estenose, a íntima pareceu delicada, quase semelhante a região correspondente dos *sham*-operados, exceto por conspícuas placas neointimais focalmente distribuídas, maiores que aquelas presentes no segmento pré-estenose (Figura 10).

Coração

Os corações dos animais controles e estenosados apresentaram-se semelhantes ao exame macroscópico, à exceção dos corações dos estenosados que se encontravam mais volumosos. O peso médio dos corações dos animais estenosados foi 20,7% maior em comparação aos *sham*-operados e o índice de peso do coração (peso do coração/peso corporal) dos animais estenosados foi 36,5% maior que o observado para os animais *sham*-operados (Tabela 2). Sendo o peso corporal de um animal uma importante fonte de variabilidade do peso do órgão, parece óbvio que o peso do órgão fosse correlacionado com as diferenças no peso corporal. O peso corporal e dos corações de um grande número de animais (ratos machos normais), com peso variando entre 50 g e 450 g, foram coletados e expressos em uma curva relacionando o peso do coração e peso corporal [Rossi et al., 1981]. Usando este método foi possível comparar o peso úmido dos corações dos animais de ambos os grupos ao peso úmido dos animais com mesmo peso corporal (Tabela 2). O peso médio dos corações dos animais estenosados foi 20% maior em comparação ao peso esperado dos corações de animais de peso corporal semelhante, enquanto que o peso dos corações dos animais *sham*-operados não foi diferente do peso corporal esperado para animais de peso corporal semelhante.

A análise das secções coradas com picrossírius vermelho revelou moderada fibrose nos animais estenosados se comparada aos *sham*-operados. Esta fibrose manifestou-se por discreto

aumento na quantidade de matriz colagênica endomissial e perimissial e também fibrose perivascular moderada (Figura 11).

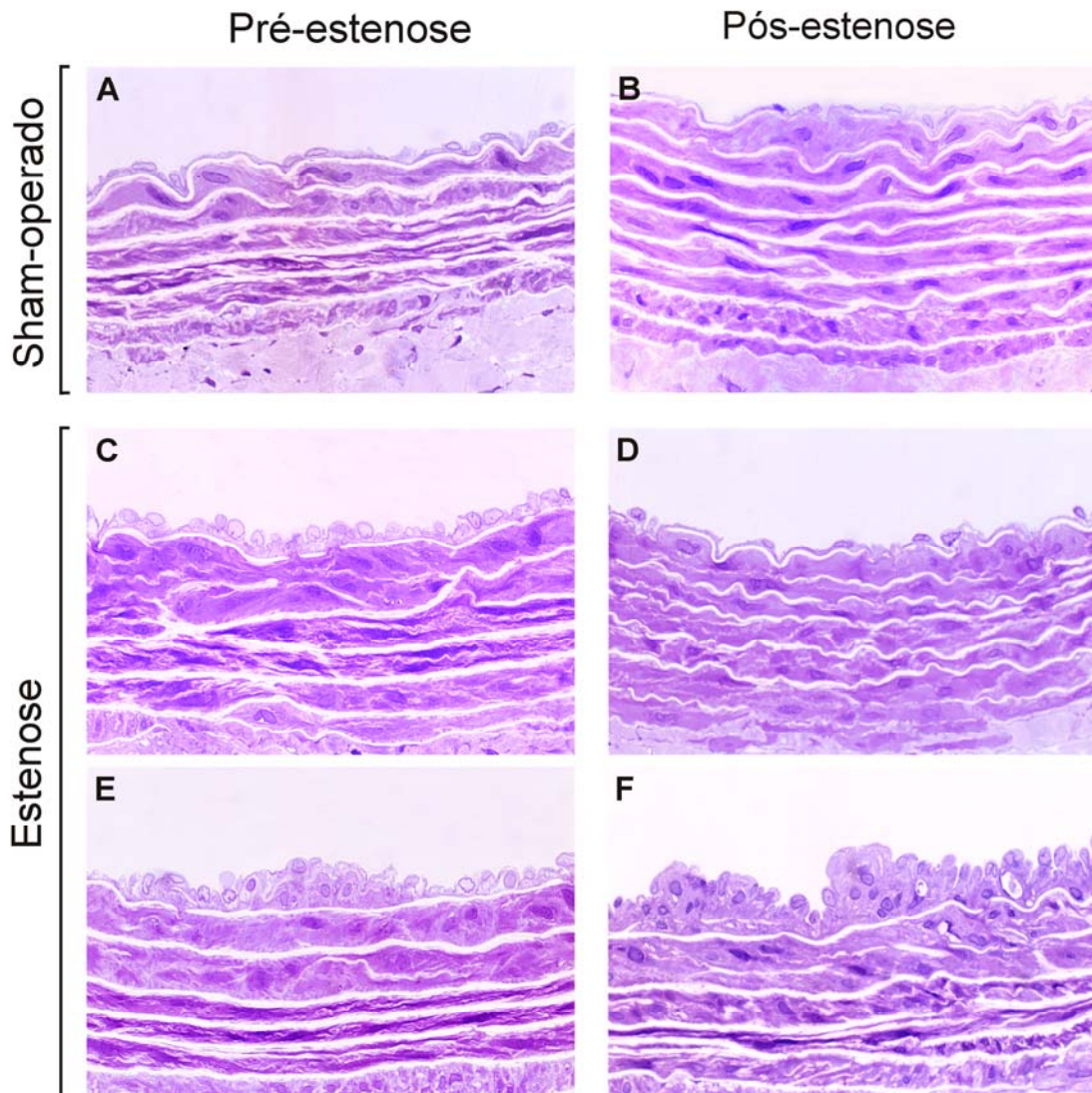


Figura 10: Microscopia óptica de alta resolução. Imagens representativas das aortas dos animais *sham*-operados (A e B) e segmentos pré-estenose (C e E) e pós-estenose (D e F). O segmento pré-estenose dos animais operados apresenta um difuso espessamento intimal com células endoteliais aumentadas em tamanho (C) e pequenos focos de espessamento intimal difusamente distribuídos, compostos de células musculares lisas, ocasionais células mononucleares, fibras colágenas e elásticas (E) e espessamento medial (C e E), contrastando com a delicada estrutura da íntima nos animais controles (A). No segmento pós-estenose, a íntima apareceu delicada (D), quase similar a íntima da região correspondente dos controles (B), exceto por áreas focalmente distribuídas de grande espessamento intimal (F). Coloração azul de toluidina. Aumento de todas as figuras 750x.

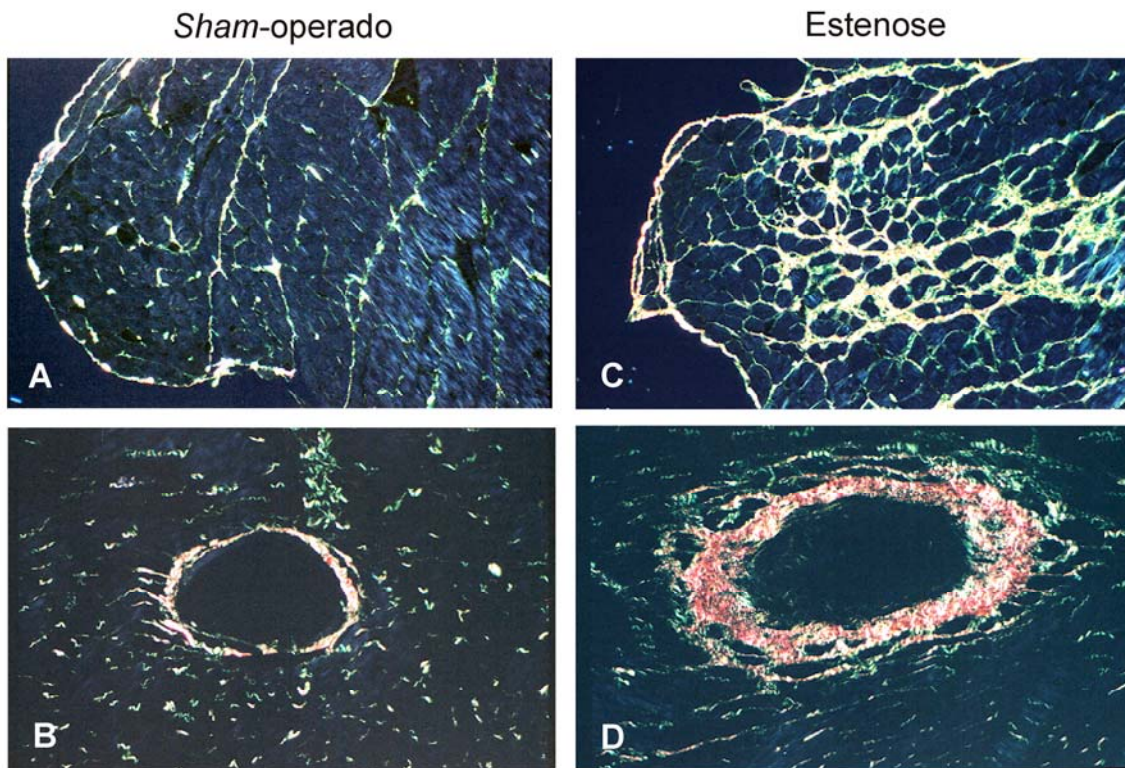


Figura 11: Corações dos animais *sham*-operados e estenosados. Fibrose miocárdica nos animais estenosados, manifestada por aumento na quantidade de colágeno endomisial e perimisial (C) e, fibrose perivascular (D) em relação aos animais controles (A e B, respectivamente). Coloração de picrosirius vermelho sob luz polarizada. Aumento de todas as figuras 385x.

4.6 Análise morfométrica

Aorta

A espessura intimal média na região pré-estenose foi $12,68 \pm 0,60 \mu\text{m}$, 26% mais espessa que os valores nos *sham*-operados, $10,03 \pm 0,60 \mu\text{m}$. Do mesmo modo, a espessura da camada média na região pré-estenose ($115,10 \pm 3,81 \mu\text{m}$) foi 23% maior se comparada aos *sham*-operados ($93,96 \pm 2,98 \mu\text{m}$). Em contraste, a espessura intimal no segmento pós-estenose, $9,91 \pm 1,30 \mu\text{m}$, não apresentou diferença do valor determinado para o controle, $8,80 \pm 0,50 \mu\text{m}$. O mesmo ocorreu com a espessura da camada média dos animais estenosados ($90,42 \pm 3,91 \mu\text{m}$) e *sham*-operados ($88,11 \pm 3,02 \mu\text{m}$) (Tabela 3).

Não houve diferença na área da luz do vaso, no perímetro, no diâmetro e número de unidades lamelares da túnica média observadas nas regiões pré-estenose e pós-estenose em comparação com os respectivos controles. Todavia, estas variáveis foram significativamente menores na região pós-estenose em comparação com aquelas da região pré-estenose em ambos os grupos (Tabela 3).

A quantidade relativa de colágeno, expressa em porcentagem, presente nas camadas íntima e média do segmento pré-estenose dos animais operados aumentou 21.5% ($10,92 \pm 0,67\%$) se comparada com a mesma região dos animais *sham*-operados ($8,99 \pm 0,48\%$). O mesmo não pôde ser observado na região pós-estenose dos animais operados ($5,47 \pm 0,50\%$) e controles ($6,04 \pm 0,57\%$) (Figura 12A). A figura 12B mostra o padrão de distribuição dos valores da fração de colágeno do complexo íntima-média e espessura do complexo íntima-média. O coeficiente de correlação para os animais controles foi $r=0.000014$ e para o segmento pré-estenose dos animais operados foi $r=0.01693$. Embora houvesse um aumento na quantidade relativa de colágeno no segmento hipertensivo, não houve correlação entre a quantidade de colágeno e espessura da parede durante o período estudado.

Tabela 3. Espessura da camada íntima e média, área da luz do vaso, perímetro, diâmetro e número de unidades lamelares da camada média das aortas dos animais *sham*-operados e estenosados.

	Segmento pré-estenose		Segmento pós-estenose	
	<i>Sham</i> -operado	Estenose	<i>Sham</i> -operado	Estenose
Espessura íntima (μm)	$10,03 \pm 0,60$	$12,68 \pm 0,60^*$	$8,80 \pm 0,50$	$9,91 \pm 1,30$
Espessura média (μm)	$93,69 \pm 2,98$	$115,10 \pm 3,81^{***}$	$88,11 \pm 3,02$	$90,42 \pm 3,91$
Área da luz (mm)	$1,75 \pm 0,07$	$1,81 \pm 0,09$	$0,83 \pm 0,05$	$0,84 \pm 0,05$
Perímetro (mm)	$6,28 \pm 0,15$	$6,32 \pm 0,11$	$4,90 \pm 0,30$	$4,40 \pm 0,17$
Diâmetro (mm)	$1,49 \pm 0,03$	$1,51 \pm 0,04$	$1,10 \pm 0,08$	$1,03 \pm 0,03$
Unidades lamelares	$7,68 \pm 0,26$	$7,58 \pm 0,18$	$6,40 \pm 0,16$	$6,43 \pm 0,21$

Os dados são a média \pm erro padrão. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

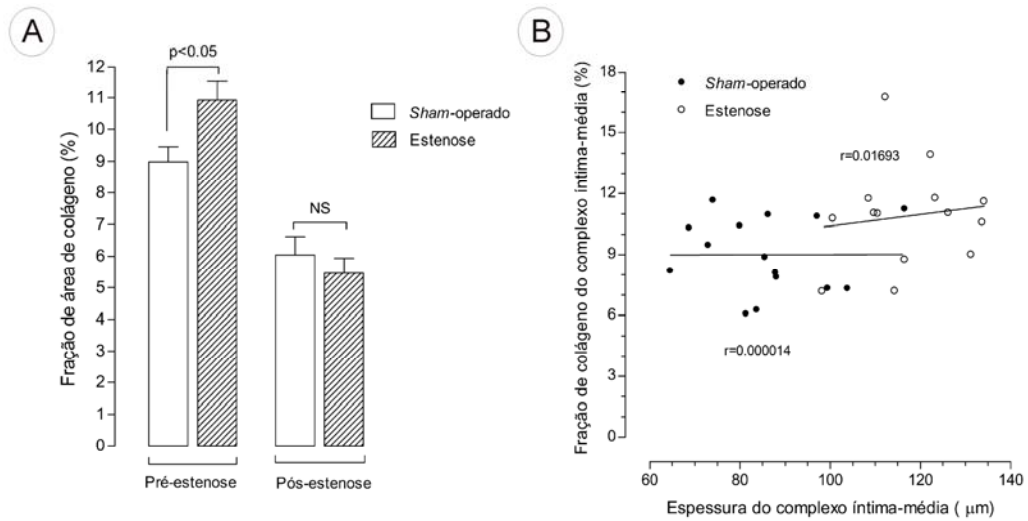
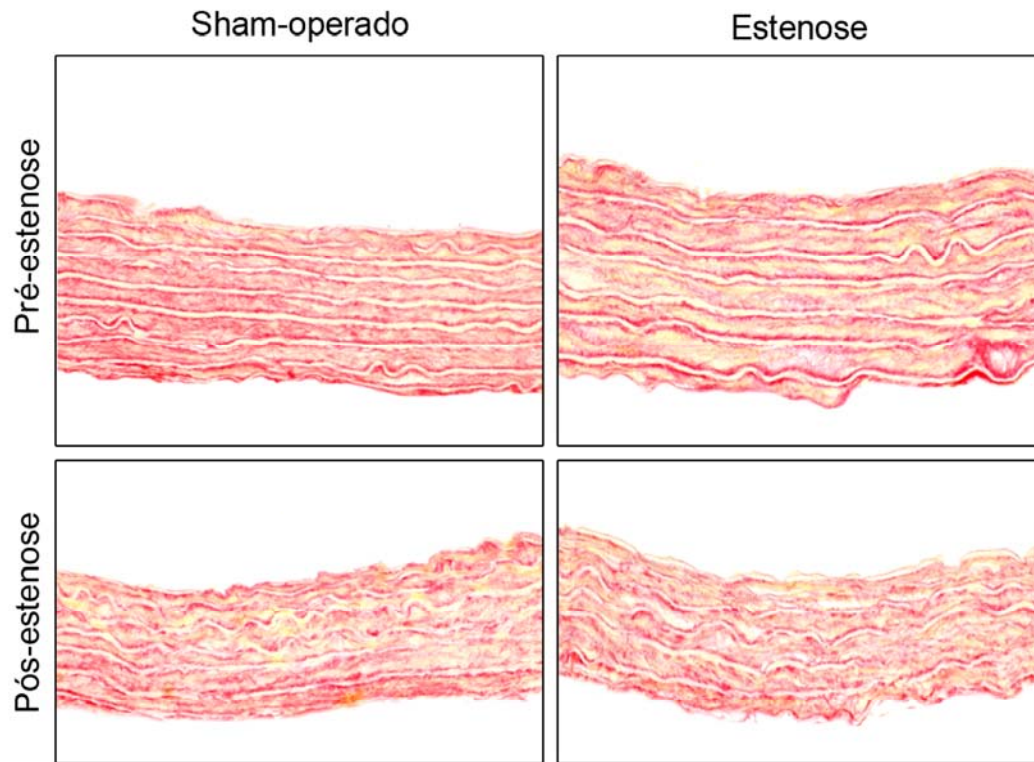


Figura 12: Complexo íntima-média dos animais *sham*-operados e estenosados corado com picrosirius vermelho. Observa-se o aumento relativo da quantidade de colágeno na aorta dos animais estenosados no segmento pré-estenose em relação aos animais controles. O mesmo não foi observado na região pós-estenose (A). A figura B mostra o padrão de distribuição dos valores da fração de colágeno do complexo íntima-média e espessura do complexo íntima-média. Não houve correlação entre a quantidade de colágeno e espessura da parede durante o período estudado. Aumento de todas as figuras 240x.

Quando todos os valores obtidos na análise morfométrica da espessura da íntima são colocados em um gráfico de distribuição de frequência pode-se claramente observar um desvio à direita dos valores obtidos no segmento pré-estenose se comparados ao controle. Além disso, os discretos focos de espessamento intimal evidenciam-se (Figura 13A). A distribuição de frequência dos valores obtidos no segmento pós-estenose é semelhante a dos controles, exceto pela ocorrência dos marcantes focos de espessamento intimal (Figura 13B). Na distribuição de frequência dos valores da espessura da média pode-se observar o mesmo fenômeno de desvio à direita dos valores no segmento pré-estenose em comparação com o segmento correspondente dos controles, evidenciando o espessamento da camada média (Figura 14A). A distribuição de frequência da espessura da média no segmento pós-estenose foi similar à observada no segmento correspondente ao controle (Figura 14B).

Coração

Os corações não apresentaram diferença entre a área do ventrículo esquerdo dos animais do grupo estenosado ($18,66 \pm 1,08 \text{ mm}^2$) e controle de peso ($18,54 \pm 0,65 \text{ mm}^2$). O mesmo ocorreu entre a área do ventrículo direito do grupo estenosado ($8,34 \pm 0,55 \text{ mm}^2$) e controle de peso ($9,85 \pm 0,74 \text{ mm}^2$). A espessura da parede livre do ventrículo esquerdo dos animais estenosados foi 19% maior e a espessura do septo 35% maior em comparação aos controles de peso. A espessura da parede do ventrículo direito dos animais estenosados não diferiu dos controles de peso. (Tabela 4).

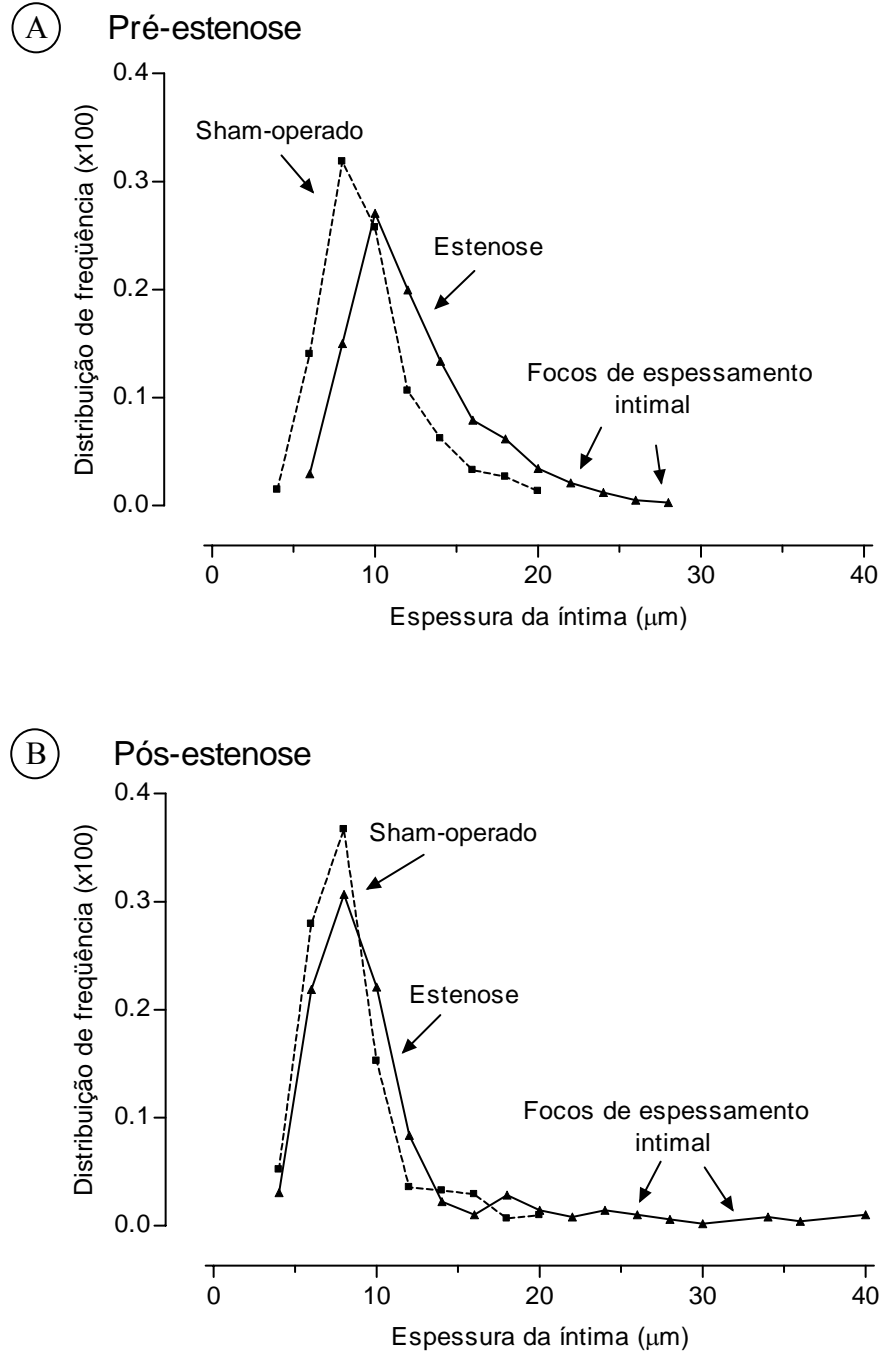


Figura 13: Distribuição de frequência dos valores da espessura da íntima dos animais *sham*-operados e estenosados. Observa-se a mudança para direita dos valores no segmento pré-estenose em comparação com o segmento correspondente dos controles. Evidencia-se os discretos focos de espessamento intimal, ausentes nos controles (A). A distribuição de frequência da espessura da íntima no segmento pós-estenose foi quase similar a observada no segmento correspondente ao controle, exceto pela demonstração de ocorrência de marcantes focos de espessamento intimal, ausentes nos controles (B).

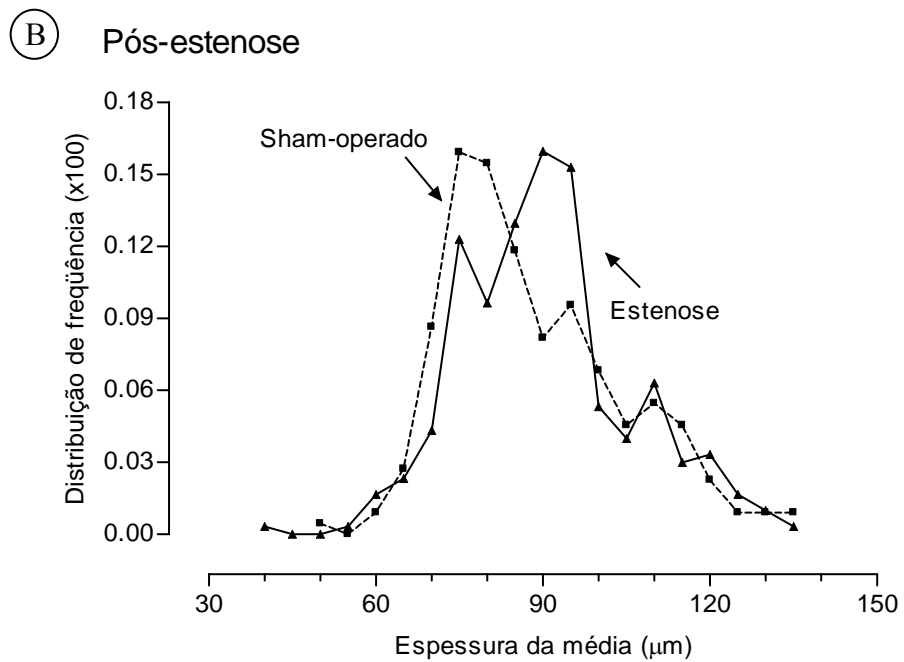
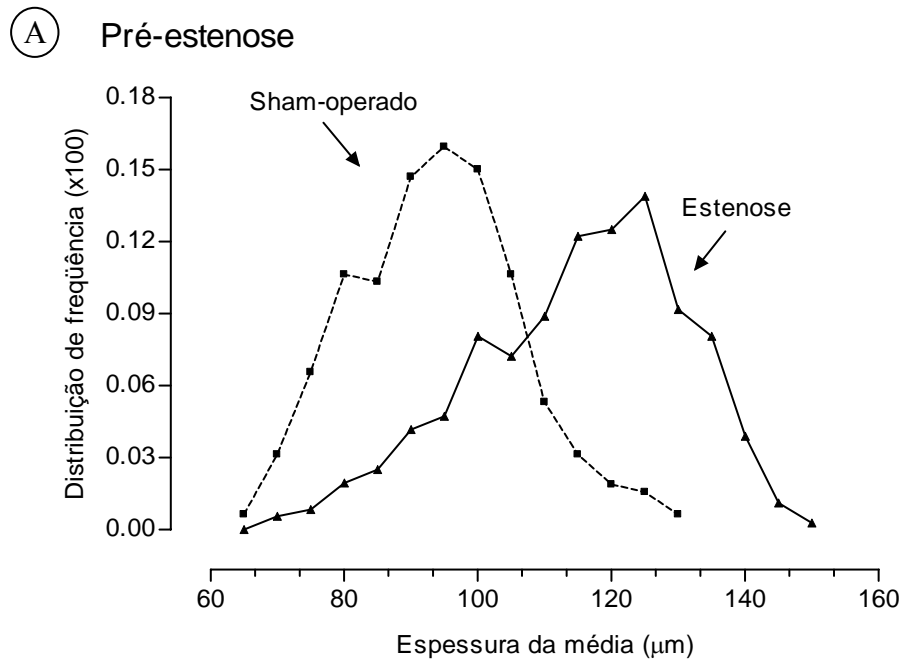


Figura 14: Distribuição de frequência dos valores da espessura da média dos animais *sham*-operados e estenosados. Observa-se a mudança para direita dos valores no segmento pré-estenose em comparação com o segmento correspondente dos controles, evidenciando o espessamento da camada média. A distribuição de frequência da espessura da média no segmento pós-estenose foi similar a observada no segmento correspondente do controle (B).

Tabela 4. Área da câmara ventricular direita e esquerda e espessura da parede dos ventrículos direito e esquerdo e do septo dos animais *sham*-operados e estenosados.

	Área da câmara ventricular (mm ²)			Espessura (mm)		
	<i>Sham</i> -operado	Estenose	Esperado	<i>Sham</i> -operado	Estenose	Esperado
VE	17,24 ± 1,53	18,66 ± 1,08	18,54 ± 0,65	2,30 ± 0,10	2,46 ± 0,07**	2,07 ± 0,06
VD	7,46 ± 0,84	8,34 ± 0,55	9,85 ± 0,74	0,84 ± 0,04	0,80 ± 0,03	0,79 ± 0,05
Septo				1,79 ± 0,09	2,03 ± 0,07***	1,50 ± 0,04

Os dados são a média ± erro padrão. **p<0.01 ***p<0.0001 quando comparados ao peso esperado de animais de peso corporal semelhante. VE, ventrículo esquerdo; VD, ventrículo direito.

4.7 Análise ultraestrutural

Microscopia eletrônica de transmissão

A aparência da íntima das aortas controles não diferiu dos achados da literatura. A íntima foi composta de uma camada contínua de células endoteliais dispostas sobre uma fina camada de tecido de suporte fibrocolagenoso. Este era contínuo com a camada média, composta de células musculares lisas reforçada por camadas organizadas de fibras elásticas formando lâminas elásticas e fibras colágenas. Abaixo da íntima havia uma ampla camada de fibras elásticas organizadas, interrompidas por fenestras, a lâmina elástica interna (Figura 15).

Na região pré-estenose, a íntima estava difusamente expandida, principalmente devido ao aumento das células endoteliais mostrando contornos citoplasmáticos e nucleares irregulares dispostas sobre um material parecido com membrana basal e delicado tecido fibrocolagenoso de suporte. As células endoteliais apresentavam maior quantidade de organelas e citoplasma em seu interior. Conspícuas placas neointimais discretas focalmente distribuídas puderam ser observadas. Estas eram compostas de aglomerados de células musculares lisas, organizadas ao

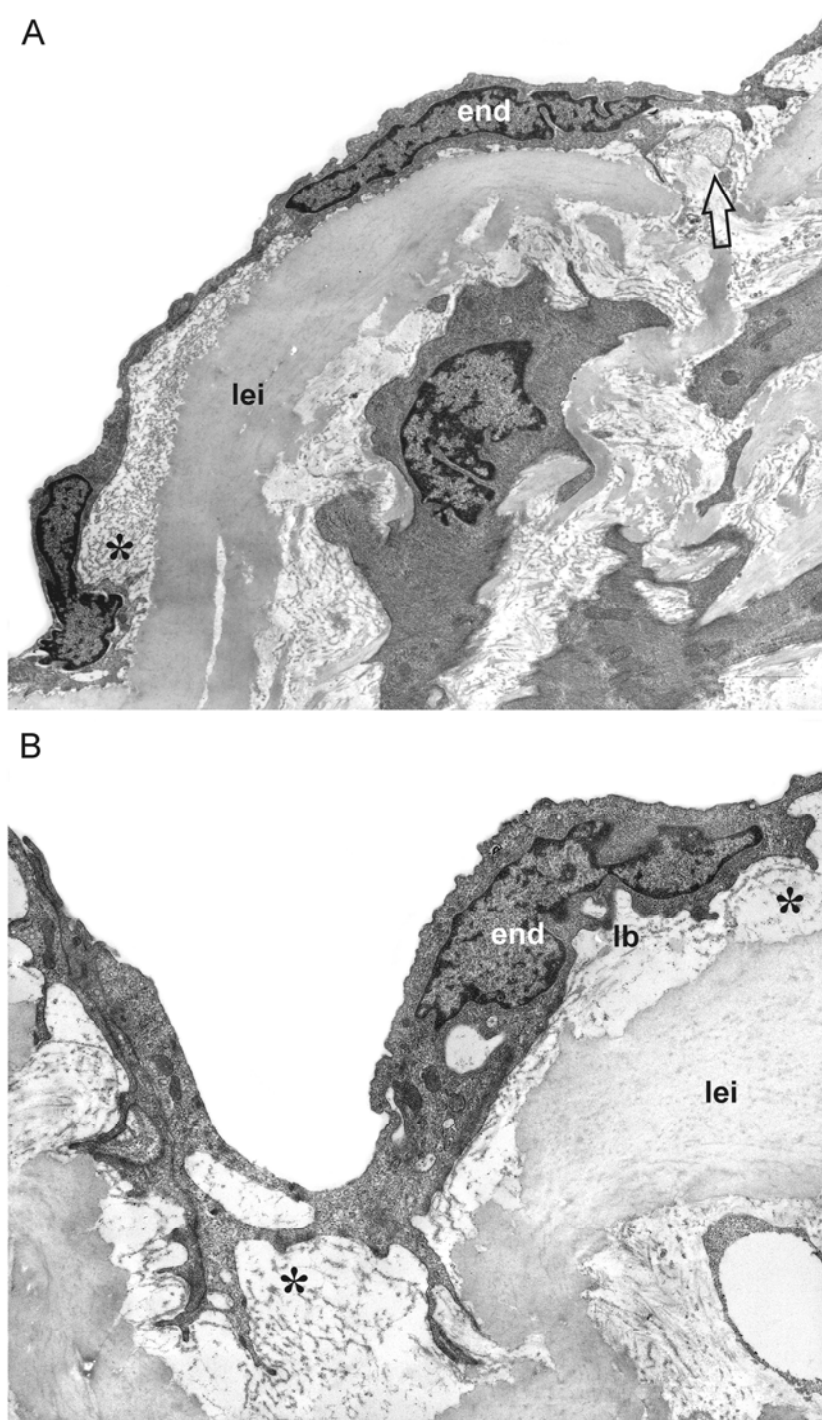


Figura 15: Microscopia eletrônica de transmissão. Aspectos representativos da aorta dos animais *sham*-operados. A estrutura delicada da íntima contém células endoteliais achatadas (end), dispostas sobre a lâmina basal (lb), discreta quantidade de matriz extracelular (*) e lâmina elástica interna (lei). Aumentos: figura A=6400x, figura B=10100x.

acaso, envolvidas por material parecido com membrana basal, fibras elásticas jovens e colágeno. Migração de células musculares lisas da camada média para íntima através de fenestras pôde ser vista. Raras células mononucleares foram detectadas nas camadas íntimas expandidas. A camada média permaneceu intacta e as células musculares lisas inalteradas, mantendo sua orientação em relação ao vaso (Figura 16).

No segmento pós-estenose, a íntima pareceu comparável ao segmento correspondente dos *sham*-operados, exceto pelas conspícuas placas neointimais focalmente distribuídas. Os focos eram similares aos observados no segmento pré-estenose, porém de maior tamanho. Nenhuma alteração pôde ser vista na média (Figura 17).

Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura demonstrou que as células endoteliais em toda a aorta dos animais *sham*-operados apresentaram morfologia típica de “calçamento em pé-de-moleque”, com o eixo maior paralelo em direção ao fluxo. Pregas marcaram as margens das células endoteliais. A superfície luminal apresentava microvilosidades espalhadas, principalmente aglomeradas sobre os montículos nucleares. As células endoteliais no segmento pré-estenose eram, comparativamente, mais alongadas em direção ao fluxo e mais volumosas, com montículos nucleares proeminentes. Estas células eram, no entanto, pior definidas, com margens celulares pouco evidentes devido a pobreza de pregas marginais e microvilosidades na superfície celular. Em contraste, o segmento pós-estenose revelou focos de células poligonais não direcionadas em relação ao fluxo. Além disto, as células eram menos volumosas comparadas as do segmento pré-estenose, mas, similarmente, pouco definidas, com

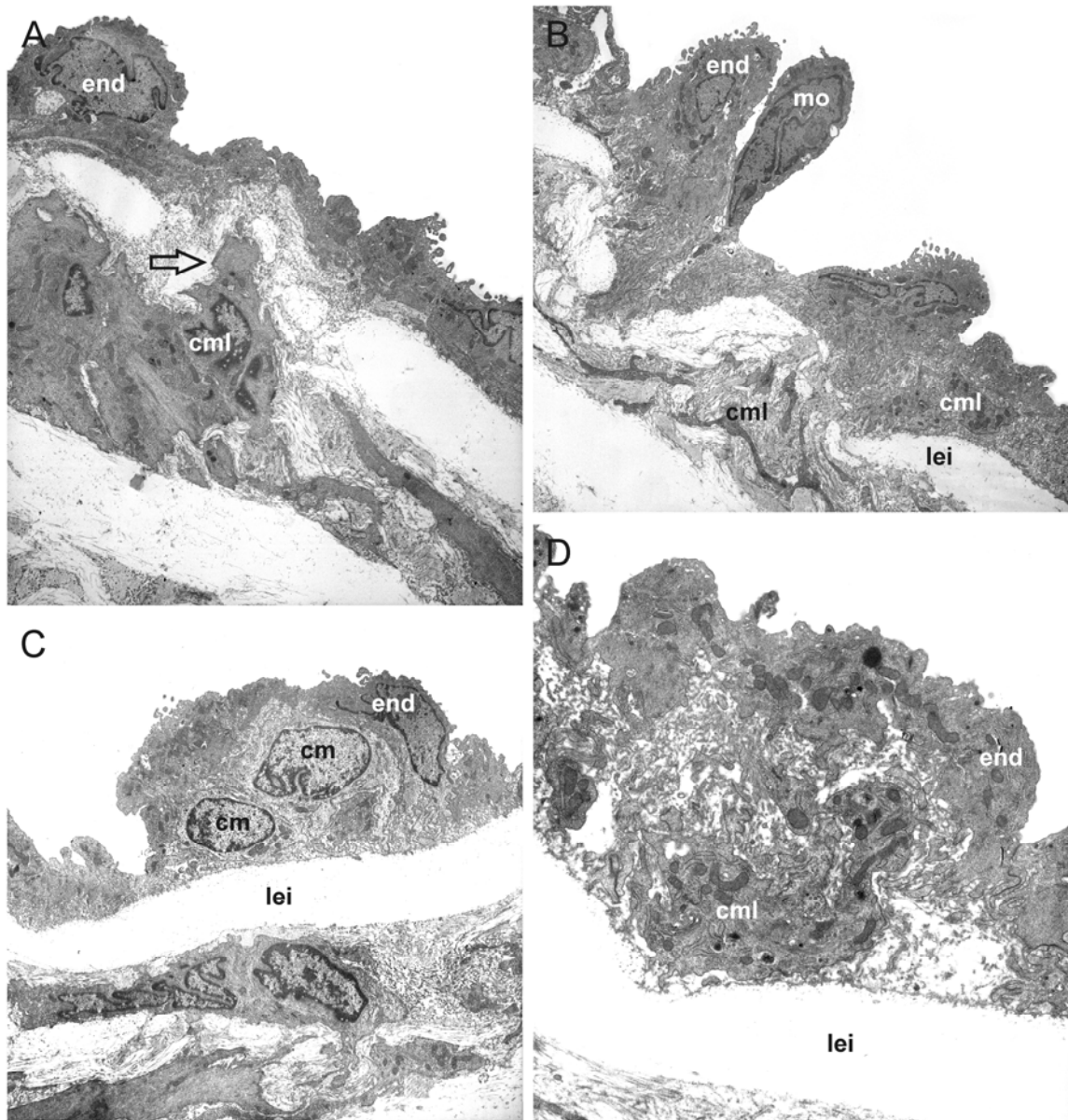


Figura 16: Microscopia eletrônica de transmissão. Aspectos representativos do segmento pré-estenose da aorta. A íntima é espessada, apresentando células endoteliais heterogêneas (end) com contornos citoplasmáticos e nucleares irregulares. Acúmulo focal de células mononucleares (cm) pode ser observado na íntima espessada (C). Aglomerados de células musculares lisas (cml) aparecem dentro da íntima, organizados ao acaso, envolvidos por fibras elásticas e colágeno (B e D). Migração de células musculares lisas da média para íntima (seta) através das fenestras da lâmina elástica interna (lei) pode ser vista (A). Um monócito (mo) penetrando entre duas células endoteliais pode ser observado (B). Aumentos: figura A=3300x, figura B=3000x, figura C=2900x e figura D=8100x.

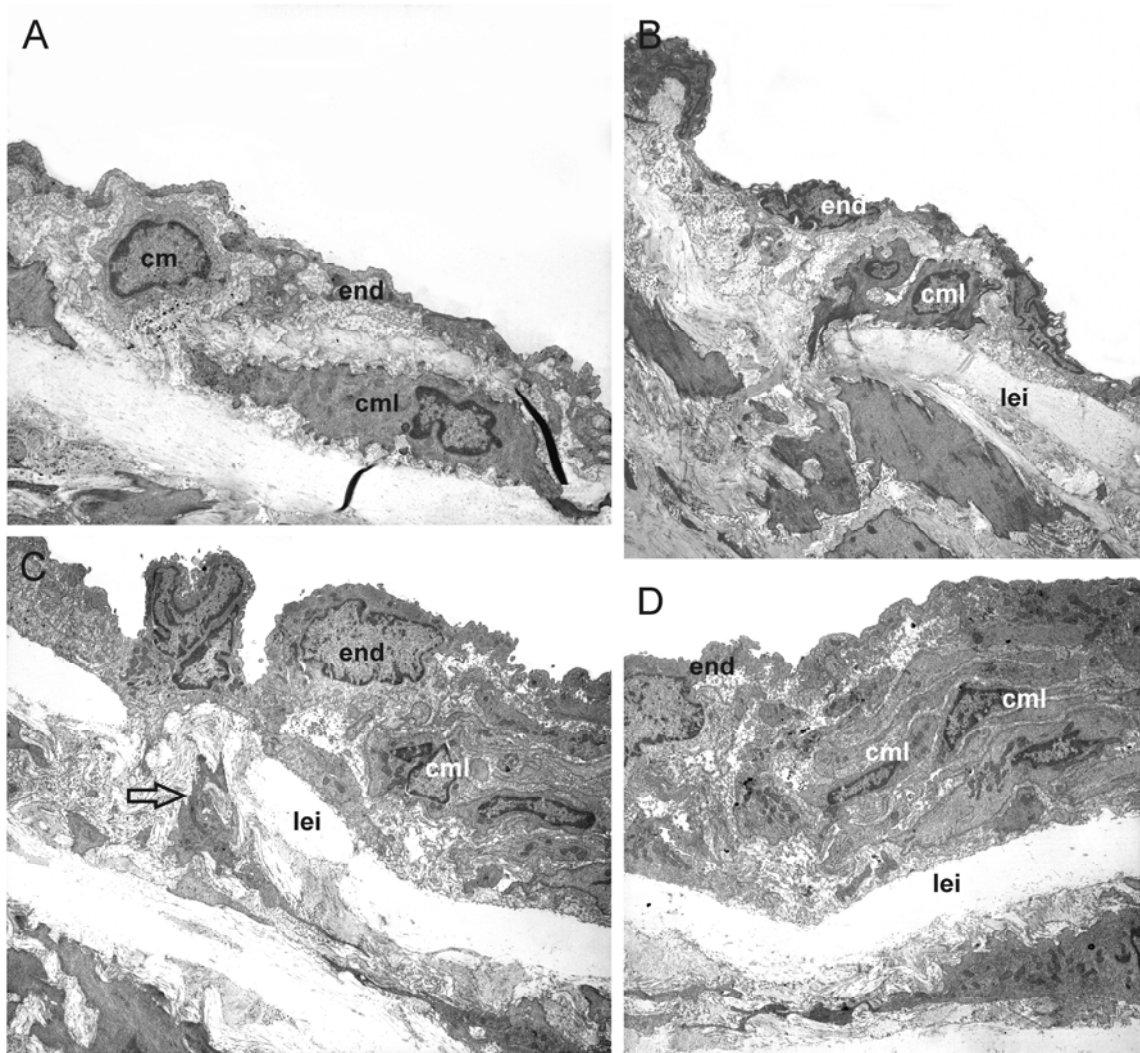


Figura 17: Microscopia eletrônica de transmissão. Aspectos representativos do segmento pós-estenose da aorta. A íntima pareceu similar se comparada ao segmento correspondente dos *sham*-operados. As células endoteliais (end) são achatadas, dispostas sobre uma fina camada de tecido de suporte. Marcantes focos de espessamento intimal difusamente distribuídos, compostos de células musculares lisas (cml) e ocasionais células mononucleares circundados por fibras colágenas e elásticas, podem ser vistos (C e D). A migração de células musculares lisas da média para íntima (seta) através das fenestras da lâmina elástica interna (lei) pode ser vista (B). Aumentos: figura A=5400x, figura B=3100x, figura C=3200x e figura D=3100x.

pregas marginais menos evidentes e menos microvilosidades sobre a superfície celular (Figura 18).

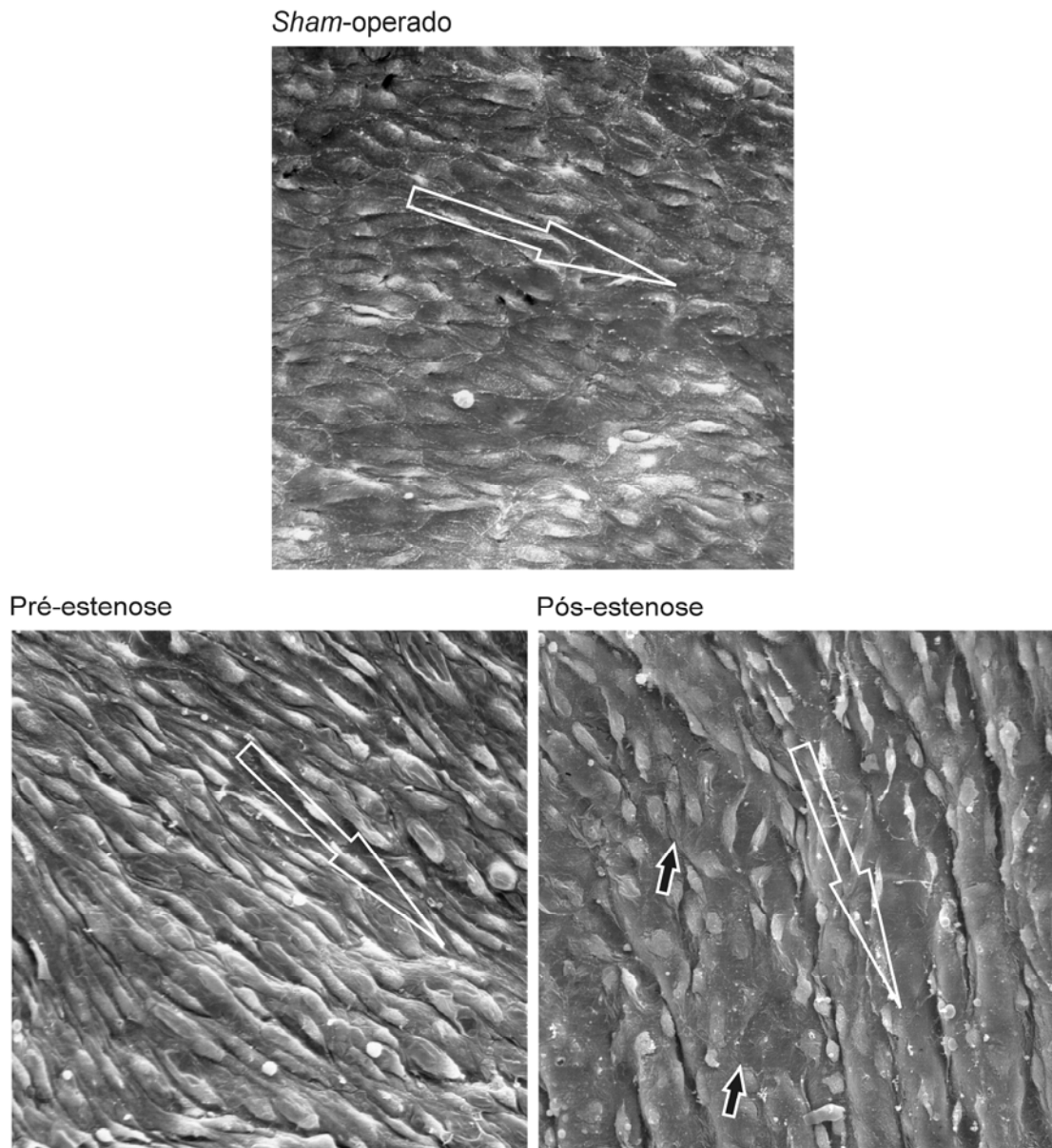


Figura 18: Microscopia eletrônica de varredura. Aspectos representativos da superfície endotelial dos animais *sham*-operados apresentando morfologia típica de “calçamento em pé-de-moleque”, com o eixo maior em direção ao fluxo. No segmento pré-estenose, as células endoteliais são mais volumosas e alongadas e com o eixo maior em direção ao fluxo sanguíneo (seta aberta). O segmento pós-estenose apresentou células endoteliais menos volumosas e focos de células poligonais não direcionadas em relação ao fluxo (setas pequenas). Aumento de todas as figuras 660x.

4.8 Estudo imunoistoquímico

A análise imunoistoquímica revelou um aumento na expressão de eNOS nas células endoteliais, iNOS e nitrotirosina nas células endoteliais e musculares lisas e TGF β nas células endoteliais e, principalmente, células musculares lisas no segmento pré-estenose se comparados aos *sham*-operados. No segmento pós-estenose, somente um aumento na expressão de eNOS nas células endoteliais pôde ser observado em comparação aos controles (Figura 19). A figura 20 mostra os resultados da avaliação quali-quantitativa da imunoreatividade para expressão de eNOS, iNOS, nitrotirosina e TGF β .

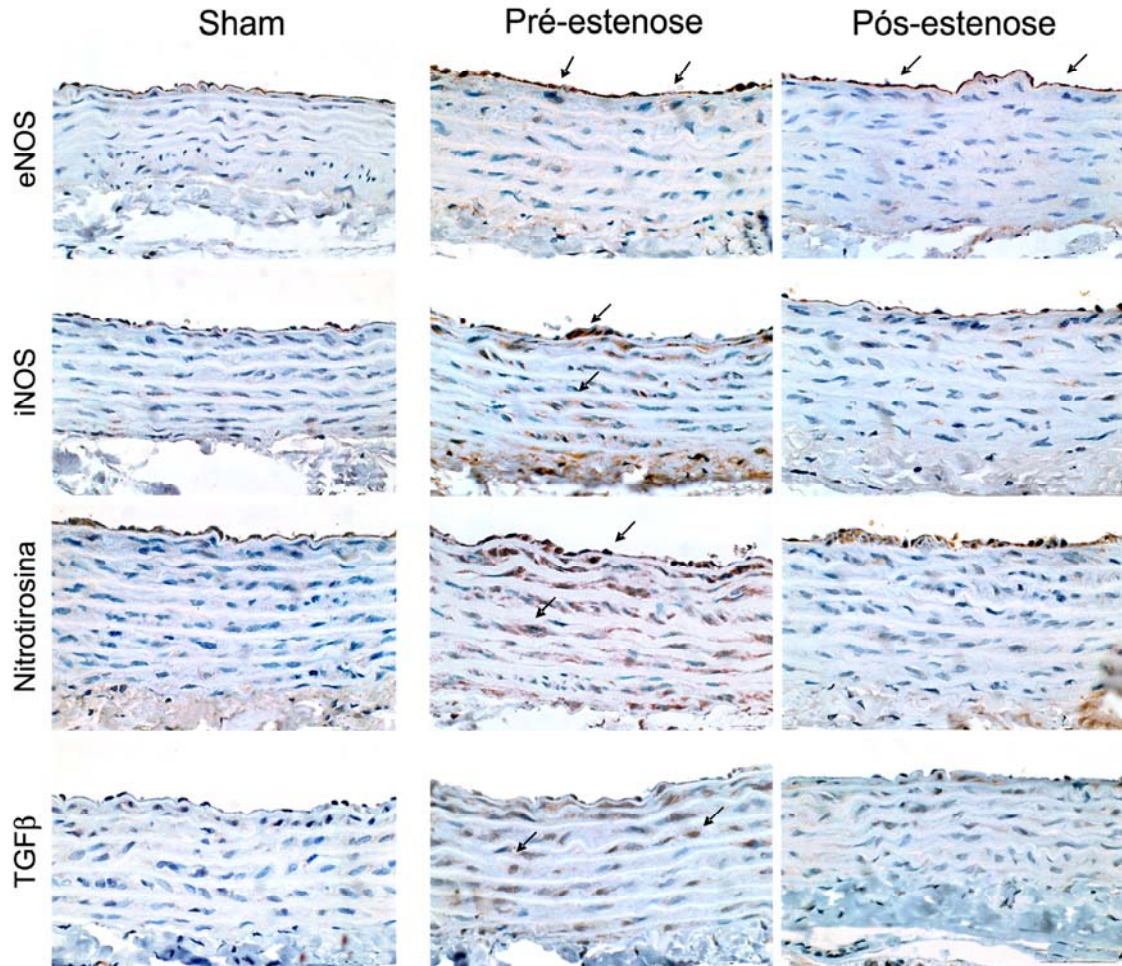


Figura 19: Imunoistoquímica. Imagens representativas das aortas dos segmentos pré-estenose e pós-estenose e segmentos correspondentes dos *sham*-operados. Expressão aumentada de eNOS nas células endoteliais, iNOS e nitrotyrosina nas células endoteliais e células musculares lisas e TGF- β nas células endoteliais e, principalmente, células musculares lisas (seta) no segmento pré-estenose em comparação ao *sham*-operado. No segmento pós-estenose observou-se somente o aumento da expressão de eNOS em comparação ao segmento correspondente do controle. Aumento de todas as figuras 510x.

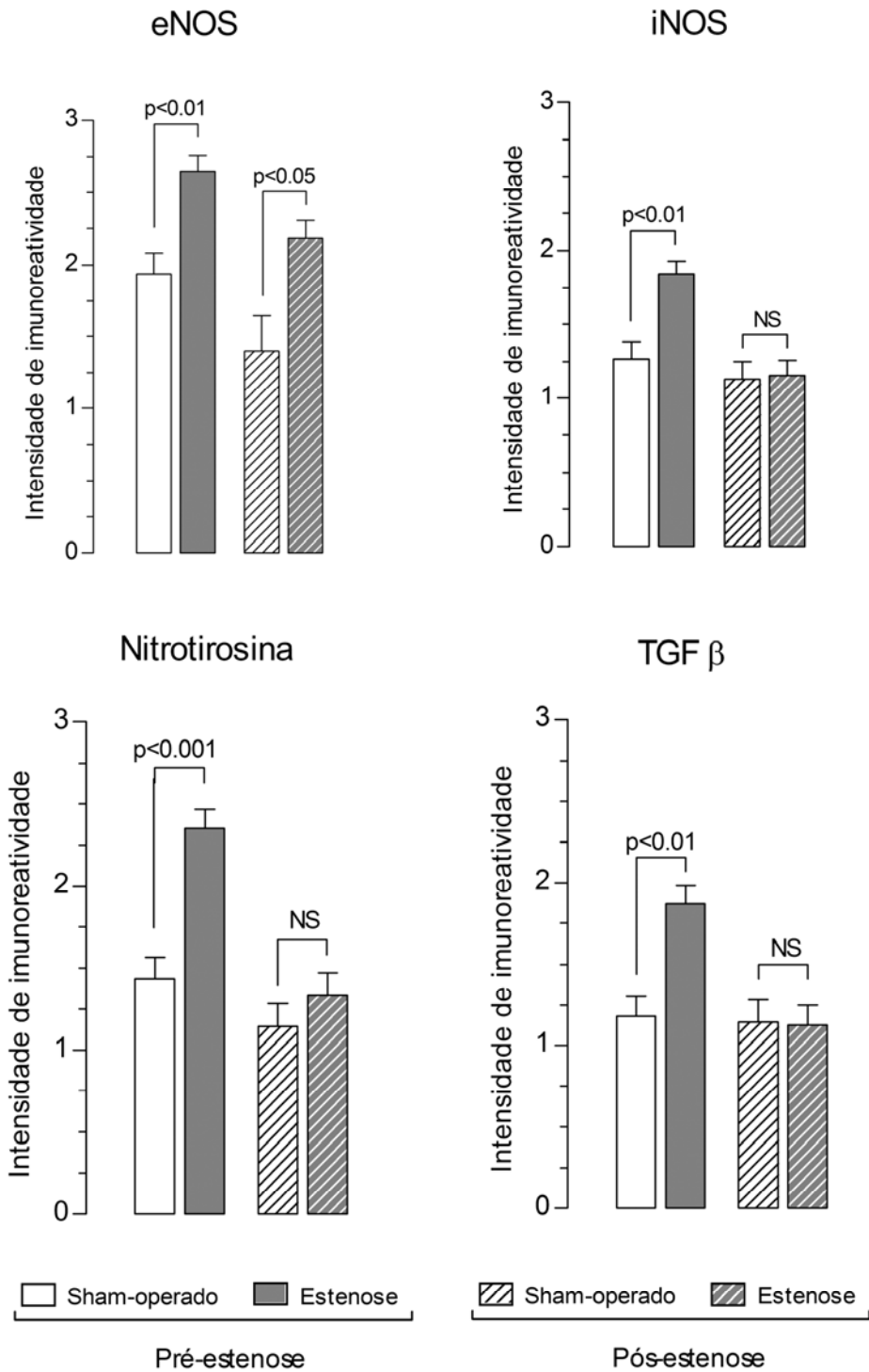


Figura 20: Avaliação quali-quantitativa da imunoreatividade para expressão de eNOS, iNOS, nitrotyrosina e TGFβ nos segmentos pré-estenose e pós-estenose e região correspondente dos controles.

5. Discussão

A constrição da aorta abdominal em torno de 81 % criou uma região pré-estenótica hipertensiva com tensão circunferencial da parede aumentada associada com estresse tensional normal, fluxo laminar e tensão de cisalhamento na parede normal e uma região pós-estenótica normotensiva com fluxo turbilhonar e baixa tensão de cisalhamento na parede associados com tensão circunferencial da parede e estresse tensional normais. A coarctação da aorta abdominal antes da bifurcação das artérias renais produz hipertensão acima e fluxo turbilhonar abaixo da estenose e provê um excelente modelo para o estudo simultâneo dos efeitos do aumento da pressão sangüínea e conseqüente estiramento do vaso e alterações do fluxo sangüíneo em um mesmo animal. Foi demonstrada em diferentes modelos de estenose da aorta abdominal e torácica a presença de dilatação pós-estenótica produzida em coelhos e cães. Sabe-se que para a formação da dilatação pós-estenótica, a constrição deve ser suficiente para produzir turbulência, mas não o bastante para que o fluxo distal e a pressão sangüínea sejam significativamente reduzidos [Dobrin, 1991; Ojha et al., 1990; Roach, 1963, 1970]. Roach (1963) demonstrou que a dilatação pós-estenótica somente se desenvolveu em cães do grupo de estenose moderada e foi ausente nos grupos de estenose mínima e grave. No presente estudo, após 28 dias da cirurgia, não foram observadas aortas com dilatação no segmento pós-estenose. Esse fato pode ser atribuído à presença de grave estenose da aorta abdominal, em torno de 81%, associado com a presença de fluxo sangüíneo reduzido no segmento pós-estenose. Além disso, estudos anteriores com este modelo não demonstraram a presença de dilatação pós-estenótica em ratos [Barton et al., 2001a; Beznák, 1955; Rossi & Peres, 1992; Stanek et al., 1987; Xu et al., 2001].

Os animais submetidos à constrição da aorta apresentaram um retardo no ganho de peso corporal em comparação aos *sham*-operados. O peso final dos controles foi 10.5% maior que o dos estenosados. Poderia se questionar ser resultado de deficiência nutricional. Isso é, todavia, pouco provável visto que os níveis de albumina dos estenosados foram similares aos dos animais *sham*-operados e hipoalbuminemia é um achado importante na desnutrição protéico-calórica [Viteri et al., 1964]. Além disto, a ingestão diária de ração estava bem acima do valor mínimo adequado de 15g/dia/animal para ratos em crescimento ou em manutenção [National Research Council, 1995].

A pressão arterial carotídea média dos animais estenosados estava 24.3% maior em comparação com pressão arterial carotídea média dos controles, enquanto que a pressão femoral foi similar a ambas as pressões carotídea e femoral dos *sham*-operados ao final dos experimento. Os mecanismos envolvidos na elevação da pressão arterial proximal à coarctação da aorta foram explorados por muitos investigadores. Duas visões gerais têm resultado desses estudos. A primeira, denominada hipótese mecânica, sugere que a hipertensão resultaria da resistência do fluxo sanguíneo ao próprio estreitamento e por vasos colaterias [Bing et al., 1948; Blumgart et al., 1931; Gupta & Wiggers, 1951]. A segunda, denominada hipótese renal, propõe que a hipertensão resultaria da alteração na hemodinâmica renal abaixo da constrição, estimulando a secreção de renina [Page, 1940; Steele, 1941; Stewart & Bailey, 1941]. Contrária a esta visão, foi demonstrado que a ativação do sistema renina-angiotensina, com altos níveis de concentração e atividade da renina plasmática, é uma resposta que ocorre apenas no início da constrição, retornando aos níveis normais em 7 a 10 dias [Akers et al., 2000; Wu et al., 2002; Yayama et al., 2004].

O peso médio dos corações dos animais estenosados foi 20.7% maior em comparação aos animais *sham*-operados. Sendo o peso corporal de um animal uma importante fonte de variabilidade do peso do órgão, a comparação entre o peso dos corações dos animais estenosados e animais de peso corporal semelhante demonstrou um aumento de 20% no peso dos corações dos animais estenosados. A pressão arterial aumentada proximal a coarctação tem sido demonstrada ser um estímulo para o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca [Rossi & Peres, 1992]. A hipertrofia cardíaca observada nos corações dos animais estenosados, além de ser caracterizada pelo peso do coração, também pôde ser evidenciada pela presença aumentada de colágeno endomisial e perimisial e fibrose perivascular. Foi demonstrado em estudos anteriores a presença de fibrose miocárdica usando o mesmo modelo experimental [Rossi & Peres, 1992] ou em corações humanos de pacientes hipertensos [Rossi, 1998; Weber et al., 1994].

O estudo da parede da aorta no segmento hipertensivo demonstrou, tanto na microscopia óptica de alta resolução quanto na microscopia eletrônica de transmissão, espessamento endotelial difuso em que as células endoteliais eram heterogêneas, a maioria delas com contornos citoplasmáticos e nucleares enrolados. Além disto, houve a presença de conspícuas placas neointimais difusas, compostas de células musculares lisas e raras células mononucleares entremeadas com material semelhante à membrana basal e fibras colágenas. Esses achados estão de acordo com a literatura que mostra que as artérias na presença de hipertensão são espessadas, com acúmulo de macrófagos, migração e proliferação de células musculares lisas e espessamento intimal e medial [Alexander, 1995; Chobanian, 1990; Haudenschild et al., 1981]. Essas placas neointimais não apresentavam estrias gordurosas. A razão dos animais continha baixos níveis de gordura e o nível de colesterol sanguíneo estava

dentro da normalidade. O estudo com microscopia eletrônica de varredura demonstrou que as células endoteliais eram alongadas em direção ao fluxo sanguíneo, volumosas, com montículos nucleares proeminentes e bordos celulares pouco evidentes devido a falta de pregas marginais e microvilosidades na superfície celular. Em contraste, a aorta do segmento pós-estenose apresentou íntima normal, parecendo delicada, similar à encontrada no segmento correspondente dos controles, exceto pelas conspícuas placas neointimais focalmente distribuídas. Estas eram similares às do segmento pré-estenose, mas muito maiores em tamanho. O estudo com microscopia eletrônica de varredura demonstrou focos de células poligonais, não-direcionais em relação ao fluxo sanguíneo, menos volumosas em comparação ao controle, pouco definidas e com pregas marginais menos evidentes e menor número de microvilosidades sobre a superfície celular.

A análise morfométrica apresentou um aumento de 23% na espessura da camada média do segmento pré-estenose. Este espessamento medial pode ter ocorrido em resposta ao aumento na tensão circunferencial e não em resposta a deformação circunferencial, desde que o diâmetro, o perímetro e a área da luz do vaso não diferiram dos achados em regiões semelhantes dos controle. Foi demonstrado que a tensão na parede está mais relacionada com a aterosclerose que a deformação circunferencial *in vivo* [Jiang et al., 2000]. Estes achados contrastam com estudo anterior que analisa um modelo de implante de veia que demonstra que o espessamento medial ocorreu em resposta à deformação circunferencial e não à tensão circunferencial [Dobrin, 1995]. Mas estão de acordo com uma investigação que avaliou a relação entre forças hemodinâmicas locais e fatores de risco para aterosclerose em humanos [Steinke et al., 1994]. Têm sido publicados dados demonstrando que a pressão intra-luminal regula a espessura arterial através de seu efeito na tensão da parede e o fluxo sanguíneo regula

o diâmetro da luz arterial através de suas mudanças na tensão de cisalhamento na parede [Carallo et al., 1999; Dobrin, 1995; Lehoux & Tedgui, 1998; Vanderlaan et al., 2004]. O aumento na espessura da parede, principalmente devido ao espessamento medial, serve como um mecanismo compensatório prevenindo um aumento no diâmetro, no estresse tensional e mudanças na tensão de cisalhamento na parede. É sabido que a parede de artérias e arteríolas, na presença de hipertensão, espessam com o tempo na tentativa de restaurar a tensão circunferencial da parede a seus valores normais [Wolinsky, 1970; Matsumoto & Hayashi, 1996]. Este espessamento medial pode ser conseqüente à maior expressão de TGF- β nas células endoteliais e musculares lisas. TGF- β é uma potente citocina reguladora do ciclo celular em muitas células, incluindo células endoteliais e células musculares lisas [Massague, 1998]. Apresenta importante papel nos processos proliferativos vasculares [Topper, 2000] e nas alterações na parede vascular induzidas pela hipertensão, incluindo aumento da produção de proteínas da matriz extracelular e crescimento da célula muscular lisa [Agrotis et al., 1995; Sarzani et al., 1989]. O número de fibras elásticas permaneceu constante, indicando que a hipertrofia e/ou hiperplasia ocorreram. Chobanian et al. (1984) e Lakka et al. (1999) sugerem que a hipertrofia, mais que a hiperplasia, seria responsável primária pela maior massa da célula muscular lisa na hipertensão. Não houve correlação entre a quantidade relativa de colágeno e a espessura da parede durante os 28 dias de experimentos. Os resultados indicam que o aumento médio (21.5%) na quantidade relativa de colágeno, $8.99 \pm 0.48\%$ para $10.92 \pm 0.67\%$, foi semelhante ao aumento médio da espessura da camada média, 23%, sugerindo que a proporção de colágeno manteve-se constante, caracterizando, portanto, um processo de magnificação dos componentes da parede vascular. Tem sido demonstrado que a

síntese e o conteúdo de colágeno estão elevados tanto na parede arterial quanto no coração de animais hipertensos [Iwatsuki et al., 1977; Gilligan & Spector, 1984; Tayebjee et al., 2003].

Os resultados da imunistoquímica mostraram um aumento na expressão da sintase do óxido nítrico constitutiva endotelial (eNOS) e induzível (iNOS) no segmento pré-estenose. É provável que as células endoteliais respondam ao estresse hipertensivo com o aumento na expressão de eNOS e iNOS como um mecanismo compensatório objetivando aumentar a produção de óxido nítrico (NO) e conseqüente vasodilatação. Em um modelo similar, foi demonstrada expressão aumentada de eNOS no segmento aórtico proximal à coarctação [Barton et al., 2001a]. Tem sido sugerido que o NO produzido em grandes quantidades pela iNOS é um agente tóxico e danoso [Hernandez-Pando et al., 2001] e a eNOS é uma enzima protetora [Barbato & Tzeng, 2004; Heeringa et al., 2002]. Ortiz e Garvin (2003), em um artigo de revisão publicado recentemente sobre as três diferentes enzimas produtoras de NO, relatam que a maioria dos estudos mostra que camundongos sem o gene da eNOS (eNOS -/-) têm a pressão sangüínea maior que os camundongos selvagens, sugerindo o papel da eNOS no controle da pressão arterial. A expressão aumentada de eNOS e iNOS poderia contribuir para a maior produção de NO e superóxido que interagem produzindo peroxinitrito. Este produz produtos nocivos que depletam antioxidantes e induzem oxidação de proteínas, DNA e lipídios nas células vasculares [Ballinger et al., 2000; Halliwell, 1997], além de ser apontado como um fator pró-aterosclerótico [Wever et al., 1998] e um dos responsáveis pelos eventos iniciais na aterogênese [Mügge, 1998]. Foi demonstrado que o peroxinitrito aumenta a produção de TGF- β em cultura de fibroblastos humanos o que poderia contribuir para o espessamento da parede arterial [Sugiura et al., 2006]. A expressão aumentada de nitrotirosina (NT), marcador da reação entre peroxinitrito e tirosina livre ou resíduos de tirosina, nas células

endoteliais e, principalmente, células musculares lisas, está de acordo com estudo anterior que demonstra expressão aumentada de NT nos segmentos aórticos proximais a coarctação acima das artérias renais [Barton et al., 2001b]. Além disso, a expressão aumentada de NT nos tecidos expostos a pressão elevada e a expressão semelhante aos controles no segmento normotenso aponta para o papel dos fatores baromecânicos e bioquímicos locais em contraste aos fatores humorais circulantes, uniformes em ambos os segmentos [Barton et al., 2001b]. A presença de peroxinitrito poderia atenuar a vasodilatação mediada pelo NO produzido pelas enzimas eNOS e iNOS, o que poderia explicar porque os vasos ateroscleróticos continuam a demonstrar respostas vasodilatadoras diminuídas [Buttery et al., 1996].

Em contraste, somente a expressão da enzima eNOS estava aumentada no segmento pós-estenose. Nenhuma alteração foi observada para imunoreatividade para iNOS, nitrotirosina e TGF- β . Estudos anteriores, usando um modelo similar de coarctação da aorta, mostraram que a expressão de eNOS [Barton et al., 2001a] e nitrotirosina [Barton et al., 2001b] permaneceu inalterada nos segmentos distais ao local da constrição. Estudos *in vitro* usando uma alça de fluxo constante ou uma bomba com seringa programada para distribuir um fluxo constante e específico em uma cultura de células endoteliais [Nishida et al., 1992; Noris et al., 1995; Ozawa et al., 2004; Uematsu et al., 1995] ou *in vivo* usando aortas de camundongos nos locais de bifurcação das artérias intercostais [Dusserre et al., 2004] demonstraram que a tensão de cisalhamento laminar aumenta a expressão de eNOS e o fluxo turbilhonar ou a baixa tensão de cisalhamento na parede não aumentam a expressão de eNOS nem a produção de NO. Todavia, não é fácil a transposição das observações *in vitro* diretamente para situações *in vivo*, uma vez que estas preparações geram um padrão de fluxo estável, que é uniforme e temporário, e os padrões de fluxos distais à estenose apresentam separação, readesão e recirculação. Além

disso, a expressão aumentada de eNOS nesse segmento pode ser uma particularidade desse modelo. Fluxo sanguíneo e pressão de perfusão diminuídos poderiam induzir alterações na hemodinâmica renal estimulando o rim a produzir renina, resultando em um aumento inicial dos níveis de angiotensina II [Akers et al., 2000; Yayama et al., 2004]. O aumento na expressão de eNOS poderia ser uma resposta para recompor a pressão sanguínea normal, assim sugerindo o NO como um fator potencial para normalização da pressão arterial neste segmento. Se considerarmos eNOS como uma proteína protetora do remodelamento vascular, a observação de placas neointimais neste segmento com fluxo turbilhonar e baixa tensão de cisalhamento na parede poderia ser considerado, pelo menos em parte, como uma consequência de um mecanismo adaptativo defeituoso.

Em resumo, as aortas demonstraram duas respostas remodeladoras distintas e diferentes ao estímulo hemodinâmico induzido pela coarctação infra-diafragmática. A primeira é o remodelamento no segmento pré-estenótico hipertensivo com tensão circunferencial da parede aumentada associada com estresse tensional normal, fluxo laminar e tensão de cisalhamento normal. As células endoteliais eram heterogêneas, aumentadas em tamanho e alongadas em direção ao fluxo. Além disso, observou-se conspícuas placas neointimais difusamente distribuídas e espessamento medial. Nossos achados sugerem que a tensão circunferencial da parede aumentada devido a hipertensão tem papel fundamental no remodelamento desse segmento através de efeitos biomecânicos sobre o estresse oxidativo e expressão aumentada de TGF- β . A segunda é o remodelamento no segmento pós-estenótico normotenso com fluxo turbilhonar e baixa tensão de cisalhamento na parede associados à tensão circunferencial da parede e estresse tensional normais. As células endoteliais apresentavam-se semelhantes aos controles, exceto por alterações fenotípicas focais associadas à presença de conspícuas placas

neointimais focalmente distribuídas maiores que as encontradas no segmento pré-estenose. Mais estudos são necessários para se determinar como as forças mecânicas do fluxo turbilhonar e da baixa tensão de cisalhamento na parede são detectadas e traduzidas em sinais bioquímicos para as células e convertidas em alterações fenotípicas patofisiologicamente relevantes.

6. Conclusões

- A coarctação da aorta abdominal antes da bifurcação das artérias renais produz hipertensão acima e fluxo turbilhonar abaixo da estenose e provê um excelente modelo para o estudo simultâneo dos efeitos do aumento da pressão sanguínea e conseqüente estiramento do vaso e alterações do fluxo sanguíneo em um mesmo animal.
- O remodelamento observado no segmento hipertensivo pré-estenótico sugere que a tensão circunferencial da parede aumentada devido a hipertensão tem papel fundamental no remodelamento desse segmento através de efeitos biomecânicos sobre o estresse oxidativo e expressão aumentada de TGF- β .
- A observação de marcantes focos de espessamento no segmento pós-estenose com fluxo turbilhonar e baixa tensão de cisalhamento na parede poderia ser considerada, pelo menos em parte, como conseqüência de um mecanismo adaptativo defeituoso, se considerarmos eNOS como uma enzima protetora. Mais estudos são necessários para se determinar como as forças mecânicas do fluxo turbilhonar e da baixa tensão de cisalhamento na parede são detectadas e traduzidas em sinais bioquímicos para as células e convertidas em alterações fenotípicas patofisiologicamente relevantes (Figura 21).

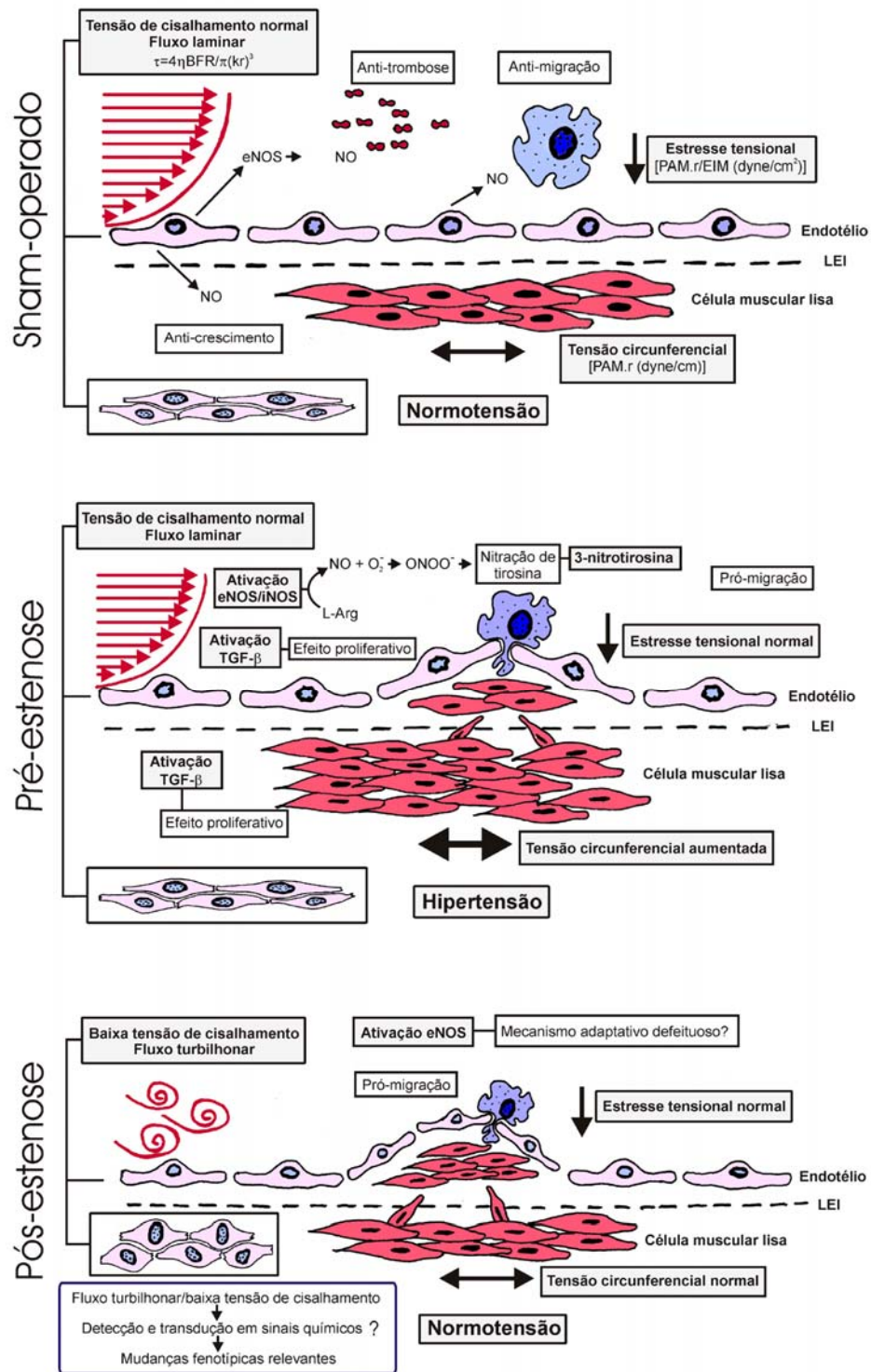


Figura 21: Representação diagramática das alterações encontradas nos segmentos pré-estenose e pós-estenose dos animais operados em comparação com animais *sham*-operados.

Referências

Agrotis A, Saltis J, Dilley R, Bray P, Bobik A. Transforming growth factor-beta 1 and the development of vascular hypertrophy in hypertension. *Blood Press Suppl* 1995;2:43-48.

Akers WS, Cross A, Speth R, Dwoskin LP, Cassis LA. Renin-angiotensin system and sympathetic nervous system in cardiac pressure-overload hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:H2797-2806.

Alexander RW. Theodore Cooper Memorial Lecture. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. *Hypertension* 1995;25:155-161.

Ali MH, Schumacker PT. Endothelial responses to mechanical stress: where is the mechanosensor? *Crit Care Med* 2002;30:S198-206.

Ando J, Tsuboi H, Korenaga R, Takada Y, Toyama-Sorimachi N, Miyasaka M, Kamiya A. Shear stress inhibits adhesion of cultured mouse endothelial cells to lymphocytes by downregulating VCAM-1 expression. *Am J Physiol* 1994;267:C679-C687.

Bakker SJ, Gans RO. About the role of shear stress in atherogenesis. *Cardiovasc Res* 2000;45:270-272.

Ballinger SW, Petterson C, Yan CN, Doan R, Burow DL, Young CG, Yakes FM, Van Houten B, Ballinger CA, Freeman BA, Runge MS. Hydrogen peroxide- and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circ Res* 2000;86:960-966.

Barbato JE, Tzeng E. Nitric oxide and arterial disease. *J Vasc Surg* 2004;40:187-193.

Barton CH, Ni Z, Vaziri ND. Effect of severe aortic banding above the renal arteries on nitric oxide synthase isotype expression. *Kidney Int* 2001;59:654-661 (a).

Barton CH, Ni Z, Vaziri ND. Enhanced nitric oxide inactivation in aortic coarctation-induced hypertension. *Kidney Int* 2001;60:1083-1087 (b).

Béznak M. The effect of different degrees of subdiaphragmatic aortic constriction on heart weight and blood pressure of normal and hypophysectomized rats. *Can J Biochem* 1955;33:985-994.

Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA Jr, Seed B. Endothelial-leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 1989;243:1160-1165.

Bing RJ, Handelsman JC, Campbell JA, Griswold HE, Blalock A. The surgical treatment and the physiopathology of coarctation of the aorta. *Ann Surg* 1948;128:803-824.

Blumgart HS, Lawrence JS, Ernestine AC. The dynamics of the circulation in coarctation of the aorta of adult type: relation to essential hypertension. *Arch Intern Med* 1931;47:806-823.

Buttery LD, Springall DR, Chester AH, Evans TJ, Standfield EN, Parums DV, Yacoub MH, Polak JM. Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. *Lab Invest* 1996;75:77-85.

Carallo C, Irace C, Pujia A, De Franceschi MS, Crescenzo A, Motti C, Cortese C, Mattioli PL, Gnasso A. Evaluation of common carotid hemodynamic forces. Relations with wall thickening. *Hypertension* 1999;34:217-221.

Caro CG, Fitz-Gerald JM, Schroter RC. Arterial wall shear stress and distribution of early atheroma in man. *Nature* 1969;223:1159-1161.

Caro CG, Fitz-Gerald JM, Schroter RC. Proposal of a shear dependent mass transfer mechanism for atherogenesis. *Clin Sci* 1971;40:5P.

Celermajer DS. Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol* 1997;30:325-333.

Chien S, Li S, Shyy YJ. Effects of mechanical forces on signal transduction and gene expression in endothelial cells. *Hypertension* 1998;31:162-169.

Chobanian AV. Adaptive and maladaptive responses of the arterial wall to hypertension. *Hypertension* 1990;15:666-674.

Chobanian AV, Prescott MF, Haudenschild CC. Recent advances in molecular pathology. The effects of hypertension on the arterial wall. *Exp Mol Pathol* 1984;41:153-169.

Davies PF. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev* 1995;75:519-560.

De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA Jr, Shin WS, Liao JK. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995;96:60-68.

Dobrin PB. Poststenotic dilatation. *Surgery* 1991;172:503-508.

Dobrin PB. Mechanical factors associated with the development of intimal and medial thickening in vein grafts subjected to arterial pressure. A model of arteries exposed to hypertension. *Hypertension* 1995;26:38-43.

Dusserre N, L'Heureux N, Bell KS, Stevens HY, Yeh J, Otte LA, Loufrani L, Frangos JA. PECAM-1 interacts with nitric oxide synthase in human endothelial cells. Implication for flow-induced nitric oxide synthase activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1796-1802.

Friedman MH, Hutchins GM, Barger CB, Deters OJ, Mark FF. Correlation between intimal thickness and fluid shear in human arteries. *Atherosclerosis* 1981;39:425-436.

Gilligan JP, Spector S. Synthesis and collagen in cardiac and vascular walls. *Hypertension* 1984;6:III44-49.

Gimbrone MA Jr, Topper JN. Biology of the vessel wall: Endothelium Molecular Basis of Heart Diseases. Part V: Vascular Biology & Atherogenesis. Edited by KR Chien, JL Breslow, JM Leiden, RD Rosenberg, CE Seidman, Troy MD. Harcourt Brace & Co, 1998, pp 331-348.

Gimbrone MA Jr, Nagel T, Topper JN. Biomechanical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology. *J Clin Invest* 1997;99:1809-1813.

Glagov S, Zarins C, Giddens DP, Ku DN. Hemodynamics and atherosclerosis. Insights and perspectives gained from studies of human arteries. *Arch Pathol Lab Med* 1988;112:1018-1031.

Gupta TC, Wiggers CJ. Basic hemodynamic changes produced by aortic coarctation of different degrees. *Circulation* 1951;3:17-31.

Halliwell B. What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo? *FEBS Lett* 1997;411:157-160.

Haudenschild CC, Prescott MF, Chobanian AV. Aortic endothelial and subendothelial cells in experimental hypertension and aging. *Hypertension* 1981;3:1148-1153.

Heeringa P, Steenbergen E, van Goor H. A protective role for endothelial nitric oxide synthase in glomerulonephritis. *Kidney Int* 2002;61:822-825.

Hernandez-Pando R, Schon T, Orozco EH, Serafin J, Estrada-Garcia I. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine during the evolution of experimental pulmonary tuberculosis. *Exp Toxicol Pathol* 2001;53:257-265.

Iwatsuki K, Cardinale GJ, Spector S, Udenfriend S. Hypertension: increase of collagen biosynthesis in arteries but not in veins. *Science* 1977;198:403-405.

Jiang Y, Kohara K, Hiwada K. Association between risk factors for atherosclerosis and mechanical forces in carotid artery. *Stroke* 2000;31:2319-2324.

Kádár A, Glasz T. Development of atherosclerosis and plaque biology. *Cardiovasc Surg* 2001;9:109-121.

Kiowsky N. Endothelial dysfunction in hypertension. *Clin Exp Hypertension* 1999;21:635-646.

Ku DN, Giddens DP, Zarins CK, Glagov S. Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation: positive correlation between plaque location and low and oscillating shear stress. *Arteriosclerosis* 1985;5:293-302.

Lakka TA, Salonen R, Kaplan GA, Salonen JT. Blood pressure and the progression of carotid atherosclerosis in middle-aged men. *Hypertension* 1999;34:51-56.

Lehoux S. Redox signalling in vascular responses to shear and stretch. *Cardiovasc Res* 2006;71:269-279.

Lehoux S, Tedgui A. Signal transduction of mechanical stresses in the vascular wall. *Hypertension* 1998;32:338-345.

Levesque MJ, Nerem RM. The elongation and orientation of cultured endothelial cells in response to shear stress. *J Biomech Eng* 1985;107:341-347.

Levesque MJ, Liepsch D, Moravec S, Nerem RM. Correlation of endothelial cell shape and wall shear stress in a stenosed dog aorta. *Arteriosclerosis* 1986;6:220-229.

Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407:233-241.

Malek AM, Alper SL, Izumo S. Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *JAMA* 1999;282:2035-2042.

Massague J. TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998;67:753-791.

Matsumoto T, Hayashi K. Stress and strain distribution in hypertensive and normotensive rat aorta considering residual strain. *J Biomech Eng* 1996;118:62-73.

Mügge A. The role of reactive oxygen species in atherosclerosis. *Z Kardiol* 1998;87:851-864.

National Research Council. Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition. Nutrient requirements of laboratory rat. In: Nutrient requirements of laboratory animals. Washington, DC: National Academic Press 1995:11-79.

Nagel T, Resnick N, Atkinson WJ, Dewey CF Jr, Gimbrone MA Jr. Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1994;94:885-891.

Newby AC. An overview of the vascular response to injury: a tribute to the late Russell Ross. *Toxicol Lett* 2000;112-113:519-529.

Nishida K, Harrison DG, Navas JP, Fisher AA, Dockery SP, Uematsu M, Nerem RM, Alexander RW, Murphy TJ. Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 1992;90:2092-2096.

Noris M, Morigi M, Donadelli R, Aiello S, Foppolo M, Todeschini M, Orisio S, Remuzzi G, Remuzzi A. Nitric oxide synthesis by cultured endothelial cells is modulated by flow conditions. *Circ Res* 1995;76:536-543.

Ojha M, Johnston KW, Cobbold RS. Evidence of a possible link between poststenotic dilation and wall shear stress. *J Vasc Surg* 1990;11:127-133.

Okano M, Yoshida Y. Junction complexes of endothelial cells in atherosclerosis-prone and atherosclerosis-resistant regions on flow dividers of brachiocephalic bifurcations in the rabbit aorta. *Biorheology* 1994;31:155-161.

Ortiz PA, Garvin JL. Cardiovascular and renal control in NOS-deficient mouse models. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;284:R628-R638.

Ozawa N, Shichiri M, Iwashina M, Fukai N, Yoshimoto T, Hirata Y. Laminar shear stress up-regulates inducible nitric oxide synthase in the endothelium. *Hypertens Res* 2004;27:93-99.

Page IH. The effect of chronic constriction of the aorta on arterial blood pressure in dogs: an attempt to produce coarctation of the aorta. *Am Heart J* 1940;19:218.

Prado CM, Ramos SG, Alves-Filho JC, Elias JJr, Cunha FQ, Rossi MA. Turbulent flow/low wall shear stress and stretch differentially affect aorta remodeling in rats. *J Hypertens* 2006;24:503-515.

Resnick N, Gimbrone MA Jr. Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression. *FASEB J* 1995;9:874-882.

Resnick N, Yahav H, Shay-Salit A, Shushy M, Schubert S, Zilberman LC, Wofovitz E. Fluid shear stress and the vascular endothelium: for better and for worse. *Prog Biophys Mol Biol* 2003;81:177-199.

Roach MR. An experimental study of the production and time course of poststenotic dilatation in the femoral and carotid arteries of adult dogs. *Circ Res* 1963;13:537-551.

Roach MR. Reversibility of poststenotic dilatation in the femoral arteries of dogs. *Circ Res* 1970;27:985-993.

Rokitansky C. The pathological anatomy of the organs of respiration and circulation: a manual of pathological anatomy. London, UK: Sydenham Society;1852.

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-809.

Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-126.

Rossi MA, Carillo SV, Oliveira JS. The effect of iron deficiency anemia in the rat on catecholamine levels and heart morphology. *Cardiovasc Res* 1981;15:313-319.

Rossi MA, Carillo SV Cardiac hypertrophy due to pressure and volume overload: distinctly different biological phenomena? *Int J Cardiol* 1991;31:133-141.

Rossi MA, Peres LC. Effect of captopril on the prevention and regression of myocardial cell hypertrophy and interstitial fibrosis in pressure overload cardiac hypertrophy. *Am Heart J* 1992;124:700-709.

Rossi MA, Colombini-Netto M. Chronic inhibition of NO synthesis per se promotes structural intimal remodeling of the rat aorta. *J Hypertens* 2001;19:1567-1579.

Rossi MA. Pathologic fibrosis and connective tissue matrix in left ventricular hypertrophy due to chronic arterial hypertension in humans. *J Hypertens* 1998;16:1031-1041.

Sarzani R, Brecher P, Chobanian AV. Growth factor expression in aorta of normotensive and hypertensive rats. *J Clin Invest* 1989;83:1404-1408.

Schmitz G, Aslanidis C, Lackner KJ. Recent advances in molecular genetics of cardiovascular disorders. Implications for atherosclerosis and diseases of cellular lipid metabolism. *Pathol Oncol Res* 1998;4:152-160.

Song RH, Kocharyan HK, Fortunato JE, Glagov S, Bassiouny HS. Increased flow and shear stress enhance in vivo transforming growth factor-beta 1 after experimental arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:923-930.

Stanek KA, Coleman TG, Murphy WR. Overall hemodynamic pattern in coarctation of the abdominal aorta in conscious rats. *Hypertension* 1987;9:611-618.

Steele JM. Evidence for general distribution of peripheral resistance in coarctation of the aorta: report of three cases. *J Clin Invest* 1941;20:473-480.

Steinke W, Els T, Hennerici M. Compensatory carotid artery dilatation in early atherosclerosis. *Circulation* 1994;89:2578-2581.

Stewart HJ, Bailey RL. The cardiac output and other measurements of the circulation in coarctation of the aorta. *J Clin Invest* 1941;20:145-152.

Stocker R, Keaney JF Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004;84:1381-1478.

Strong JP. The natural history of atherosclerosis in childhood. *Ann N Y Acad Sci* 1991;623:9-15.

Sugiura H, Liu X, Kobayashi T, Togo S, Ertl RF, Kawasaki S, Kamio K, Wang XQ, Mao L, Shen L, Hogaboam CM, Rennard SI. Reactive nitrogen species augment fibroblast-mediated collagen gel contraction, mediator production, and chemotaxis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;34:592-599.

Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation* 1998;97:2222-2229.

Taxon M. Hemodynamics basics of atherosclerosis with critique of the cholesterol-heart disease hypothesis. Wallingford UK: Begell House 1995:48-49.

Tayebjee MH, MacFadyen RJ, Lip GY. Extracellular matrix biology: a new frontier in linking the pathology and therapy of hypertension? *J Hypertens* 2003;21:2211-2218.

Topper JN. TGF- β in the cardiovascular system: molecular mechanisms of a context-specific growth factor. *Trends Cardiovasc Med* 2000;10:132-137.

Touyz RM. Molecular and cellular mechanisms regulating vascular function and structure--implications in the pathogenesis of hypertension. *Can J Cardiol* 2000;16:1137-1146.

Uematsu M, Ohara Y, Navas JP, Nishida K, Murphy TJ, Alexander RW, Nerem RM, Harrison DG. Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am J Physiol* 1995;269:C1371-1378.

VanderLaan PA, Reardon CA, Getz GS. Site specificity of atherosclerosis: site-selective responses to atherosclerotic modulators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:12-22.

Virchow R. Cellular pathology as based upon physiological and pathological histology. London, UK: Churchill;1860.

Viteri F, Behar M, Arroyave G. Clinical aspects of protein malnutrition. In: Munro HN, Allison JB (editors): *Mammalian protein metabolism*. New York: Academic Press. 1964:523-539.

Walpola PL, Gotlieb AI, Cybulsky MI, Langille BL. Expression of ICAM-1 and VCAM-1 and monocyte adherence in arteries exposed to altered shear stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:2-10.

Weber KT, Sun Y, Tyagi SC, Cleutjens JP. Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms. *J Mol Cell Cardiol* 1994;26:279-292.

Wever R, Stroes E, Rabelink TJ. Nitric oxide and hypercholesterolemia: a matter of oxidation and reduction? *Atherosclerosis* 1998;137:S51-S60.

Wissler RW, Vesselinovitch D. Atherosclerosis - relationship to coronary blood flow. *Am J Cardiol* 1983;52:2A-7A.

Wolinsky H. Comparison of medial growth of human thoracic and abdominal aortas. *Circ Res* 1970;27:531-538.

Wu JH, Hagaman J, Kim S, Reddick RL, Maeda N. Aortic constriction exacerbates atherosclerosis and induces cardiac dysfunction in mice lacking apolipoprotein E. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:469-475.

Xu C, Lee S, Singh TM, Sho E, Li X, Sho M, Masuda H, Zarins CK. Molecular mechanisms of aortic wall remodeling in response to hypertension. *J Vasc Surg* 2001;33:570-578.

Yayama K, Horii M, Hiyoshi H, Takano M, Okamoto H, Kagota S, Kunitomo M. Up-regulation of angiotensin II type 2 receptor in rat thoracic aorta by pressure-overload. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;308:736-743.

Zalba G, Beaumont J, San José G, Fortuño MA, Fortuño A, Díez J. Vascular oxidant stress: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol Biochem* 2000;56:57-64.

Zalba G, San José G, Moreno MU, Fortuño MA, Fortuño A, Beaumont FJ, Díez J. Oxidative stress in arterial hypertension. Role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension* 2001;38:1395-1399.

Zand T, Hoffman AH, Savilonis BJ, Underwood JM, Nunnari JJ, Majno G, Joris I. Lipid deposition in rat aortas with intraluminal hemispheric plug stenosis. A morphological and biophysical study. *Am J Pathol* 1999;155:85-92.

Zarins CK, Giddens DP, Bharadvaj BK, Sottiurai VS, Mabon RF, Glagov S. Carotid bifurcation atherosclerosis. Quantitative correlation of plaque localization with flow velocity profiles and wall shear stress. *Circ Res* 1983;53:502-514.

Zarins CK, Zatina MA, Glagov S. Correlation of postmortem angiography with pathologic anatomy: quantitation of atherosclerotic lesions. In: Bond MG, ed. *Clinical Diagnosis of Atherosclerosis: quantitative methods of evaluation*. New York, NY: Springer-Verlag 1986:283-306.

Zarins CK, Glagov S. Artery wall pathology in atherosclerosis. In: Rutherford RB, ed. *Vascular Surgery*, 4th edition, Philadelphia, Pa: WB Saunders Co;1995:204-221.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

"CAMPUS" DE RIBEIRÃO PRETO
TELEFONE: PABX 602.3000 – FAX: (0XX16) 633.1586
14049-900 – RIBEIRÃO PRETO – ESTADO DE SÃO PAULO

Folha de Informação rubricada sob N°.....
do processo N° (a)

Interessado(a): CIBELE MARIA PRADO


Orientador(a): Prof. Dr. MARCOS ANTONIO ROSSI

Assunto: Avaliação do projeto de pesquisa: *“Participação de fenômenos hemodinâmicos, isolados ou associados a hipercolesterolemia, na gênese de remodelamento intimal da aorta de ratos. Possível correlação com os fenômenos biológicos fundamentais da aterogênese”.*

INFORMAÇÃO

O projeto intitulado *“Participação de fenômenos hemodinâmicos, isolados ou associados a hipercolesterolemia, na gênese de remodelamento intimal da aorta de ratos. Possível correlação com os fenômenos biológicos fundamentais da aterogênese”*, foi analisado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em sua 16ª Reunião Ordinária, realizada em 13 de setembro de 2004, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, de acordo com o Protocolo N° 015/2004.

Ribeirão Preto, 13 de setembro de 2004.


Prof. Dr. JOÃO SANTANA DA SILVA
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal

ANEXO B – FIXADORES

Formol a 3,7% em PBS

Foram misturados 10 mL de formol a 3,7% e 90 mL de PBS para um volume final de 100 mL.

Aldeído glutárico a 2,5%

Foram misturados 1,2 mL de aldeído glutárico a 25% (Electron Microcopy Science, Washington, PA, EUA), 8,8 mL de tampão cacodilato de sódio 0,2M e completado para um volume final de 10 mL de água destilada.

Tetróxido de ósmio 1%

Foram misturadas partes iguais de tetróxido de ósmio a 2% (Polysciences Inc., Warrington, PA, EUA) e tampão cacodilato de sódio 0,2M.

Karnovsky modificado

Foram misturados 15 mL de aldeído glutárico a 1%, 15 mL de paraformaldeído a 1% e 16,6 mL de tampão cacodilato de sódio 0,1M.

ANEXO C - COLORAÇÕES

Hematoxilina e eosina

As lâminas foram desparafinizadas em série decrescente de álcoois e lavadas em água corrente. Em seguida, coradas pela hematoxilina de Harris por 3-5 minutos. Lavadas em água corrente e diferenciadas em solução álcool-ácido a 1% e lavadas por 15 minutos. Após, foram coradas com solução de eosina-floxina por 10 a 30 segundos e passadas em álcool 95% para a retirada do excesso de corante. As lâminas foram desidratadas, diafanizadas e montadas.

Picrosirius Vermelho

As lâminas foram desparafinizadas e hidratadas em série decrescente de álcoois e lavadas em água corrente. Foram deixadas em solução de ácido fosfomolibdico a 2% por 2 minutos e lavadas em água. Em seguida, deixadas em solução vermelho da síria a 0,1% por 90 minutos e lavadas em água corrente. As lâminas foram passadas pelo HCl 0,01N por 2 minutos e lavadas em água corrente. Por último, foram desidratadas, diafanizadas e montadas.

Azul de Toluidina

Os cortes foram cobertos com algumas gotas da solução corante por 3-5 minutos em platina aquecedora a 55-60°C, lavados em água corrente e secos em platina aquecedora.

Acetato de uranila e Citrato de chumbo (coloração de Reynold's)

As grades foram contrastadas no acetato de uranila por 20 minutos. Em seguida, lavadas em metanol a 50% e dados 3 banhos com água destilada. Prosseguiu-se com a contrastação utilizando o citrato de chumbo por mais 30 minutos, 3 banhos de água destilada. Foi retirado cuidadosamente o excesso de água das grades e guardadas.

Hematoxilina de Harris

As lâminas são deixadas na solução de hematoxilina por 5 a 8 segundos e lavadas com 2 trocas de água corrente. Em seguida, são passadas pela água amoniacal por 30 segundos e lavadas com 2 trocas de água corrente. Por último, são desidratadas, diafanizadas e montadas.

ANEXO D - REAGENTES E SOLUÇÕES

Solução salina a 0,9%

Foram dissolvidos 9 g de NaCl em 1 litro de água destilada.

PBS

Foram dissolvidos 8,17 g de NaCl, 0,36 g de fosfato de sódio monobásico, 1,05 g de fosfato de sódio dibásico e completado para um volume final de 1 litro com água destilada. O pH foi ajustado para 7,4 com NaOH 2M.

Hematoxilina de Harris

Em um balão volumétrico foram misturados 1000 mL de água destilada quente e 5 g de cristais de hematoxilina dissolvidos em 50 mL de álcool absoluto. Deixamos ferver por 1 minuto. O balão foi removido do fogo e acrescentado 2,5 g de óxido vermelho de mercúrio. Em seguida, o balão foi novamente levado ao fogo até a solução tornar-se cor púrpura escura. Foi retirado do fogo, resfriado rapidamente e a solução filtrada.

Solução Álcool-Ácido 1%

Foram misturados 99 mL de álcool 70% e 1 mL de ácido clorídrico concentrado.

Solução Eosina-Floxina

Foram misturados 62,5 mL de solução estoque de eosina a 1%, 6,25 mL de solução estoque de floxina a 1% e 487,5 mL de ácido acético glacial.

Ácido Fosfomolibdico a 2%

Foram dissolvidos 2 g de ácido fosfomolibdico em 100 mL de água destilada.

HCl 0,01N

Foi diluído 1 mL de HCl 1N em 100 mL de água destilada.

HCl 1N

Foram dissolvidos 41,25 mL de ácido clorídrico concentrado em 458,75 mL de água destilada.

Vermelho da Síria (*Sirius Red*)

Foi misturado 0,1 g de vermelho da Síria em 100 mL de solução saturada de ácido pícrico.

Solução pré-infiltradora

Foram misturados partes iguais de solução infiltradora e álcool 100%.

Solução infiltradora

Foram misturados 100 mL de Historesin (Leica Instruments GmbH, Heidelberg, Alemanha) e 1 g de Hardner I (Leica Instruments GmbH, Heidelberg, Alemanha).

Solução para inclusão

Foram misturados 15 mL de solução infiltradora e 1 mL de HARDNER II (Leica Instruments GmbH, Heidelberg, Alemanha).

Solução azul de toluidina

Foram misturados 1 g de azul de toluidina e 1 g de tetraborato de sódio a 100 mL de água destilada quente. A solução foi estocada, à temperatura ambiente, em frasco de vidro vedado

Tampão cacodilato de sódio 0,2M

Foram dissolvidos 4,28 g de cacodilato de sódio em 100 mL de água destilada. O pH foi ajustado para 7,3 –7,4 com HCl 1N.

Araldite 502

Foram misturadas 10 partes de Araldite 502 (Polysciences Inc., Warrington, PA, EUA) e 7 partes de DDSA (Polysciences Inc., Warrington, PA, EUA). A seguir, a mistura foi agitada

cuidadosamente para ficar completamente homogênea. Acrescentou-se então, 1,5% de DMP-30 (Polysciences Inc., Warrington, PA, EUA). A mistura foi congelada e guardada hermeticamente fechada na geladeira.

Acetato de uranila

Foram misturados 60 mL de água destilada com 1,5 a 2,0 g de acetato de uranila (Merck S.A., Darmstadt, Alemanha), obtendo uma solução saturada. Adicionou-se uma gota de ácido acético (Merck S.A., Rio de Janeiro) a essa solução. No momento do uso, foram misturadas partes iguais dessa solução e álcool a 100% .

Citrato de chumbo (coloração de Reynold's)

Em um balão volumétrico de 25 mL, foram misturados 0,66 g de nitrato de chumbo (Sigma chemical Co., St. Louis, MO, EUA), 0,88 g de citrato de sódio (Merck S.A., Rio de Janeiro) e 15 mL de água bidestilada gelada. Agitou-se vigorosamente por 1 minuto e deixado em repouso por 30 minutos, agitando a cada 5 minutos. Em seguida, foram misturados 4 mL de solução de NaOH 1N gelada e adicionado água destilada gelada até 25 mL.

NaOH 1N

Foi dissolvido 1 g de hidróxido de sódio (Merck S.A., Rio de Janeiro) em 25 mL de água destilada.

Solução salina balanceada de Hank

Foram misturados 8 g de cloreto de sódio, 400 mg de cloreto de potássio, 60 mg de fosfato de potássio monobásico, 47,86 mg de fosfato de sódio anidro, 1 g de glicose anidra e 350 mg de bicarbonato de sódio em um litro de água destilada. O pH foi ajustado para 7,2 com HCl 1N.

HCl 1%

Foi misturado 0,46 mL de ácido clorídrico PA em 19,54 mL de água destilada.

Tampão cacodilato de sódio 0,1M

Foram dissolvidos 21,4 g de cacodilato de sódio em 500 mL de água destilada. O pH foi ajustado para 7,3 – 7,4 com HCl 1N.

Tampão citrato

Foram diluídos 90 mL da Solução Mãe de ácido cítrico em 810 mL de água destilada. O pH foi ajustado para 6,0 com NaOH.

Solução Mãe de ácido cítrico

Foram misturados 2,1 g de ácido cítrico em 1000 mL de água destilada.

Parte dessa Tese de Doutorado intitulada “*Estiramento ou fluxo turbilhonar e baixa tensão de cisalhamento influem diferentemente no remodelamento aórtico em ratos*” foi publicada recentemente em revista de grande impacto na área de hipertensão arterial: *Turbulent flow/low wall shear stress and stretch differentially affect aorta remodeling in rats*. Prado CM, Ramos SG, Alves-Filho JC, Elias J Jr, Cunha FQ, Rossi MA, J Hypertens 24:503-515, 2006. Além disso, foi feita uma revisão sobre o assunto “forças mecânicas e remodelamento aórtico” intitulada *Aorta remodeling due to stretch or turbulent flow/low wall shear stress: distinctly different biological phenomena?*” Prado CM, Alves-Filho JC, Cunha FQ, Rossi MA, publicada na revista *Current Cardiology Reviews* 2:109-116, 2006. Um novo trabalho, intitulado *Circumferential wall tension due to hypertension plays a pivotal role in aorta remodeling*, analisando o papel da pressão arterial no remodelamento aórtico, está em publicação na revista *International Journal of Experimental Pathology*. O trabalho foi levado para dois congressos internacionais, resultando em duas publicações em livros (6th International Congress on Coronary Artery Disease e 12th International Congress on Heart Disease) e quatro congressos nacionais (XXV Congresso Brasileiro de Patologia; XIII Congresso da Sociedade Brasileira de Hipertensão; XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Hipertensão e XXI Reunião Anual da Federação de Sociedade de Biologia Experimental).