UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

CRISTINA TONIN BENELI

Hiperplasia intimal arterial decorrente de um modelo experimental de estenose aórtica intrínseca: estudo morfológico, morfométrico e ultraestrutural

Ribeirão Preto
2004

CRISTINA TONIN BENELI

Hiperplasia intimal arterial decorrente de um modelo experimental de estenose aórtica intrínseca: estudo morfológico, morfométrico e ultraestrutural

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Área de concentração: Patologia Experimental.
Orientadora: Prof^a Dr^a Simone G. Ramos

**Ribeirão Preto
2004**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Beneli, Cristina Tonin

Hiperplasia intimal arterial decorrente de um modelo experimental de estenose aórtica intrínseca: estudo morfológico, morfométrico e ultraestrutural. Ribeirão Preto, 2004.

91 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Patologia Experimental.

Orientadora: Ramos, Simone Gusmão.

1. Hiperplasia intimal. 2. Estenose aórtica. 3. Modelo Experimental.

FOLHA DE APROVAÇÃO

CRISTINA TONIN BENELI

HIPERPLASIA INTIMAL ARTERIAL DECORRENTE DE UM MODELO
EXPERIMENTAL DE ESTENOSE AÓRTICA INTRÍNSECA: ESTUDO
MORFOLÓGICO, MORFOMÉTRICO E ULTRAESTRUTURAL

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Patologia.
Área de concentração: Patologia Experimental.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Trabalho realizado no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP sob a orientação da Prof^a Dr^a Simone G. Ramos, com apoio financeiro da CAPES (bolsa de estudos) e FAPESP (Proc. 01/09879-8).

DEDICATÓRIAS

É **DEUS** QUEM ME CINGE DE CORAGEM E

APLANA O MEU CAMINHO (SL 17;33).

AOS MEUS QUERIDOS PAIS JORGE E ODILMA E MINHA IRMÃ

CARLENE, QUE ILUMINARAM O CAMINHO DE MINHA VIDA.

AO MEU QUERIDO **GUSTAVO** POR ME MOSTRAR A CADA DIA QUE,

NÃO DEVO DESISTIR NUNCA DE UM SONHO.

AGRADECIMENTOS

À **PROF^A DR^A SIMONE G. RAMOS**, pela orientação dessa dissertação, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual. Obrigado por me acolher em seu laboratório.

Ao **PROF. DR. MARCOS A. ROSSI**, por ser sempre solícito na solução de minhas dúvidas, por dispor seu laboratório para a realização das diversas técnicas de microscopia e pela participação na banca examinadora.

Ao **PROF. DR. FERNANDO S. RAMALHO**, pela atenção, disponibilidade e execução das cirurgias que realizamos nesse trabalho.

Aos meus colegas pós-graduandos do Departamento de Patologia, pela harmoniosa convivência.

Ao companheiro de laboratório **DANIEL HENRIQUE GONÇALVES**, pelo convívio e atenção.

Às minhas amigas **CIBELE MARIA PRADO**, **ÉRICA CAROLINA CAMPOS**, **MARA RÚBIA NUNES CELES** e **PRISCILA DE FREITAS BARBOSA**, que tanto contribuíram na execução desse trabalho com opiniões, ombro amigo e conversas animadíssimas. Obrigada amigas!!!

Aos amigos pós-graduandos **LENALDO BRANCO ROCHA** e **GISELE FARIA**, pela amizade, atenção e auxílio sempre que necessários.

À pós-graduanda **ANDIARA DE ROSSI**, pela amizade e imensa ajuda na execução da aula de mestrado.

Às técnicas do Laboratório de Microscopia Eletrônica **MÔNICA A. ABREU** e **LÍGIA G.V.B. SANTORO**, pela amizade, atenção, momentos de descontração e auxílio no processamento dos materiais para microscopia óptica de alta resolução, eletrônica de transmissão e varredura e na descrição das técnicas utilizadas nesse trabalho.

À **ELAINE MEDEIROS FLORIANO**, amiga e técnica do laboratório de Patologia Pulmonar, por sua incomensurável ajuda, companheirismo e auxílio nos mais diversos assuntos.

À **MARIA ELENA RIUL**, técnica do laboratório de Patologia Cardiovascular, pelo convívio harmonioso.

Aos meus amigos da **CASA DE PÓS-GRADUAÇÃO II** (CASA 13) Andréa, Aníbal, Antônio, Carlo, Ernando, Gesline, Jerry, Lucas, Mariana, Rodrigo e Yolanda, por me acolherem tão bem.

Às secretárias do Departamento de Patologia **NEIDE T. GONÇALVES**, **ROSÂNGELA M.C. DE PAIVA** e **REGINA MARA C.F. BUENO**, pela prestabilidade em todos os momentos.

Ao técnico de informática **DANIEL BARCELINI**, pela solução de muitas dúvidas e auxílio com os computadores.

Às funcionárias do Biotério do Departamento de Patologia: **IVONE** e **CIDA**, por cuidarem tão bem dos animais.

À **ROSE** e **D. EUNICE**, pela amizade, atenção, carinho e pelo convívio harmonioso.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Patologia.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

*O QUE SABEMOS É UMA GOTA,
O QUE IGNORAMOS É UM OCEANO.*

ISAAC NEWTON

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE GRÁFICOS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVOS.....	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 ANIMAIS.....	22
3.2 MODELO EXPERIMENTAL DE ESTENOSE ÍNTRINSECA.....	22
3.2.1 PINO PARA ESTENOSE.....	22
3.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	23
3.3.1 CIRURGIA DE ANIMAIS ESTENOSADOS.....	23
3.3.2 CIRURGIA DE ANIMAIS SHAM-OPERADOS.....	24
3.4 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS.....	27
3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	27
3.5.1 GRUPO I: AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA.....	27
3.5.2 GRUPO II: AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA.....	28
3.5.3 GRUPO III: AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL.....	30
3.5.4 GRUPO IV: AVALIAÇÃO DA ORIENTAÇÃO CELULAR.....	31
3.6 ESTATÍSTICA.....	32
4 RESULTADOS.....	33
4.1 OBSERVAÇÕES GERAIS.....	33
4.2 GRUPO I: AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA.....	34
4.2.1 SUBGRUPO E1.....	34

4.2.2 SUBGRUPO S1.....	34
4.2.3 SUBGRUPO E7.....	37
4.2.4 SUBGRUPO S7.....	37
4.2.5 SUBGRUPO E15.....	40
4.2.6 SUBGRUPO S15.	40
4.2.7 SUBGRUPO E30.....	43
4.2.8 SUBGRUPO S30.....	43
4.2.9 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS - REGIÕES I1 E I4.....	46
4.3 GRUPO II: AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA.....	50
4.3.1 SUBGRUPO E7 E S7.....	50
4.3.2 SUBGRUPO E15 E S15.....	51
4.3.3 SUBGRUPO E30 E S30.....	53
4.3.4 DENSIDADE CELULAR DA CAMADA MÉDIA.....	55
4.4 GRUPO III: AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL.....	56
4.4.1 SUBGRUPO E7.....	56
4.4.2 SUBGRUPO E15.....	56
4.4.3 SUBGRUPO E30.....	56
4.5 GRUPO VI: AVALIAÇÃO DA ORIENTAÇÃO CELULAR.....	64
4.5.1 SUBGRUPO E15.....	64
4.5.2 SUBGRUPO S15.....	64
5 DISCUSSÃO.....	67
REFERÊNCIAS.....	77
ANEXOS.....	81

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Pino acrílico.....	22
Figura 2. Procedimento cirúrgico.....	26
Figura 3. Representação esquemática da aorta para morfometria.....	30
Figura 4. Macroscopia e estudo morfológico - Subgrupo E1.....	36
Figura 5. Macroscopia e estudo morfológico - Subgrupo E7.....	39
Figura 6. Macroscopia e estudo morfológico - Subgrupo E15.....	42
Figura 7. Macroscopia e estudo morfológico - Subgrupo E30.....	45
Figura 8. Microscopia óptica de alta resolução HE-like e Resorcina.....	49
Figura 9. Ultraestrutura do espessamento intimal - Subgrupo E7.....	59
Figura 10. Ultraestrutura do espessamento intimal - Subgrupo E15.....	64
Figura 11. Ultraestrutura do espessamento intimal - Subgrupo E30.....	63
Figura 12. Microscopia eletrônica de varredura - Subgrupo E15.....	66

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Esquema da análise de variância (ANOVA) da estimativa de ganho de peso dos animais após o procedimento cirúrgico.....	33
Gráfico 2. Esquema da análise de variância (ANOVA) da espessura média da íntima nas quatro regiões mensuradas no subgrupo E15.....	52
Gráfico 3. Esquema da análise de variância (ANOVA) da espessura média da íntima nas quatro regiões mensuradas no subgrupo E30.....	54

RESUMO

Beneli, C.T. **Hiperplasia intimal arterial decorrente de um modelo experimental de estenose aórtica intrínseca: estudo morfológico, morfométrico e ultraestrutural.** Dissertação - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto (SP), 2004.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a morfologia e a ultraestrutura da hiperplasia intimal arterial decorrente de um modelo de estenose aórtica experimental, através da inserção de um pino de acrílico no orifício da artéria renal esquerda. Realizamos um estudo morfológico e ultraestrutural em 64 ratos Wistar, machos, com peso médio de 250 g, divididos em 4 subgrupos de acordo com o dia da eutanásia (1, 7, 15 e 30 dias de pós-operatório). O segmento da aorta envolvendo o pino foi retirado e estudado com diferentes protocolos para: microscopia óptica de alta resolução, microscopia eletrônica de transmissão e de varredura. Uma trombose se formou ao redor do pino 24 horas após a cirurgia, mostrando sinais de organização com 7 dias. Com 15 dias, uma hiperplasia intimal adjacente à base do pino foi visualizada. Esta alteração permaneceu com 30 dias de pós-operatório. Este espessamento era caracterizado principalmente por células musculares lisas provenientes da camada muscular média. A obstrução gera alterações hemodinâmicas locais com repercussão sobre as células endoteliais localizadas próximas à base do pino. Esses achados são discutidos.

ABSTRACT

Beneli, C.T. **Arterial intimal hyperplasia with intraluminal hemispherical plug stenosis: a morphologic and ultrastructural study.** Dissertation. - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto (SP), 2004.

Objective: To study the light and electron microscopy of intimal hyperplasia induced by experimental aortic stenosis after insertion of a plug into the aorta through the left renal artery. **Methods:** Sixty-four Wistar male rats, weighing an average of 250g, were allocated into two groups: group control, sham-operated, and group experimental, operated. The animals were killed on days 1, 7, 15, and 30 after surgery. The fragments of aorta implicating the plug were excised and studied using high resolution light microcopy and transmission and scanning electron microscopy. **Results and Conclusions:** A thrombus was observed around the plug 24 hours after surgery, organized at day 7. An intimal hyperplasia could be observed closed to the basis of the plug 15 and 30 days after surgery. The intimal thickening detected was mainly composed of smooth muscle cells migrated from the medial layer of the aorta intermixed with extracellular matrix. Moreover, the endothelial cells around the plug lost their orientation. Theses findings are discussed.

1. INTRODUÇÃO

Muitas vezes, uma injúria na parede arterial, seja com desnudamento endotelial ou não, leva à formação de hiperplasia intimal, fenômeno conhecido com diferentes nomes dependendo da sua provável origem. No caso de traumatismos, há reparação celular; nos casos de revascularização, seja por colocação de *stents* ou balões intra-arteriais, há formação de “neoíntima”; no caso de envolver alterações adaptativas na parede arterial - remodelamento arterial e com deposição de gordura: aterosclerose. Embora deva haver muitos pontos em comum em todas essas situações, os mecanismos envolvidos ainda não estão completamente esclarecidos, portanto, a literatura pertinente as separa de acordo com o modelo proposto no estudo.

Na maioria dos casos, a hiperplasia intimal é descrita como um espessamento subendotelial formado, essencialmente, por células musculares lisas, algumas células inflamatórias e matriz extracelular (NEWBY; ZALTSMAN, 2000). A quantidade de cada um destes componentes associada à presença ou não de complicadores (gordura, neovascularização, hemorragias, etc) parecem ser a principal diferença entre estas lesões. Mas, o que, quem, como e quando essas diferenças são determinadas ainda não foi elucidado completamente. Os mecanismos envolvidos são complexos e sempre, mesmo em modelos experimentais, as variáveis são pouco controláveis (ZAND et al., 1999).

Vários fatores estão envolvidos na resposta à injúria vascular, todavia, os mediadores inflamatórios desenvolvem um papel crucial na iniciação e progressão dos fenômenos secundários a essas lesões (IP et al., 1990). Entre os mediadores inflamatórios estão incluídos: moléculas de adesão celular, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, os quais controlam o recrutamento de células inflamatórias

(monócitos/macrófagos, neutrófilos e linfócitos T), células musculares lisas e proteínas envolvidas na síntese e degradação de matriz extracelular (DAVIS et al., 2003). Quando há formação de trombos, os seus componentes podem apresentar uma participação ativa no desenvolvimento dessas lesões. A participação destes fatores tem sido invariavelmente relatada na maioria dos artigos que envolvem o desenvolvimento de hiperplasias intimais, seja qual for o seu desencadeante. Esses mediadores possuem múltiplos e variados efeitos sobre os constituintes da parede do vaso, incluindo as células endoteliais, as células musculares lisas e as proteínas da matriz extracelular (DAVIS et al., 2003).

Por outro lado, alterações hemodinâmicas também têm sido implicadas no desenvolvimento de lesões intimais importantes. Entre eles, o *stress* por cisalhamento (*wall shear stress*) tem sido diretamente relacionado às alterações observadas na íntima de diferentes vasos arteriais, especialmente em áreas onde o *stress* por cisalhamento possa estar alterado. O *stress* por cisalhamento é uma força tangencial criada pela fricção do fluxo sobre as células endoteliais, sendo diretamente proporcional à velocidade do mesmo e inversamente proporcional ao diâmetro do vaso. A manutenção dos níveis habituais de *stress* por cisalhamento é essencial na manutenção da homeostase intravascular (DAVIES, 1995). Células endoteliais sujeitas a alterações no *stress* por cisalhamento modificariam sua conformação estrutural, gerando alterações funcionais importantes e desencadeando uma reversão do perfil habitual de secreção e/ou expressão de moléculas por estas células. Estas alterações favoreceriam os efeitos opostos à homeostase, portanto, contribuindo para o desenvolvimento do espessamento intimal (SILKWORTH; STEHBENS, 1975; NEREM; LEVESQUE; CORNHILL, 1981; DAVIES, 1995; GIMBRONE et al., 2000).

Vários modelos experimentais de lesão têm sido desenvolvidos para estudar as respostas proliferativas após uma injúria vascular (IP et al., 1990). Dentre estes, são relacionados modelos provocando alterações dos efeitos do cisalhamento, turbulência e distúrbios de fluxo, em diferentes situações, tais como: modelos animais (estenose arterial por meio de ligadura ou por *clip* metálico em forma de U) (JORIS; ZAND; MAJNO, 1982; ZAND et al., 1988; ZAND et al., 1991), modelos *in vitro* e modelos físicos auxiliados por simulações matemático-computacionais (ZAND et al. 1999). A grande crítica em relação aos modelos *in vivo* tem sido a possível interferência de forças atuantes nas paredes dos vasos, especialmente nos modelos de obstrução extrínseca (tipo *clip*, anel ou ligadura externa).

Em 1999, Zand e col. sugeriram um modelo experimental de estenose aórtica intrínseca, através da inserção de um pino de acrílico semi-hemisférico no orifício da artéria renal esquerda de ratos Wistar adultos, criando assim, um distúrbio de fluxo importante. A novidade seria a produção de uma obstrução importante (em torno de 50%) sem, no entanto, afetar de forma significativa as forças que atuam na parede arterial. Neste modelo, os autores estudaram a deposição lipídica sobre as áreas de lesão provocada pelo pino, após quatro meses de dieta hipercolesterolêmica. Microscopicamente, estas áreas correspondiam a focos definidos de espessamento intimal. Utilizando modelos físicos em maior escala para fins de comparação, observaram que havia coincidência entre as áreas de espessamento e deposição lipídica com as áreas de baixo cisalhamento, separação de fluxo e recirculação, relacionando-as, finalmente, ao desenvolvimento de aterosclerose (ZAND et. al., 1999). Não referem, entretanto, os mecanismos envolvidos no aparecimento do espessamento intimal propriamente dito, antes do acréscimo de dieta hipercolesterolêmica. Resolvemos então, desenvolver este modelo experimental *in*

vivo, em nosso laboratório e estudar o desenvolvimento destas lesões desde o primeiro dia pós-operatório até 30 dias da cirurgia, na tentativa de elucidar alguns dos mecanismos envolvidos neste processo.

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo são:

- Avaliar morfolologicamente o desenvolvimento da hiperplasia intimal observado no modelo experimental de estenose aórtica intrínseca nos períodos de 1, 7, 15 e 30 dias, através da microscopia óptica de alta resolução;
- Avaliar ultraestruturalmente os principais componentes da hiperplasia intimal através da microscopia eletrônica de transmissão;
- Avaliar morfometricamente a hiperplasia intimal e a camada média nas regiões adjacentes ao pino acrílico;
- Avaliar morfometricamente possíveis variações nas espessuras da íntima e camada média nas regiões a montante e a jusante da hiperplasia intimal;
- Avaliar morfolologicamente possíveis alterações na orientação celular decorrente do modelo experimental através da microscopia eletrônica de varredura.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 64 ratos Wistar, machos, com peso médio de 250 g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo. Os animais foram alocados individualmente no Biotério do Departamento de Patologia, em gaiolas de polipropileno com tampas de aço inoxidável perfurado, mantidos com dieta sólida normal e água de torneira *ad libitum*. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Protocolo 023/2004 – ANEXO).

3.2 MODELO EXPERIMENTAL DE ESTENOSE INTRÍNSECA

3.2.1 PINO PARA A ESTENOSE

O pino hemisférico de acrílico foi confeccionado pela Oficina de Precisão do *Campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, tendo as seguintes medidas: capa semi-esférica $\cong 0,9 \times 1,5$ mm e a haste 3×1 mm (Figura 1).

Estas dimensões foram determinadas com base no diâmetro médio da aorta dos animais estudados, a fim de se obter aproximadamente 50% de obstrução intraluminal em torno do 30º dia de experimento.

Figura 1. Pino hemisférico de acrílico. Barra 1mm.

3.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os instrumentos cirúrgicos foram obtidos da Incol Instrumentos, São Paulo, SP, Brasil.

3.3.1 CIRURGIA DE ANIMAIS ESTENOSADOS

Os animais foram anestesiados com a associação de xilazina (Coopazine®, Coopers Brasil, São Paulo, SP, Brasil) na dose de 8 mg/Kg e cloridrato de cetamina (Agener, União Química, Embu-Guaçu, SP, Brasil) na dose de 74 mg/Kg, administrados via intramuscular na face posterior da coxa direita. Após tricotomia abdominal e assepsia com álcool iodado a 10%, os animais foram fixados em decúbito dorsal numa mesa cirúrgica adaptada sendo feita então, uma incisão mediana com 4 cm de extensão. Com auxílio de um afastador, as vísceras foram deslocadas para a direita do animal possibilitando a exposição da aorta e do rim esquerdo. Após dissecação do pedículo renal, os vasos foram ligados na região adjacente ao hilo utilizando fio de algodão 3-0 (Figura 2A). Imediatamente então, procedeu-se a nefrectomia, deixando um coto arterial com fio de reparo para posterior inserção do pino acrílico. Em seguida ao isolamento da aorta, dois *clips* cirúrgicos foram colocados, um acima e outro abaixo, da origem da artéria renal esquerda, obliterando temporariamente o fluxo sanguíneo aórtico (o *clip* proximal deve permanecer abaixo da origem da artéria renal direita, de forma a não induzir isquemia renal) (Figura 2B). Após um pique no coto da artéria renal esquerda (Figura 2C), o pino foi inserido e fixado por três ligaduras com fio de nylon 7-0 (Paramed Sutures, São Paulo, SP, Brasil) e então, os *clips* foram retirados (Figura 2D). Após revisão da cavidade abdominal (Figura 2E), procedeu-se a lavagem da mesma com salina a 0,9% e sutura dos planos abdominais utilizando pontos corridos com fio de

algodão 3-0. A pele foi suturada utilizando o mesmo fio, com pontos em U horizontais. O procedimento durou cerca de 45 minutos e então, os animais foram alocados em gaiolas com maravalha, recebendo dieta sólida normal e água *ad libitum*.

3.3.2 CIRURGIA DE ANIMAIS SHAM-OPERADOS

Os animais foram anestesiados com a associação de xilazina (Coopazine®, Coopers Brasil, São Paulo, SP, Brasil) na dose de 8 mg/Kg e cloridrato de cetamina (Agener, União Química, Embu-Guaçu, SP, Brasil) na dose de 74 mg/Kg, administrados via intramuscular na face posterior da coxa direita. Após tricotomia abdominal e assepsia com álcool iodado a 10%, os animais foram fixados em decúbito dorsal numa mesa cirúrgica adaptada sendo feita então, uma incisão mediana com 4 cm de extensão. Com auxílio de um afastador, as vísceras foram deslocadas para a direita do animal possibilitando a exposição da aorta e do rim esquerdo. Após dissecação do pedículo renal, os vasos foram ligados na região adjacente ao hilo utilizando fio de algodão 3-0. Imediatamente então, procedeu-se a nefrectomia. Após revisão da cavidade abdominal, procedeu-se a lavagem da mesma com salina a 0,9% e sutura dos planos abdominais utilizando pontos corridos com fio de algodão 3-0. A pele foi fechada utilizando o mesmo fio, com pontos em U horizontais. O procedimento durou cerca de 30 minutos e então, os animais foram alocados em gaiolas com maravalha, recebendo dieta sólida normal e água *ad libitum*.

Figura 2. Seqüência do procedimento cirúrgico para inserção de um pino de acrílico no orifício da artéria renal esquerda, visando a estenose da aorta neste segmento: (A) Ligadura dos vasos do hilo renal esquerdo para posterior nefrectomia; (B) Interrupção temporária do fluxo por *clips* cirúrgicos. Notar o coto arterial ligado ao fio de reparo; (C) Pique no coto da artéria renal esquerda para a inserção do pino de acrílico na aorta; (D) Ligaduras com fio de nylon 7-0 após a inserção do pino; (E) revisão da cavidade abdominal; (F) Visão macroscópica e externa do segmento de aorta com o pino já inserido no orifício da artéria renal esquerda. A seta (→) indica o orifício da artéria renal direita; (p) proximal, (d) distal. Barra = 2 mm.

3.4 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Os animais, depois de pesados, foram anestesiados com a associação de cloridrato de cetamina e xilazina, fixados em decúbito dorsal numa mesa cirúrgica adaptada. Após incisão abdominal mediana, as vísceras foram afastadas para a dissecação da aorta e localização do pino de acrílico. Foi aberta então, a cavidade torácica e realizada a secção da aorta supra-diafragmática. Após o dessangramento, o segmento da aorta abdominal foi seccionado aproximadamente 1 cm acima e abaixo da origem da artéria renal esquerda. Logo após, uma cânula foi inserida na extremidade proximal da aorta para a perfusão de líquidos, de acordo com o delineamento experimental de cada grupo.

3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram separados ao acaso em quatro grupos, cada qual tendo dois subgrupos: Estenosados (E) e Sham-operados (S). A eutanásia foi realizada nos dias: 1, 7, 15 e 30 dias de cirurgia, de acordo com o estudo pretendido.

3.5.1 GRUPO I: AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DA AORTA ADJACENTE AO PINO UTILIZANDO MICROSCOPIA ÓPTICA DE ALTA RESOLUÇÃO

Os animais foram distribuídos da seguinte forma nos subgrupos de acordo com os dias de eutanásia: 1 dia (E1 - 7 animais e S1 - 5 animais), 7 dias (E7 - 7 animais e S7 - 5 animais), 15 dias (E15 - 6 animais e S15 - 5 animais), 30 dias (E30 - 9 animais e S30 - 5 animais).

PROCESSAMENTO

Após a lavagem com solução salina a 0,9% gelada (4°C), as aortas foram perfundidas com formol a 10% tamponado, limpas dos tecidos adjacentes sob lupa Zeiss Stemi 2000-C (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e imersas no mesmo fixador por um período de 24 horas. Em seguida, as aortas foram recortadas longitudinalmente, separadas nas porções proximal e distal em relação ao pino e processadas segundo o protocolo descrito na seqüência: desidratação em série crescente de álcool nas concentrações 50, 70 e 95% (duas trocas de 20 minutos cada) e 100% (três trocas de 40 minutos cada); infiltração com soluções pré-infiltradora (ANEXO B) e infiltradora (ANEXO B), ambas *overnight* e inclusão em Histoiresin® (Leica Instruments GmbH, Heidelberg, Alemanha). 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 e fucsina básica (HE-like) (ANEXOS A e B) (ABREU; BAROZA; ROSSI, 1993) e resorcina-fucsina (ANEXOS A e B) (CANNON; STUTH, 1993) para evidenciar fibras elásticas.

3.5.2 GRUPO II: AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DA AORTA ADJACENTE AO PINO UTILIZANDO MICROSCOPIA ÓPTICA DE ALTA RESOLUÇÃO

Os animais foram distribuídos da seguinte forma nos subgrupos de acordo com os dias de eutanásia: 7 dias (E7 - 7 animais e S7 - 5 animais), 15 dias (E15 - 7 animais e S15 - 5 animais), 30 dias (E30 - 9 animais e S30 - 5 animais). Não foram feitas mensurações nos subgrupos E1 e S1.

PROCEDIMENTO

As imagens adquiridas a partir das lâminas de microscopia óptica de alta resolução foram analisadas morfometricamente com auxílio do programa Leica QWin® (Leica Microsystems Cambridge Ltda, Cambridge, Reino Unido), instalado em um microcomputador acoplado a uma câmara digital. A aorta foi dividida em quatro regiões assim definidas: I1 – região da parede arterial a montante do espessamento intimal proximal; M1 - Camada média muscular subjacente à região I1; I2 - Segmento da aorta na região do espessamento intimal proximal propriamente dito; M2 - Camada média muscular subjacente à região I2; I3 - Segmento de aorta na região do espessamento distal propriamente dito; M3 - Camada média muscular subjacente à região I3; I4 - Região da parede arterial a jusante do espessamento intimal distal; M4 - Camada média muscular subjacente à região I4. Uma representação esquemática dessas regiões é ilustrada na figura 3.

Na íntima foi mensurada a espessura. Na camada média foram avaliadas: espessura, quantidade de lâminas elásticas e densidade celular em uma área padrão de 0,015 mm². No espessamento intimal foram avaliados: espessura da lesão, altura em relação ao pino, extensão a partir do pino, área total e densidade celular da lesão nas regiões proximal e distal em uma área padrão de 0,015 mm².

As regiões I1 e I4 foram definidas na dependência da extensão das regiões I2 e I3, considerando caso a caso. Com relação aos controles, as divisões das regiões foram baseadas na localização da artéria renal esquerda.

Figura 3. Esquema ilustrando as regiões da aorta onde foram feitas as mensurações. I1 = Segmento da aorta a montante do espessamento intimal proximal; M1 = Camada média muscular subjacente à região I1; I2 = Segmento da aorta na região do espessamento intimal proximal propriamente dito; M2 = Camada média muscular subjacente à região I2; I3 = Segmento de aorta na região do espessamento distal propriamente dito; M3 = Camada média muscular subjacente à região I3; I4 = Segmento da aorta a jusante do espessamento intimal distal; M4-Camada média muscular subjacente à região I4.

3.5.3 GRUPO III: AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DA ÍNTIMA DA AORTA ADJACENTE AO PINO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Os animais foram distribuídos da seguinte forma nos subgrupos de acordo com os dias de eutanásia: 7 dias (E7 - 3 animais), 15 dias (E15 - 3 animais), 30 dias (E30 - 2 animais). As áreas selecionadas para este estudo foram os espessamentos intimais tanto proximal (I2) quanto distal (I3).

PROCESSAMENTO

Após a lavagem com solução salina a 0,9% gelada (4°C), as aortas foram perfundidas com solução de aldeído glutárico a 4% e tampão cacodilato 0,2 M, limpas dos tecidos adjacentes sob lupa Zeiss Stemi 2000-C (Carl Zeiss) e imersas no mesmo fixador por 2 horas a 4°C. Logo após, as aortas foram recortadas longitudinalmente, separadas nas porções proximal e distal e lavadas brevemente em tampão cacodilato 0,1 M. A pós-fixação foi feita em solução de tetróxido de ósmio a 1% e tampão cacodilato de sódio 0,2 M, pH 7,4 por duas horas. Os fragmentos foram processados como descrito na sequência: desidratação em série

crescente de acetona nas concentrações 30, 50, 70, 90 e 95% (uma troca de 10 minutos cada) e 100% (três trocas de 20 minutos cada); infiltração de resina e acetona nas concentrações de 3:1, 1:1 e 1:3 (uma troca de uma hora cada) e resina pura (três trocas de uma hora cada) e inclusão em resina Araldite 502 (Polysciences Inc., Warrington, PA, EUA). 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. Cortes de 20 a 40 nm obtidos com navalha de diamante em ultramicrotomo Sorvall MT-5000 (DuPont Company, Newtown, CT, EUA) foram colocados em grades de cobre de 200 *mesh* (Polysciences Inc.), duplamente contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo (ANEXOS A e B), observados e fotografados em microscópio eletrônico Zeiss EM109 (Carl Zeiss) a 80 kV.

3.5.4 GRUPO IV: AVALIAÇÃO DA ORIENTAÇÃO DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS DA ÍNTIMA DA AORTA ADJACENTE AO PINO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Os animais foram distribuídos da seguinte forma nos subgrupos de acordo com o dia de eutanásia: 15 dias (E15 - 4 animais e S15 - 3 animais).

PROCESSAMENTO

Após a aplicação do anestésico, foi injetada uma solução de heparina sódica 100 UI/100 g (Heparin, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil) diretamente no coração do animal e então, após dois minutos (para permitir a circulação do anticoagulante) procedeu-se o dessangramento. Uma cânula foi inserida na extremidade proximal da aorta e então, perfundida com solução salina balanceada de Hank (ANEXO B) à temperatura ambiente e 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, as aortas foram perfundidas com HCl 1% por 30 segundos, seguido por três trocas de tampão cacodilato de sódio 0,1 M (15 minutos cada). A pós-fixação foi feita em solução de tetróxido de ósmio a 1% e tampão cacodilato de sódio 0,2 M, pH 7,4 por duas horas. As aortas foram processadas a partir do seguinte protocolo: desidratação em série crescente de álcool nas concentrações de 50% (uma troca de 10 minutos), 70% (duas trocas de 10 minutos cada), 95% (uma troca de 10 minutos) e 100% (duas trocas por 20 minutos cada); ponto crítico com CO₂ em aparelho Bal-Tec CPD 030 (Bal-tec AG, Balzers, Liechtenstein); fixação do material 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, a metalização com ouro paládio (60 mm x 0,1 mm) (três vezes de quatro minutos cada) em equipamento Emitech K 650 (Emitech Ltda, Ashford, Kent, Inglaterra). O material foi observado em microscópio eletrônico de varredura Zeiss DSM 940 A (Carl Zeiss) a 15 kV.

3.6 ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste *t* de Student para comparação entre dois grupos e análise de variância (ANOVA) e *post hoc* de Newman-Keuls para múltiplas comparações com auxílio do programa estatístico GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Diferenças entre os resultados menores que 5% ($p < 0.05$) foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

4.1 OBSERVAÇÕES GERAIS

Com a introdução do pino na aorta, foi observado um índice de obstrução maior no início do experimento, chegando a obstruir 70% da luz do vaso. Após 15 dias, esse índice de obstrução diminuía, atingindo 50% (dados de nosso laboratório). Foram utilizadas somente as aortas em que o pino estava inserido corretamente. Os animais que apresentavam expulsão parcial ou completa não foram utilizados.

O índice de mortalidade obtido neste estudo foi de 18%, sendo maior nos primeiros dias. Trombose oclusiva da aorta na região do pino foi uma das principais causas de mortalidade.

Todos os animais (estenosados e sham-operados) sofreram uma discreta diminuição do peso corporal nas primeiras 24 horas após a cirurgia, recuperando-se em torno do 7º dia (Gráfico 1). Após este período mais crítico, os animais apresentavam-se dispostos e com bom estado geral até o fim do experimento (30 dias).

Gráfico 1. Esquema da análise de variância (ANOVA) da estimativa de ganho de peso dos animais após o procedimento cirúrgico. (* $p<0.05$ vs Sham).

4.2 GRUPO I: AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DA AORTA ADJACENTE AO PINO UTILIZANDO MICROSCOPIA ÓPTICA DE ALTA RESOLUÇÃO

4.2.1 SUBGRUPO E1 (ANIMAIS ESTENOSADOS COM EUTANÁSIA APÓS 1 DIA DE CIRURGIA)

Após 1 dia da introdução do pino, houve a formação de trombose justaposta bilateralmente ao mesmo, sendo visivelmente de maiores proporções na região distal. Microscopicamente, os trombos estavam aderidos à parede do vaso e intimamente relacionados ao pino. Sua composição era basicamente hemácias, plaquetas, fibrina e células inflamatórias, especialmente polimorfonucleares, evidenciando-se inclusive linhas de Zahn. A porção da parede muscular comprometida pelos trombos mostrava irregularidade, inclusive com ruptura das fibras elásticas da lâmina elástica interna. As alterações morfológicas estão apresentadas na Figura 4.

4.2.2 Subgrupo S1 (Animais Sham-operados com Eutanásia Após 1 Dia de Cirurgia)

Macroscopicamente, após secção das aortas, não foi observado trombo ou qualquer outra alteração aparente. Microscopicamente, não apresentavam alterações no endotélio ou na camada média. As adventícias dos animais sham-operados também apresentavam reações semelhantes aos animais estenosados, mas em menores proporções. O orifício da artéria renal esquerda permanecia aberto.

Figura 4. Macroscopia e estudo morfológico com microscopia óptica de alta resolução dos animais estenosados e com eutanásia até 1 dia após a cirurgia (Subgrupo E1): (A) Segmento de aorta apresentando trombo recente em torno do pino inserido no orifício da artéria renal esquerda; Barra = 1mm. (B) Corte longitudinal da aorta respeitando as proporções do pino mostrando trombo recente, com características semelhantes nas porções proximal e distal. Azul de toluidina e fucsina básica, aumento original 100x, barra = 1mm. A seta (→) indica a direção do fluxo. (C) Trombo aderido à parede da aorta. Notar linhas de Zahn. Azul de toluidina e fucsina básica, aumento original 160x; (D) Detalhe da composição do trombo contendo hemácias, fibrina e polimorfonucleares. Azul de toluidina e fucsina básica, aumento original 200x; (E) Parede muscular subjacente ao trombo mostrando lesão da lâmina elástica interna. Azul de toluidina e fucsina básica, aumento original 800x; (F) Fibras elásticas rotas da lâmina elástica interna (cabeça de seta) da parede muscular subjacente ao trombo. Resorcina-fucsina, aumento original 320x. (p) proximal, (d) distal, (h) hemácias, (lei) lâmina elástica interna, (m) camada média.

4.2.3 Subgrupo E7 (Animais Estenosados com Eutanásia Após 7 Dias de Cirurgia)

Este grupo foi o que apresentou maior variação dos achados. Macroscopicamente, os trombos estavam mais pálidos e com proporções reduzidas em relação ao subgrupo anterior (E1). Microscopicamente, os trombos apresentavam hemácias, fibrina e células inflamatórias, na maioria, macrófagos. As fibras elásticas da lâmina elástica interna abaixo do trombo continuavam irregulares e rotas. Alguns casos apresentavam sinais mais nítidos de organização com grande migração de células para o trombo e reendotelização iniciada pela base do mesmo. Nestes, as fibras elásticas estavam recompostas e foram observadas células fusiformes contendo vesículas justanucleares abaixo da região em estado mais adiantado de organização, consideradas daqui a diante, como células musculares lisas. Na adventícia, iniciou-se a formação de tecido de granulação. Na gordura adventicial, foram visualizados granulomas tipo corpo estranho envolvendo pêlos ou fios de sutura. Estas alterações eram independentes da parede arterial propriamente dita. As alterações morfológicas estão apresentadas na Figura 5.

4.2.4 SUBGRUPO S7 (ANIMAIS SHAM-OPERADOS COM EUTANÁSIA APÓS 7 DIAS DE CIRURGIA)

Macroscopicamente, não foram visualizados trombos ou espessamentos. Na análise microscópica, não foram observadas alterações no endotélio ou na camada média. A adventícia também apresentou um aumento da população residencial, mas com formação de tecido de granulação, em menor proporção que os animais estenosados. O orifício da artéria renal esquerda permanecia aberto.

Figura 5. Macroscopia e estudo morfológico com microscopia óptica de alta resolução dos animais estenosados e com eutanásia até 7 dias após a cirurgia (Subgrupo E7): (A) Segmento de aorta apresentando trombo de forma triangular e bem aderido ao pino inserido no orifício da artéria renal esquerda. No detalhe: visão superior do trombo na porção distal; Barra = 1mm. (B) Corte longitudinal da aorta respeitando as proporções do pino ilustrando o início da organização do trombo nas regiões proximal e distal. Azul de toluidina e fucsina básica, aumento original 100x, barra = 1mm. A seta (→) indica a direção do fluxo. (C) Detalhe da composição do trombo contendo fibrina, hemácias, células inflamatórias mononucleares já permeado por algumas células musculares lisas (setas). Azul de toluidina e fucsina básica, aumento original 640x; (D) Corte longitudinal evidenciando um trombo amplamente permeado por células musculares lisas e com áreas de reendotelização. Azul de toluidina e fucsina básica, aumento original 400x; (E) Detalhe de um trombo amplamente permeado por células musculares lisas. Azul de toluidina e fucsina básica, aumento original 640x; (F) Transição entre o espessamento intimal e a camada muscular média, separados pela lâmina elástica interna (seta). Notar células musculares lisas da camada média contendo vesículas justanucleares (asteriscos) semelhantes às encontradas no espessamento. Presença de macrófago xantomatoso. Azul de toluidina e fucsina básica, aumento original 1.600x. (p) proximal, (d) distal, (f) fibrina, (e) endotélio, (ma) macrófago xantomatoso.

4.2.5 Subgrupo E15 (Animais Estenosados com Eutanásia Após 15 Dias de Cirurgia)

Macroscopicamente, após secção longitudinal da aorta, foi observado um espessamento intimal, brancacento, em forma triangular com base adjacente ao pino. Este espessamento era mais evidente na região distal, embora fosse também visível na região proximal. Não havia evidências macroscópicas de trombos ou dilatações na aorta. O pino estava revestido por uma delgada película de tecido em continuidade ao espessamento descrito. Microscopicamente, a porção distal estava mais espessa do que na proximal. O espessamento na área próxima ao pino era exclusivamente intimal, recoberto por uma camada endotelial bem definida e caracterizado pela presença abundante de células musculares lisas, poucas células inflamatórias (macrófagos e linfócitos) e raros macrófagos xantomatosos nas porções proximal e distal. As células estavam embebidas em uma matriz extracelular, envoltas por delicadas fibras elásticas jovens (resorcina-fucsina). A camada adventícia apresentava tecido de granulação. Em alguns animais, foram observados próximo ao pino, resquícios trombóticos caracterizados pela presença de fibrina. As alterações morfológicas estão apresentadas na Figura 6.

4.2.6 Subgrupo S15 (Animais Sham-operados com Eutanásia Após 15 Dias de Cirurgia)

Macroscopicamente, não foram visualizados trombos ou qualquer espessamento. Microscopicamente, todas as camadas da aorta estavam íntegras e sem espessamento evidente, somente a adventícia apresentou um aumento da população residencial, mas, em menor proporção que os animais estenosados.

Figura 6. Macroscopia e estudo morfológico com microscopia óptica de alta resolução dos animais estenosados e com eutanásia até 15 dias após a cirurgia (Subgrupo E15): (A) Segmento de aorta exibindo espessamento intimal em torno do pino inserido no orifício da artéria renal esquerda. Na porção distal, o espessamento apresenta-se em forma triangular, brancacento e com base adjacente ao pino; Barra = 1mm. (B) Corte longitudinal da aorta respeitando as proporções do pino ilustrando o espessamento intimal nas porções proximal e distal. Azul de toluidina e fucsina básica, aumento original 100x, barra = 1mm. A seta (→) indica a direção do fluxo. (C) Espessamento intimal já reendotelizado. Azul de toluidina e fucsina básica, aumento original 640x; (D) Detalhe do espessamento intimal permeado por células musculares lisas (cabeças de seta). Azul de toluidina e fucsina básica, aumento original 1600x; (E) Corte longitudinal da aorta mostrando a presença de delicadas fibras elásticas no espessamento intimal. Resorcina-fucsina, aumento original 320x; (F) Resquícios trombóticos contendo fibrina e restos celulares na região próxima ao pino. Azul de toluidina e fucsina básica, aumento original 640x. (p) proximal, (d) distal, (e) endotélio, (ma) macrófago, (fe) fibras elásticas, (m) camada média, (f) fibrina.

4.2.7 SUBGRUPO E30 (ANIMAIS ESTENOSADOS COM EUTANÁSIA APÓS 30 DIAS DE CIRURGIA)

Macroscopicamente, o espessamento observado no 30º dia parecia mais consistente e completamente incorporado à parede intimal. Mais uma vez, esse espessamento era mais evidente na região distal e não foram observados trombos recentes ou dilatações na parede da aorta. Microscopicamente, a morfologia do espessamento intimal foi semelhante à encontrada no subgrupo E15. Foi observada a presença abundante de células musculares lisas, raras células inflamatórias e a completa reendotelização do espessamento. Em seu interior, as células estavam envoltas por uma matriz extracelular aparentemente mais densa (quando comparada ao subgrupo E15) e por delicadas fibras elásticas jovens (resorcina-fucsina). Novamente, foram observados resquícios trombóticos, mas em menor quantidade quando comparado ao subgrupo E15. Na camada adventícia foram encontrados algumas células gigantes tipo corpo estranho e macrófagos além do tecido de granulação. As alterações morfológicas estão apresentadas na Figura 7.

4.2.8 SUBGRUPO S30 (ANIMAIS SHAM-OPERADOS COM EUTANÁSIA APÓS 30 DIAS DE CIRURGIA)

Não foram observadas alterações macroscópicas nas aortas desses animais. As superfícies não apresentavam trombos e o orifício da artéria renal já não era mais visualizado. Microscopicamente, as camadas íntima e média não apresentavam espessamentos ou resquícios trombóticos.

Figura 7. Macroscopia e estudo morfológico com microscopia óptica de alta resolução dos animais estenosados e com eutanásia até 30 dias após a cirurgia (Subgrupo E30): (A) Segmento de aorta exibindo espessamento intimal em torno do pino inserido no orifício da artéria renal esquerda. Notar como o espessamento está mais aderido à parede; Barra = 1mm. (B) Corte longitudinal da aorta ilustrando o espessamento intimal recobrimdo todo o pino. Azul de toluidina e fucsina básica, aumento original 100x, barra = 1mm. A seta (→) indica a direção do fluxo. (C) Espessamento intimal evidenciando a presença de células fusiformes com vesículas (cabeças de seta). Azul de toluidina e fucsina básica, aumento original 640x; (D) Detalhe da composição do espessamento intimal mostrando a reedotelização. Azul de toluidina e fucsina básica, aumento original 1600x; (E) Corte longitudinal da aorta mostrando a presença de delicadas fibras elásticas no espessamento intimal. Resorcina-fucsina, aumento original 320x; (F) Resquícios trombóticos próximos ao pino contendo fibrina e células inflamatórias. Azul de toluidina e fucsina básica, aumento original 640x. (p) proximal, (d) distal, (mec) matriz extracelular, (m) camada média, (e) endotélio, (fe) fibras elásticas, (f) fibrina.

4.2.9 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS ENCONTRADAS NAS REGIÕES A MONTANTE (I1) E A JUSANTE (I4) DA ÁREA DO ESPESSAMENTO INTIMAL

Após 1 dia de cirurgia, não havia trombos nas regiões I1 e I4. A íntima não apresentava alterações proeminentes, entretanto lesões mínimas focais foram visualizadas. Estavam presentes tanto na região proximal quanto na distal, mas foram mais freqüentemente visualizadas nessa última. Mostravam distribuição aleatória e eram formadas pela presença, quase individual, de células musculares provenientes da camada média. Mesmo alterando a espessura da íntima localmente, estas lesões não influenciaram na espessura intimal média destas regiões. Por meio de coloração específica para fibras elásticas (resorcina-fucsina), foi observada uma aparente fragmentação das fibras elásticas da lâmina elástica interna propiciando a migração dessas células. Estas lesões estão demonstradas na figura 8. A parede arterial contralateral não foi analisada.

No subgrupo de 7 dias, estas lesões tornaram-se mais proeminentes. Foram vistos pequenos focos de células musculares lisas, agora maiores do que com 1 dia, agrupados entre as fibras elásticas da lâmina elástica interna. Estas alterações continuavam mais proeminentes na região distal (I4), mas não estavam relacionadas aos trombos em organização, visualizados ao redor do pino. Através da coloração específica para fibras elásticas, foi observada uma aparente fragmentação das fibras elásticas da lâmina elástica interna proporcionando a migração dessas células. Estas lesões estão demonstradas na figura 8. A parede arterial contralateral não foi analisada.

No subgrupo de 15 dias, foi observado nas regiões I1 e I4 a continuidade do processo de migração descrito anteriormente. De forma mais evidente na região I4,

foi notado que aqueles focos de células musculares lisas estavam envoltos numa matriz extracelular contendo delicadas fibrilas elásticas, mas agora a lâmina elástica interna não demonstrava o aspecto fragmentado observado dos grupos anteriores. Mesmo mais extensas, estas lesões não apresentavam contiguidade com os focos de espessamento intimal na base do pino e, novamente, eram mais proeminentes na região distal.

No subgrupo com 30 dias, a principal diferença desse subgrupo para o anterior é em relação à matriz extracelular, que parecia mais evidente com fibras elásticas mais definidas de permeio, envolvendo as células musculares lisas. Essas lesões continuavam mais evidentes na região distal (I4) e sem relação direta com a área do espessamento. A camada média subjacente a estas regiões não apresentou alterações. Estas lesões estão demonstradas na figura 8. A parede arterial contralateral não foi analisada.

Figura 8. Estudo morfológico com microscopia óptica de alta resolução dos animais estenosados e sham-operados com eutanásia 1, 7, 15 e 30 dias após a cirurgia. Sham: Corte longitudinal da aorta de animais sham-operados. Notar a espessura da íntima sobrejacente à camada média semelhante em todos os dias de eutanásia, azul de toluidina e fucsina básica. HE-like: Corte longitudinal da aorta de animais estenosados. Notar o progressivo espessamento da íntima em decorrência da migração de células musculares lisas e posterior síntese de matriz extracelular, azul de toluidina e fucsina básica. Resorcina-fucsina: Corte longitudinal da aorta de animais estenosados. Notar a fragmentação da lâmina elástica interna permitindo a passagem das células musculares lisas (cabeças de seta), resorcina-fucsina. A seta (→) indica a lâmina elástica interna. As fotomicrografias das colunas HE-like e resorcina correspondem ao mesmo campo. Aumento original 640x.

4.3 GRUPO II: AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DA AORTA ADJACENTE AO PINO UTILIZANDO MICROSCOPIA ÓPTICA DE ALTA RESOLUÇÃO

4.3.1 SUBGRUPOS E7 E S7 (ANIMAIS ESTENOSADOS E SHAM-OPERADOS COM EUTANÁSIA APÓS 7 DIAS DE CIRURGIA)

A extensão média das regiões I1 e I4 foram de $2.613,3 \pm 1417,1 \mu\text{m}$ e $2.060,9 \pm 1297,8 \mu\text{m}$, respectivamente. A extensão média do controle S7 foi de $2.443,8 \pm 875,0 \mu\text{m}$. A espessura média da íntima na região I1 foi de $6,2 \pm 1,5 \mu\text{m}$ e na região I4 $6,3 \pm 0,9 \mu\text{m}$, ambos não foram estatisticamente significantes quando comparados ao subgrupo S7 ($5,7 \pm 1,2 \mu\text{m}$). A espessura da camada média nas quatro regiões mensuradas M1, M2, M3 e M4 ($107,0 \pm 12,12 \mu\text{m}$; $90,0 \pm 30,1 \mu\text{m}$; $95,7 \pm 20,9 \mu\text{m}$ e $99,46 \pm 9,6 \mu\text{m}$, respectivamente) e a densidade nessas mesmas quatro regiões ($54 \pm 6,1$; $51 \pm 12,1$; $60 \pm 5,7$ e $55 \pm 7,0$, respectivamente) não foram estatisticamente significativos quando comparados aos seus controles (subgrupo S7) ($99,9 \pm 12,7 \mu\text{m}$ e $54 \pm 5,6$, respectivamente). A quantidade média de lâminas elásticas foi de 6 tanto em E7 quanto em S7.

As regiões I2 e I3 não foram mensuradas devido aos diferentes estágios de organização do trombo.

4.3.2 SUBGRUPOS E15 E S15 (ANIMAIS ESTENOSADOS E SHAM-OPERADOS COM EUTANÁSIA APÓS 15 DIAS DE CIRURGIA)

A extensão média das regiões I1 e I4 foram $1.356,6 \pm 546,4 \mu\text{m}$ e $1.320,6 \pm 225,2 \mu\text{m}$, respectivamente. A extensão média do controle S15 foi de $2.584,1 \pm 840,7 \mu\text{m}$. A espessura média da íntima na região I1 foi de $6,5 \pm 3,2 \mu\text{m}$ e na região I4 $6,3 \pm 1,6 \mu\text{m}$, ambos não foram estatisticamente significantes quando comparados ao controle S15 ($5,6 \pm 1,5 \mu\text{m}$). Em relação à camada média, as espessuras médias obtidas das regiões M1 e M4 foram $121,1 \pm 17,3 \mu\text{m}$ e $110,8 \pm 27,1 \mu\text{m}$, respectivamente, não sendo estatisticamente significativos quando comparados ao subgrupo S15 ($101,2 \pm 20,5 \mu\text{m}$). A densidade celular observada nessas mesmas regiões foi $52 \pm 3,4$ e $52 \pm 14,2$, respectivamente. Os valores acima não foram estatisticamente significativos em relação ao subgrupo S15 ($49 \pm 2,8$).

Quanto aos espessamentos intimaes das regiões I2 e I3, a extensão média desses locais foi de $1.174,9 \pm 309,5 \mu\text{m}$ e $1.230,8 \pm 476,9 \mu\text{m}$, respectivamente. A espessura média da região I2 foi de $331,5 \pm 253,3 \mu\text{m}$ e da região I3 foi $333,9 \pm 227,2 \mu\text{m}$. A altura máxima do espessamento intimal na região I2 era de $313,4 \pm 134,2 \mu\text{m}$, portanto, menor quando comparada à região I3 ($528,2 \pm 178,5 \mu\text{m}$) ($p < 0.005$). A área do espessamento proximal I2 ($0,173 \pm 0,08 \text{ mm}^2$) foi menor ($p < 0.005$) em relação à área do espessamento distal região I3 ($0,301 \pm 0,1 \text{ mm}^2$). A densidade celular encontrada nessas regiões foi de $44 \pm 6,0$ e $48 \pm 5,0$, respectivamente. A camada média não apresentou diferença significativa entre as espessuras das regiões mensuradas M2 e M3 ($115,7 \pm 13,8 \mu\text{m}$ e $102,4 \pm 9,7 \mu\text{m}$, respectivamente). Esses valores não foram significativos em relação ao subgrupo S15 ($101,2 \pm 20,5 \mu\text{m}$). A densidade celular média apresentada nas regiões M2 e M3

era de $49 \pm 2,6$ e $56 \pm 8,0$, respectivamente. Os valores acima não foram estatisticamente significativos em relação ao subgrupo S15 ($49 \pm 2,8$). A quantidade média de lâminas elásticas foi de 6 tanto em E15 quanto em S15.

A espessura íntima média das regiões I1, I2, I3 e I4 do subgrupo E15 estão representada no gráfico abaixo (Gráfico 2).

Gráfico 2. Esquema da análise de variância (ANOVA) da espessura média da íntima nas quatro regiões mensuradas no subgrupo E15 (I1, I2, I3 e I4) e o controle S15. As regiões I2 e I3 foram estatisticamente significantes quando comparadas às regiões I1, I4 e o controle (* $p < 0.001$), mas não foram significantes entre si.

4.3.3 SUBGRUPOS E30 E S30 (ANIMAIS ESTENOSADOS E SHAM-OPERADOS COM EUTANÁSIA APÓS 30 DIAS DE CIRURGIA)

A extensão média da íntima da região I1 foi de $2.300,4 \pm 315,3 \mu\text{m}$ e na região I4, $2.701,4 \pm 1.493,4 \mu\text{m}$. A extensão média do controle S30 foi de $2.707,9 \pm 1.198,8 \mu\text{m}$. A espessura média da íntima na região I1 foi de $6,8 \pm 0,9 \mu\text{m}$ e na região I4 $8,2 \pm 0,6 \mu\text{m}$. Ambos não foram estatisticamente significantes quando comparados ao subgrupo S30 ($4,4 \pm 0,6 \mu\text{m}$). Quanto à camada média, as espessuras médias obtidas das regiões M1 e M4 foram $102,0 \pm 7,4 \mu\text{m}$ e $97,4 \pm 3,2 \mu\text{m}$, respectivamente, não sendo estatisticamente significativos quando comparados ao subgrupo S30 ($99,3 \pm 7,1 \mu\text{m}$). A densidade celular observada regiões M1 e M4 foi $49 \pm 6,3$ e $48 \pm 5,2$, respectivamente. Os valores acima não foram estatisticamente significativos em relação ao subgrupo S30 ($46 \pm 5,5$).

Em relação às regiões I2 e I3, a extensão do espessamento foi de $588,8 \pm 268,7 \mu\text{m}$ e $669,2 \pm 196,8 \mu\text{m}$, respectivamente. A espessura média da íntima na região I2 foi de $96,4 \pm 33,8 \mu\text{m}$, foi menor ($p < 0.001$) quando comparada a região I3 ($247,2 \pm 49,2 \mu\text{m}$). A altura máxima do espessamento intimal na região I2 apresentava uma média de $503,2 \pm 32,3 \mu\text{m}$, sendo menor em relação à região I3 ($707,3 \pm 103,0 \mu\text{m}$) ($p < 0.05$). A área da região I2 ($0,06 \pm 0,02 \text{ mm}^2$) foi menor em relação a I3 ($0,25 \pm 0,08 \text{ mm}^2$) ($p < 0.005$). A densidade celular média encontrada no espessamento proximal (I2) foi de $53 \pm 9,9$ e no distal (I3) $48 \pm 5,1$. A camada média não apresentou diferença significativa entre as regiões mensuradas M2 e M3 ($95,7 \pm 5,9 \mu\text{m}$ e $98,9 \pm 4,4 \mu\text{m}$, respectivamente), esses valores não foram significantes em relação ao controle S30 ($99,3 \pm 7,1 \mu\text{m}$). A densidade celular média

da região M2 ($59 \pm 6,2$) foi maior quando comparada às regiões M1 ($p < 0.01$), M4 ($p < 0.01$) e controle S30 ($46 \pm 5,5$) ($p < 0.001$). A densidade celular média na região M3 ($60 \pm 11,0$) foi maior quando comparada às regiões M1 ($p < 0.01$), M4 ($p < 0.01$) e controle S30 ($46 \pm 5,5$) ($p < 0.001$). A quantidade média de lâminas elásticas foi de 6 tanto em E30 quanto em S30.

A espessura intimal média das regiões I1, I2, I3 e I4 do subgrupo E30 estão representada no gráfico abaixo (Gráfico 3).

Gráfico 3. Esquema da análise de variância (ANOVA) da espessura média da íntima nas quatro regiões mensuradas no subgrupo E30 (I1, I2, I3 e I4) e o controle S30. A região I2 foi estatisticamente significante quando comparada às regiões I1, I4 e o controle (* $p < 0.001$). A região I3 foi estatisticamente significante quando comparada às regiões I1, I2, I4 e o controle (§ $p < 0.001$).

4.3.4 COMPARAÇÕES MORFOMÉTRICAS DA DENSIDADE CELULAR (CÉLULAS MUSCULARES LISAS) DAS REGIÕES M1, M2, M3 E M4 DA CAMADA MÉDIA SUBJACENTE AO ESPESSAMENTO INTIMAL NOS SUBGRUPOS E7, E15, E30 E SEUS RESPECTIVOS CONTROLES

Foram comparadas as densidades das regiões M1, M2, M3 e M4 dos grupos de eutanásia com 7 dias (E7 e S7), 15 dias (E15 e S15) e 30 dias (E30 e S30). No subgrupo E7, a região M3 ($60 \pm 5,7$) foi estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em relação ao controle S30 ($46 \pm 5,5$). No subgrupo E15, a região M2 ($49 \pm 2,6$) foi estatisticamente significativa em relação à região M3 ($60 \pm 11,0$) do subgrupo E30 ($p < 0.05$). O controle S15 ($49 \pm 2,8$) foi estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em relação à região M3 ($60 \pm 11,0$) subgrupo E30. A região M2 ($59 \pm 6,2$) subgrupo E30 foi considerada estatisticamente significativa ($p < 0.01$) quando comparada ao controle S30 ($46 \pm 5,5$). Já a região M3 ($60 \pm 11,0$) subgrupo E30 foi estatisticamente significativa em relação às regiões M1 ($49 \pm 6,3$) e M4 ($48 \pm 5,2$) do mesmo subgrupo.

4.4 GRUPO III: AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DA ÍNTIMA DA AORTA ADJACENTE AO PINO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

4.4.1 Subgrupo E7 (Animais Estenosados com Eutanásia Após 7 Dias de Cirurgia)

Na microscopia eletrônica de transmissão, foi possível melhor caracterizar algumas alterações observadas na microscopia óptica de alta resolução. Foi identificada a presença de células mononucleares (monócitos) realizando diapedese em uma área reendotelizada. O espessamento intimal ainda apresentava resquícios trombóticos (hemácias e fibrina), mas sua constituição principal era de células alongadas com características de células musculares lisas. Raros macrófagos xantomatosos foram observados. Na região da lâmina elástica interna, também foi visualizada a migração de células musculares lisas pelas fenestras. As alterações morfológicas estão apresentadas na Figura 9.

4.4.2 Subgrupo E15 (Animais Estenosados com Eutanásia Após 15 Dias de Cirurgia)

Ultraestruturalmente, o espessamento intimal mostrava-se reendotelizado, contendo células musculares, contendo grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso no citoplasma e vesículas de gordura. A matriz extracelular era constituída de colágeno e fibrilas protéicas e também foi observada a presença de fibras elásticas jovens envolvendo as células musculares lisas. As alterações morfológicas estão apresentadas na Figura 10.

4.4.3 Subgrupo E30 (Animais Estenosados com Eutanásia Após 30 Dias de Cirurgia)

As observações foram semelhantes às encontradas no subgrupo E15. O espessamento intimal já estava totalmente reendotelizado. Foram observados raros macrófagos xantomatosos e grande quantidade de células musculares lisas, as

quais permeavam todo o espessamento. A matriz extracelular era mais densa, constituída por colágeno e fibras elásticas jovens. As alterações morfológicas estão apresentadas na Figura 11.

Figura 9. Ultraestrutura das células presentes no trombo mostrando o grau de organização nos animais estenosados e com eutanásia até 7 dias após a cirurgia (Subgrupo E7): (A) Monócito migrando pelo endotélio. Notar a presença de células musculares lisas e hemácias de permeio. Acetato de uranila e citrato de chumbo, aumento original 4.400x; (B) Macrófago xantomatoso cercado por células musculares lisas. Acetato de uranila e citrato de chumbo, aumento original 4.400x; (C) Migração de células musculares lisas por uma fenestra da lâmina elástica interna para a íntima. Acetato de uranila e citrato de chumbo, aumento original 4.400x. (mo) monócito, (ce) célula endotelial, (m) célula muscular lisa, (h) hemácia, (v) vesículas, (ma) macrófago xantomatoso, (lei) lâmina elástica interna.

Figura 10. Ultraestrutura das células presentes no espessamento intimal nos animais estenosados e com eutanásia até 15 dias após a cirurgia (Subgrupo E15): (A) Superfície do espessamento mostrando a reendotelização e a presença de células musculares lisas, logo abaixo do endotélio. Notar a grande quantidade de retículos endoplasmáticos rugosos (seta). Acetato de uranila e citrato de chumbo, aumento original 4.400x; (B) Células musculares lisas com vesículas em seu citoplasma. Acetato de uranila e citrato de chumbo, aumento original 4.400x; (C) Célula muscular lisa com vesículas envolta pela matriz extracelular. Acetato de uranila e citrato de chumbo, aumento original 4.400x. (ce) célula endotelial, (m) célula muscular lisa, (v) vesículas.

Figura 11. Ultraestrutura das células presentes no espessamento intimal nos animais estenosados e com eutanásia até 30 dias após a cirurgia (Subgrupo E30): (A) Superfície do espessamento reendotelizado, mostrando a presença de células musculares lisas logo abaixo do endotélio. Acetato de uranila e citrato de chumbo, aumento original 4.400x; (B) Células musculares lisas envoltas pela matriz extracelular. Acetato de uranila e citrato de chumbo, aumento original 7.000x; (C) Fibra elástica próxima às células musculares lisas. Notar a matriz extracelular mais densa. Acetato de uranila e citrato de chumbo, aumento original 4.400x. (ce) célula endotelial, (m) célula muscular lisa, (fe) fibra elástica.

4.5 GRUPO IV: AVALIAÇÃO DA ORIENTAÇÃO DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS DA ÍNTIMA DA AORTA ADJACENTE AO PINO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

4.5.1 Subgrupo E15 (Animais Estenosados com Eutanásia Após 15 Dias de Cirurgia)

A superfície do pino estava completamente coberta por endotélio, sendo que a região distal era mais espessa do que a região proximal. Na região I1, as células endoteliais apresentavam-se alongadas e orientadas de acordo com o fluxo. Na região I2, notou-se que as células endoteliais mostravam uma discreta perda de orientação. As células endoteliais sobre o pino estavam orientadas no sentido do fluxo e bem alongadas em relação às outras regiões estudadas. Na região I3, as células endoteliais apresentavam-se completamente desorientadas quanto ao fluxo e em forma poligonal. Na região I4, as células endoteliais estavam alongadas e orientadas de acordo com a direção do fluxo. As alterações morfológicas estão apresentadas na Figura 12.

4.5.2 Subgrupo S15 (Animais Sham-operados com Eutanásia Após 15 Dias de Cirurgia)

As células endoteliais da aorta apresentavam-se alongadas e de forma fusiforme de acordo com o sentido do fluxo. Não foram observados espessamentos, trombos ou alterações aparentes.

Figura 12. Microscopia eletrônica de varredura da aorta do grupo de animais estenosados e com eutanásia até 15 dias após a cirurgia (Subgrupo E15): (A) Visão panorâmica da aorta com o pino inserido no orifício da artéria renal esquerda. Notar que a região distal está espessada, aumento original 14x; (B) Detalhe da região distal do pino mostrando o espessamento intimal mais proeminente, aumento original 84x; (C) Células endoteliais da região a montante da estenose (I1) orientadas paralelamente ao fluxo, aumento original 1.000x; (D) Células endoteliais da região imediatamente antes da estenose (I2) com discreta desorientação em relação ao fluxo, aumento original 1.000x; (E) Porção mais alta do pino mostrando as células endoteliais mais alongadas e paralelas ao fluxo, aumento original 1.000x; (F) Células endoteliais observadas na região imediatamente após a estenose (I3) apresentam desorientação em relação ao fluxo, aumento original 1.000x; (G) Células endoteliais observadas na região a jusante da estenose (I4) orientadas de acordo com o fluxo, aumento original 1.000x; (H) Células endoteliais do grupo de animais não-estenosados mostrando a orientação em relação ao fluxo. Esse aspecto foi observado nas quatro regiões estudadas. (p) proximal, (d) distal. A seta (→) indica a direção do fluxo.

5. DISCUSSÃO

O modelo utilizado mostrou-se bastante eficiente no propósito de promover uma obstrução na aorta em cerca de 50% quando do fim do experimento, ou seja, no 30º dia pós-operatório. Entretanto, algumas dificuldades encontradas durante o decorrer do estudo estão relatadas a seguir: para a realização do ato cirúrgico tivemos que recorrer a um cirurgião treinado devido à complexidade do mesmo; o fio utilizado na retenção do pino de acrílico deve ser o mais fino possível, senão pode ocorrer a extrusão do mesmo, fato às vezes observado neste experimento; o anestésico deve ser de pouca duração e não promover acentuadas quedas na pressão sangüínea, favorecendo o colapso circulatório do animal e muitas vezes, óbito; não há necessidade de vasodilatadores para introdução de um pino com estas dimensões no orifício da artéria renal esquerda de ratos Wistar com 250 g em média; somente através de métodos ultrassonográficos muito sofisticados pode ser possível a visualização da obstrução e, conseqüentemente, da alteração do fluxo em torno do mesmo (então esta observação teve que ser baseada nos resultados do trabalho original, que obteve esta informação através de modelos físicos em grande escala) e a dimensão dos fragmentos obtidos limita a quantidade de cortes histológicos obtidos.

Apesar destas dificuldades, conseguimos êxito em nosso propósito de promover uma situação experimental de estenose aórtica intrínseca, teoricamente sem alterações importantes nas forças intramurais das artérias, que freqüentemente dificultam as conclusões obtidas em outros modelos (JORIS; ZAND; MAJNO, 1982; ZAND et al.,1988; ZAND et al.,1991). Por outro lado, esta não é uma situação comparável a fenômenos biológicos usualmente observados na patologia humana, por exemplo, ateroma, porque no modelo preconizado, o remodelamento arterial é

bem mais rápido do que em situações fisiológicas e é iniciado por uma alteração mecânica abrupta com repercussões agudas e imediatas na homeostase vascular. Entre estas alterações, as mais importantes foram o distúrbio agudo do fluxo laminar na aorta que passa de forma súbita a conter uma área importante de turbilhonamento e a lesão endotelial decorrente do mesmo. Em um experimento-piloto utilizando três animais, realizamos simplesmente a introdução e a posterior retirada, após alguns minutos, do pino de acrílico e pudemos observar através de estudo imunoistoquímico que houve apenas um desnudamento endotelial mínimo da aorta nas regiões adjacentes ao orifício da artéria renal esquerda, comprovado pela marcação das células endoteliais pelo Fator von Willebrand (dados do nosso laboratório). Concluimos, então, que as alterações discutidas a seguir sejam fidedignas ao objetivo inicial do modelo, que era promover um turbilhonamento arterial em decorrência de uma estenose abrupta e observar suas consequências imediatas e mediatas até 30 dias após o ato cirúrgico.

A inserção do pino acrílico gerou um turbilhonamento que, por consequência, desnudou o endotélio e lesou a lâmina elástica interna expondo a camada subjacente, altamente trombogênica. A formação deste trombo foi bem demonstrada neste estudo. Além da ruptura da lâmina elástica interna, demonstramos a presença de hemácias entre as fibras elásticas na região subjacente ao trombo. Segundo a classificação de Ip e col. (1990), esta seria uma lesão vascular de grau III, na qual o desnudamento endotelial seria seguido de lesão intimal e da camada média. Nesse tipo de lesão ocorreria uma intensa agregação plaquetária, pré-requisito para uma subsequente resposta fibroproliferativa acelerada (IP et al., 1990). O fibrinogênio, presente em grande quantidade no trombo com até 24 horas (dados do nosso laboratório), poderia ter um papel nesta resposta proliferativa. Tem sido comprovada

in vitro, sua capacidade de induzir sozinho a migração de células musculares lisas, mesmo sem o envolvimento de outras substâncias quimiocinéticas ou quimiotáticas (NAITO et al., 1996). Além do mais, sua presença em trombos murais que, em seguida, são incorporados à parede vascular tem sido relacionada aos fenômenos de reestenose observados em alguns casos pós-angioplastia (BOSMANS et al., 1997). Em adição, o rompimento da elastina da matriz extracelular da parede vascular e a trombina produzida durante o processo de trombose também têm sido implicados na indução desta proliferação (IP et al., 1990; LI et al., 1998).

Sabe-se que a lesão da parede arterial deve gerar uma série de estímulos quimiotáticos para leucócitos, além de um conjunto de citocinas e fatores de crescimento, que são secretados produzindo múltiplos efeitos. Estas citocinas, entre elas, interferon-gama, IL-1 e TNF-alfa, induzem a formação da iNOS (*inducible NO synthase* – óxido nítrico sintase induzível). A indução da iNOS após uma lesão arterial, ao invés de impedir, deve na verdade promover a proliferação e o crescimento celular (CHYU et al., 1999). Yamasaki e col. (1998) relataram que os processos reparativos estão diminuídos nos camundongos iNOS-*knockout* e vários trabalhos têm relatado que a expressão da iNOS estaria freqüentemente associada a estados patológicos, como aterosclerose e vasculopatias do transplante (LAFOUND-WALKER et al., 1997; LUOMA et al., 1998; RUSSEL et al., 1997). Juntos estes dados corroboram com a hipótese de que a indução do iNOS após uma injúria arterial poderia favorecer o desenvolvimento de uma neoíntima, considerada como uma resposta reparativa à injúria tissular. Entretanto, o papel exato nessa modulação ainda não está completamente esclarecido.

O NO (*nitric oxide* – óxido nítrico) gerado pela expressão da iNOS poderia reagir com o superóxido levando à formação do peroxinitrito (CHYU et al., 1999).

Este potente oxidante poderia alterar o estado redox das células, resultando numa persistente ativação das células inflamatórias, levando, portanto, a uma maior liberação de NO pela iNOS (CHYU et al., 1999). Fora a geração de mais citocinas inflamatórias, estas substâncias oxidantes poderiam estar implicadas no aumento da expressão de proto-oncogenes, tipo o *c-fos* e o *c-myc*, o primeiro comprovadamente envolvido em áreas com intensa atividade proliferativa (LAVEZZI et al., 2003).

Células musculares lisas compuseram a principal célula do espessamento intimal observado neste modelo experimental. São estas as células que mais proliferam na camada média da parede arterial e, em seguida, migram através da lâmina elástica interna rompida para compor a principal célula do espessamento intimal neste modelo experimental. As citocinas liberadas pela injúria vascular ativariam fatores de crescimento como o bFGF (*basic fibroblast growth factor* – fator de crescimento básico de fibroblastos) e o PDGF (*platelet-derived growth factor* – fator de crescimento derivado de plaquetas) promovendo a ativação das células musculares lisas da camada média da parede arterial, convertendo-as de um fenótipo contrátil para um sintético. Concomitante a esta alteração haveria ativação das enzimas atuantes na matriz extracelular, tipo metaloproteinases, que degradariam o colágeno e a elastina, permitindo a passagem destas células pela lâmina elástica interna para a íntima e levando ao espessamento intimal (KIBBE et al., 1999). Através da microscopia eletrônica de transmissão, evidenciamos esta migração no subgrupo com 7 dias de pós-operatório e o fenótipo sintético das células musculares (grande quantidade de retículos endoplasmáticos rugosos e aparelhos de Golgi, poucos miofilamentos visíveis e vesículas lipídicas intra-citoplasmáticas), presentes no espessamento intimal nos subgrupos estenosados com 15 e 30 dias de experimento. Estas células têm sido implicadas na migração celular e na formação

do espessamento intimal, tanto em casos de hiperplasia causada por diferentes etiologias quanto para lesões ateroscleróticas propriamente ditas, com contribuição no desenvolvimento da matriz extracelular do espessamento intimal (IP et al., 1990). Aumento da deposição de fibrilas elásticas e de colágeno a partir do 15º dia de pós-operatório foram bem evidenciados no espessamento intimal observado neste experimento.

Por outro lado, mesmo com a evidência da passagem de monócitos do sangue para o espessamento intimal como demonstrado na microscopia eletrônica de transmissão, os macrófagos habituais ou xantomatosos não foram proeminentes no nosso estudo. Eles foram mais evidentes no 7º dia de pós-operatório e diretamente relacionados à organização do trombo. Esse fato vai ao encontro à pequena quantidade de MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1* - proteína quimiotática para monócitos-1) e macrófagos, demonstrado imunoistoquimicamente, num estudo paralelo do nosso laboratório. O primeiro, presente em pequenas proporções nas células endoteliais dos animais operados e no espessamento intimal apenas no grupo de 15 dias, parece não ter tido uma participação ativa no desenvolvimento das lesões observadas neste experimento. Em 2002, Namiki e col. sugeriram haver um sinergismo entre produção de MCP-1 e dieta hipercolesterolêmica. Na ausência de hipercolesterolemia, a MCP-1 não induziria lesão vascular. Coelhos tratados com dieta hipercolesterolêmica por quatro semanas não apresentariam na carótida, alterações histológicas associadas à aterosclerose. Estrias gordurosas e xantomias intimais só seriam observadas após a transferência genética de MCP-1 (NAMIKI et al., 2002). Com estas observações, foi sugerido que a MCP-1 necessitaria da interação com outros fatores para promover a infiltração de macrófagos na parede vascular. Este estudo explicaria a presença de lipídeos no espessamento intimal,

quatro meses após da cirurgia, no modelo proposto por Zand e col. (1999), onde os animais foram submetidos à dieta hipercolesterolêmica. Em nosso estudo, referente às quatro semanas iniciais das lesões decorrentes deste modelo de estenose intrínseca da aorta, estas alterações não foram observadas.

A densidade celular encontrada nas aortas dos animais estenosados 15 dias após a cirurgia nas regiões M2 e M3 foram menores ($p < 0.05$) em relação às mesmas regiões das aortas dos animais estenosados 30 dias após a cirurgia. Esses dados estão de acordo com os resultados de um estudo paralelo do nosso laboratório utilizando imunoistoquímica para PCNA (*proliferating cell nuclear antigen* - antígeno nuclear de proliferação celular). Nesse estudo, a atividade proliferativa da camada média subjacente à área de lesão vascular começa a ser evidenciada logo nas primeiras 24 horas do experimento, aumentando após 7 dias de cirurgia. A resposta proliferativa na parede arterial decai significativamente a níveis não detectáveis no 15º dia do experimento, entretanto, continua no espessamento intimal. No 30º dia pós-operatório, a marcação do PCNA volta a ser positiva nas células endoteliais e na camada média da parede arterial e aumenta ainda mais no espessamento intimal. Esta observação poderia ser relacionada à participação de fenômenos diferentes dos iniciais decorrentes da lesão vascular. Sabemos que neste modelo, foram descritas alterações do *stress* por cisalhamento (*wall shear stress*), fundamental na manutenção da homeostase vascular (DZAU; GIBBONS, 1993; ZAND et al., 1999). Estas alterações, notadamente o baixo *stress* por cisalhamento gerado em decorrência da formação de áreas de recirculação e estase nas regiões próximas ao pino, poderiam estar atuando gerando estímulos nocivos às células endoteliais que revestem o espessamento que voltariam a produzir iNOS e, conseqüentemente, peroxinitrito. Em nosso estudo, houve um aumento da produção de iNOS e

nitrotirosina no 30º dia do experimento (dados de nosso laboratório). Fora a geração de mais citocinas inflamatórias, estas substâncias oxidantes poderiam estar implicadas no aumento da expressão de proto-oncogenes, tipo o *c-fos* e o *c-myc*, o primeiro comprovadamente envolvido em áreas com intensa atividade proliferativa (LAVEZZI et al, 2003). Um aumento da expressão do *c-fos* poderia explicar o aumento da atividade proliferativa no espessamento intimal após 30 dias do pós-operatório.

No estudo morfométrico, observamos que além da formação de um espessamento na íntima na base do pino bilateralmente, o espessamento localizado na região a jusante da obstrução apresentava com maiores proporções em todos os parâmetros dimensionados no estudo (altura em relação ao pino, extensão pela parede arterial e área total). Resultados similares foram obtidos por Zand e col. (1999). Vários trabalhos têm relatado que alterações hemodinâmicas podem influenciar na biologia das células endoteliais (NEREM et al., 1993). Estudos *in vivo* têm apontado que o alongamento de uma célula endotelial indicaria o nível do *stress* por cisalhamento e que a sua orientação refletiria a direção do fluxo num vaso arterial (SILKWORTH; STEHBENS, 1975; NEREM; LEVESQUE; CORNHILL, 1981). Embora estas alterações não possam ser consideradas conclusivas, o nosso estudo mostrou através da microscopia eletrônica de varredura, que o endotélio na região imediatamente a jusante da obstrução apresentava uma completa alteração no sentido da orientação das células em relação ao fluxo sanguíneo. Baseados no modelo de Zand e col. (1999), sabemos que esta região está propensa a alterações hemodinâmicas, como separação de fluxo e recirculação, provavelmente, com repercussões diretas no *stress* por cisalhamento. Estas alterações promoveriam a formação de um vórtice pós-estenótico, provocando oscilações nos níveis *stress* por

cisalhamento com repercussão nas células endoteliais presente nessas áreas (HUTCHISON, 1991).

Alterações mínimas na íntima da aorta dos animais estenosados foram visualizadas nas regiões mais distantes da área da estenose propriamente dita. Nas chamadas regiões I1 e I4, respectivamente anteriores e posteriores à obstrução, pudemos observar na microscopia eletrônica de alta resolução, pequenos focos de espessamento intimal às custas da passagem de células musculares lisas da camada média através da lâmina elástica interna. Interessante notar que nas primeiras 24 horas do experimento, estas lesões eram formadas basicamente por uma ou duas células, que através de um processo de fragmentação das fibras elásticas da lâmina elástica interna, conseguiam progredir em direção à íntima. Este processo poderia ser propiciado pela liberação de proteases pelas próprias células musculares como referido anteriormente. Com 7 dias, víamos que este processo parecia progredir, pois os pequenos focos de espessamento agora continham um agrupamento maior de células envoltas num mínimo de matriz extracelular. Estes espessamentos ainda se encontravam completamente envoltos pela lâmina elástica interna, mesmo aparentemente fragmentada. Entretanto com 15 dias, o espessamento agora era mais nítido, repercutindo diretamente na espessura intimal. Não parecia mais haver a contenção pela lâmina elástica interna, mas sim, uma produção própria de elastina dentro do espessamento. Estas características foram semelhantes no subgrupo de 30 dias de pós-operatório, mas aparentemente, o espessamento tornara-se mais definido ainda. Interessante notar que estas lesões, embora observadas antes e depois da obstrução, foram mais proeminentes na região I4, ou seja, a jusante da região estenosada e em nenhum dos animais estudados, estas lesões foram contíguas ao espessamento propriamente dito. Estas

alterações poderiam estar relacionadas a um possível efeito parácrino de alguns mediadores químicos. Estes poderiam ser produzidos pelas células endoteliais e estarem sujeitas a alterações hemodinâmicas neste modelo experimental de estenose aórtica. A manutenção deste estímulo implicaria no aspecto crescente, mesmo que independente da lesão principal. Num estudo paralelo, em apenas dois animais sacrificados após 60 e 75 dias da cirurgia, observamos que estes focos apresentavam-se fundidos ao espessamento principal na base do pino. Estes dados deverão ser melhor explorados num futuro próximo.

A idéia de que um espessamento intimal possa ser resultante de uma trombose não chega a ser uma novidade. Von Rokitansky (1852) defendia que os ateromas poderiam ser produzidos pela deposição “de um produto endógeno derivado do sangue e, na maioria, da fibrina do sangue arterial”. Ele observou que “havia uma alteração do material depositado nessas massas... consistindo em grande parte por cristais de colesterol, glóbulos de gordura e de moléculas... consistindo de albumina e sais de cálcio” e isto foi, sem dúvida, a idéia corrente até que Virchow (1856) introduziu a sua idéia sobre a proliferação do tecido conectivo nas doenças arteriais. Em 1856, Virchow contradisse a “hipótese da incrustação” de Rokitansky, alegando que os depósitos eram subendoteliais e, portanto, não deveriam ser provenientes do sangue. Suas idéias prevaleceram sobre a de Rokitansky, mas a hipótese da incrustação não foi completamente abandonada, tanto que 40 anos depois, Ziegler (1896-1897) descreve em seu livro que “os trombos de fibrina presentes nas artérias se organizam formando espessamentos análogos àqueles presentes no endocárdio”. Atualmente, esta hipótese parece ter sido ignorada completamente, com exceção de relatos históricos como os mencionados acima. Um dos últimos textos publicados sobre este assunto parece ser o de Duguid (1946) intitulado

“Thrombosis as a factor in the pathogenesis of coronary atherosclerosis”, onde estudando trombozes coronarianas de humanos, este autor defendeu que muitas das lesões classificadas como aterosclerose são decorrentes de trombos arteriais que, após um processo de organização, se transformam em espessamentos intimaes. Por fim, referiu ainda que “os trombos vermelhos têm tendência a amolecer por uma degeneração gordurosa” e que “muitas das placas ateromatosas encontradas nos espessamentos arteriais parecem ser o resultado deste processo”.

Por fim, esse modelo experimental de estenose aórtica intrínseca gera alterações abruptas no fluxo sanguíneo com formação de trombose em torno da obstrução. Esse trombo é permeado progressivamente por células musculares lisas provenientes da camada média subjacente. Há produção de matriz extracelular e reendotelização gerando uma hiperplasia intimal. Alterações hemodinâmicas locais com reflexos negativos na homeostase intra-vascular podem ser fundamentais na formação e manutenção desta hiperplasia. A interação desses processos pode repercutir na íntima da aorta nas áreas próximas à obstrução.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu MA, Baroza LGV, Rossi MA. Toluidine blue-basic fuchsin stain for glycolmetacrylate embedded tissue. *J Histotechnol* 1993;16:139-40.

Bosmans JM, Kockx MM, Vrints CJ, Bult H, De Meyer GR, Herman AG. Fibrin(ogen) and von Willebrand factor deposition are associated with intimal thickening after balloon angioplasty of the rabbit carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17(4):634-45.

Cannon MS, Stuth NR. Combination hematoxylin-eosin-rose bengal and resorcin-fuchsin connective tissue stain for glycolmetacrylate embedded sections. *J Histotechnol* 1993;16:141-2.

Chyu KY, Dimayuga P, Zhu J, et al. Decreased neointimal thickening after arterial wall injury in inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Circ Res* 1999; 85(12):1192-8.

Davies PF. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev* 1995; 75:519-60.

Davis C, Fischer J, Ley K, Sarembock IJ. The role of inflammation in vascular injury and repair. *J Thromb Haemost* 2003;1:1699-709.

Duguid JB. Thrombosis as a factor in the pathogenesis of coronary atherosclerosis. *J Pathol* 1946; 58 (1):207-12.

Dzau VJ, Gibbons GH. Vascular remodeling: mechanisms and implications. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;21 Suppl 1:S1-5.

Gimbrone MA Jr, Topper JN, Nagel T, Anderson KR, Garcia-Cardena G. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 902:230-9.

Hutchison KJ. Endothelial cell morphology around graded stenoses of the dog common carotid artery. *Blood Vessels* 1991;28(5):396-406.

Ip JH, Fuster V, Badimon L, Badimon J, Taubman MB, Chesebro JH. Syndromes of accelerated atherosclerosis: role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation. *J Am Coll Cardiol* 1990;15:1667-87.

Joris I, Zand T, Majno G. Hydrodynamic injury of the endothelium in acute aortic stenosis. *Am J Pathol* 1982;106:394-408

Kibbe M, Billiar T, Tzeng E. Inducible nitric oxide synthase and vascular injury. *Cardiovasc Res* 1999;43(3):650-7.

Lafond-Walker A, Chen CL, Augustine S, Wu TC, Hruban RH, Lowenstein CJ. Inducible nitric oxide synthase expression in coronary arteries of transplanted human hearts with accelerated graft arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1997;151(4):919-25.

Lavezzi AM, Milei J, Grana DR, Flenda F, Basellini A, Matturri L. Expression of *c-fos*, p53 and PCNA in the unstable atherosclerotic carotid plaque. *Int J Cardiol* 2003; 92(1):59-63.

Li DY, Brooke B, Davis EC, Mecham RP, Sorensen LK, Boak BB, et al. Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis. *Nature* 1998;393(6682):276-80.

Luoma JS, Stralin P, Marklund SL, Hiltunen TP, Sarkioja T, Yla-Herttuala S. Expression of extracellular SOD and iNOS in macrophages and smooth muscle cells in human and rabbit atherosclerotic lesions: colocalization with epitopes characteristic of oxidized LDL and peroxynitrite-modified proteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18(2):157-67.

Lyon RT, Runyon-Hass A, Davis HR, Glagov S, Zarins CK. Protection from atherosclerotic lesion formation by reduction of artery wall motion. *J Vasc Surg* 1987; 5(1):59-67.

Malek AM, Alper SL, Izumo S. Shear stress hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *JAMA* 1999;282(21):2035-42.

Naito M, Nomura H, Iguchi A. Migration of cultured vascular smooth muscle cells into non-crosslinked fibrin gels. *Thromb Res* 1996 15;84(2):129-36.

Namiki M, Kawashima S, Yamashita T, Ozaki M, Hirase T, Ishida T, et al. Local overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 at vessel wall induces infiltration of macrophages and formation of atherosclerotic lesion: synergism with hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22(1):115-20.

Nerem RM, Levesque MJ, Cornhill JF. Vascular endothelial morphology as an indicator of the pattern of blood flow. *J Biomech Eng* 1981;103(3):172-6.

Nerem RM, Harrison DG, Taylor WR, Alexander RW. Hemodynamics and vascular endothelial biology. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;21 Suppl 1:S6-10.

Newby AC, Zaltsman AB. Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. *J Pathol* 2000;190:300-9.

Russell ME, Wallace AF, Wyner LR, Newell JB, Karnovsky MJ. Upregulation and modulation of inducible nitric oxide synthase in rat cardiac allografts with chronic rejection and transplant arteriosclerosis. *Circulation* 1995;92(3):457-64.

Silkworth JB, Stehbens WE. The shape of endothelial cells in en face preparations of rabbit blood vessels. *Angiology* 1975;26:474-487.

Virchow E. *Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen. Medicin*, Frankfurt 1856;499-513.

Von Rokitansky C. *A manual of pathological anatomy*, trans. George E. Day, London, 1852;lv: 272.

Yamasaki K, Edington HD, McClosky C, et al. Reversal of impaired wound repair in iNOS-deficient mice by topical adenoviral-mediated iNOS gene transfer. *J Clin Invest* 1998;101(5):967-71.

Zand T, Majno G, Nunnari JJ, Hoffman AH, Savilonis BJ, MacWilliams B, et al. Endothelial adaptations in aortic stenosis. *Am J Pathol* 1988 Nov;133(2):407-18.

Zand T, Majno G, Nunnari JJ, Hoffman AH, Savilonis BJ, MacWilliams B, et al. Lipid deposition and intimal stress and strain. A study in rats with aortic stenosis. *Am J Pathol* 1991 Jul;139(1):101-13.

Zand T, Hoffman AH, Savilonis BJ, Underwood JM, Nunnari JJ, Majno G, et al. Lipid deposition in rat aortas with intraluminal hemispherical plug stenosis: A morphological and biophysical study. *Am J Pathol* 1999 ;155(1):85-92.

Ziegler E. A text book of special pathological anatomy.trans. and by Donald Macalister and Henry W. Cattell from the 8th German ed., New York, 1896; i: 71

ANEXO A

COLORAÇÕES

Acetato de uranila e Citrato de chumbo (coloração de Reynold's) (Microscopia eletrônica de transmissão): As grades foram contrastadas por 20 minutos. Em seguida, foram retiradas do acetato de uranila e lavadas com metanol a 50%. Foram dados três banhos com água bidestilada e prosseguiu-se com a contrastação utilizando o citrato de chumbo.

Azul de toluidina e Fucsina básica (HE-like): Os cortes foram cobertos com algumas gotas da solução A por 3-5 minutos em platina aquecedora a 55-60°C, lavados em água corrente e secos em platina aquecedora. A seguir, os cortes foram cobertos com gotas da solução B por 1 minuto à temperatura ambiente, lavados em água corrente e secos em platina aquecedora. As lâminas foram montadas temporariamente com água.

Resorcina-Fucsina: Os cortes foram corados com a solução de resorcina-fucsina básica férrica de Weigert por 20 minutos à temperatura ambiente e verificado periodicamente no microscópio a coloração das fibras elásticas até que estejam azuis-escuras ou pretas. Logo após, as lâminas foram lavadas em álcool 95% por poucos segundos e em seguida, com água corrente por 30-60 segundos. Após, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Gill por 20 minutos à temperatura ambiente, lavados brevemente em água destilada e a seguir, as lâminas foram mergulhadas em solução Scott por 2 minutos e lavadas brevemente em água destilada. Após esse procedimento, os cortes foram corados com solução de eosina-floxina por 20 minutos, lavados rapidamente com água destilada. A seguir, os fragmentos foram desidratados rapidamente com álcool 95% (5 mergulhos), álcool

100% (2 trocas de 5 mergulhos cada) e diafanizados com xilol (2 trocas de 5 mergulhos cada). As lâminas foram montadas com Entellan (Merck S.A.).

ANEXO B

REAGENTES E SOLUÇÕES

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

Aldeído glutárico a 1%: Foram misturados 14,4 ml de água destilada e 0,6 ml de aldeído glutárico a 25% (Electron Microcopy Science, Washington, PA, EUA).

Aldeído glutárico a 3,6%: Foi misturado 1 ml de aldeído glutárico a 25% e 5,94 ml de água destilada.

Aldeído glutárico a 4%: Foram misturados 4 ml de aldeído glutárico a 25% (Electron Microcopy Science), 12,5 ml de tampão cacodilato de sódio 0,2 M e completo para 25 ml de água destilada.

Araldite 502: Foram misturadas 10 partes de Araldite 502 (Polysciences Inc., Washington, PA, EUA) e 7 partes de DDSA (Polysciences Inc.). A seguir, a mistura foi agitada cuidadosamente para ficar completamente homogênea. Acrescentou-se então, 1,5% de DMP-30 (Polysciences Inc.). A mistura foi congelada e guardada hermeticamente fechada na geladeira.

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.) e 15 ml de água bidestilada gelada. Agitou-se então, vigorosamente por 1 minuto e foi deixado descansando por 30

minutos, agitando a cada 5 minutos. Em seguida, foram misturados 4 ml de solução de NaOH 1 N gelada e adicionado água bidestilada gelada até 25 ml.

HCl 1%: Foi misturado 0,46 ml de ácido clorídrico p.a. a 19,54 ml de água destilada.

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 0,1 M.

NaOH 1 N: Foi dissolvido 1 g de hidróxido de sódio (Merck S.A.) em 25 ml de água bidestilada.

Paraformaldeído a 1%: Foram misturados 3,75 ml de paraformaldeído a 4% e 11,25 ml de água destilada.

Paraformaldeído a 4%: Foi misturado 1 ml de paraformaldeído a 16% (Electron Microcopy Science) a 3 ml de água destilada.

Resorcina-Fucsina básica férrica (Weigert): Foram misturados 1 g de fucsina básica, 2 g de resorcina, 100 ml de água destilada, 12,5 ml de cloreto férrico em solução aquosa 29%, 100 ml de álcool 95% e 2 ml de ácido clorídrico.

Solução A – Azul de toluidina: Foram misturados 1 g de azul de toluidina O (Merck S.A.), 1 g de tetraborato de sódio (Merck S.A.) a 100 ml de água destilada. A solução foi estocada em frasco de vidro vedado por 6 meses à temperatura ambiente.

Solução B – Fucsina básica: Foram misturados 1 g de fucsina básica ((Merck S.A.) a 100 ml de álcool 50%. A solução foi estocada em frasco de vidro vedado por 6 meses à temperatura ambiente. A solução de trabalho foi preparada adicionando 60 ml de água destilada.

Solução de Scott (coloração resorcina-fucsina): Foi misturado 1 g de sulfato de magnésio a 100 ml de água destilada.

Solução I eosina-floxina: Foram misturados 0,57 ml de ácido acético glacial a 100 ml de água destilada.

Solução II eosina-floxina: Foram misturados 0,82 g de acetato de sódio a 100 ml de água destilada.

Solução de uso eosina-floxina: Foram misturados 295 ml de solução I, 705 ml de solução II, 5 g de eosina Y, 0,5 g de floxina e 2 cristais de timol (para evitar fungos).

Solução infiltradora: Foram misturados 100 ml de Historesin (Leica Instruments GmbH, Heidelberg, Alemanha) e 1 g de Hardner I (Leica Instruments GmbH).

Solução para inclusão: Foram misturados 15 ml de solução infiltradora e 1 ml de HARDNER II (Leica Instruments GmbH).

Solução pré-infiltradora: Foram misturados partes iguais de solução pré-infiltradora e álcool 100%.

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.

Tampão cacodilato de sódio 0,1 M: 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 1 N.

Tampão cacodilato de sódio 0,15 M: Foram dissolvidos 32,10 g de cacodilato de sódio (Electron Microcopy Science) em 1000ml de água destilada. O pH foi ajustado para 7,3 – 7,4 com HCl 1N.

Tampão cacodilato de sódio 0,2 M: 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 1 N.

Tetróxido de ósmio 1%: Foram misturadas partes iguais de tetróxido de ósmio a 2% (Polysciences Inc.) e tampão cacodilato de sódio 0,2 M.