FELIPE TRAJANO DE FREITAS BARÃO

**Estudo das propriedades biomecânicas e histológicas
da aorta abdominal de ratos diabéticos e expostos à
fumaça de cigarro**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Erasmo Simão da Silva

**São Paulo
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Barão, Felipe Trajano de Freitas
Estudo das propriedades biomecânicas e
histológicas da aorta abdominal de ratos diabéticos
e expostos à fumaça de cigarro / Felipe Trajano de
Freitas Barão. -- São Paulo, 2018.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Clínica Cirúrgica.
Orientador: Erasmo Simão da Silva.

Descritores: 1.Fenômenos biomecânicos 2.Histologia
3.Metaloproteinase 2 de matriz 4.Aorta abdominal
5.Tabagismo 6.Diabetes mellitus

USP/FM/DBD-178/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

“Procure ser um homem de valor em vez de ser um homem de sucesso.”

Albert Einstein

A meus pais, **Sérgio e Maria Inês**,
pela dedicação à educação dos seus
filhos. Faço deles esta conquista.

A minha esposa, **Vivian Helena**, pelo
amor, compreensão e apoio aos meus
objetivos.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pelos profissionais que me apresentaram, pelas condições que me proporcionaram e por sempre ter-me aberto suas portas.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo por toda a base sólida que me preparou para os desafios seguintes.

Ao **Prof. Dr. Erasmo Simão da Silva**, professor livre-docente da Disciplina de Cirurgia Vascular e Endovascular da FMUSP, agradeço pela orientação recebida.

Ao **Prof. Dr. Nelson De Luccia**, professor titular da Disciplina de Cirurgia Vascular e Endovascular da FMUSP.

Ao **Prof. Dr. Pedro Puech-Leão**, professor titular da Disciplina de Cirurgia Vascular e Endovascular da FMUSP.

À **Profa. Dra. Silvia Lacchini**, professora doutora do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas de USP, colaboradora do trabalho aqui apresentado.

Ao **Prof. Madhavan L. Raghavan**, engenheiro da Universidade de Iowa e colaborador do Laboratório de Biomecânica Vascular da FMUSP.

Aos cirurgiões do Serviço de Cirurgia Vascular e Endovascular do Hospital das Clínicas da FMUSP: **Dr. André Echaime Vallentsits Estenssoro, Dr. Antônio Francisco Marques, Prof. Dr. Antônio Eduardo Zerati, Dr. Calógero Presti, Dr. Celso Ricardo Bregalda Neves, Dr. Cid José Sitrângulo Junior, Dr. Julio César Saucedo Mariño, Dr. Ivan Benaduce Casella, Prof. Dr. Nelson Wolosker, Prof. Dr. Ricardo Aun, Dra. Rina Maria Pereira Porta, Dr. Walter Campos Júnior e, em especial, ao Dr. José Augusto Tavares Monteiro.**

Aos colegas cirurgiões vasculares do pronto-socorro de Cirurgia Vascular e Endovascular do Hospital das Clínicas da FMUSP: **Dr. Alexandre Petnys, Dra. Aline de Paula da Cruz, Dr. Boulanger Mito Netto, Dr. Carlos Alberto Sian de Oliveira, Dr. Fernando Saliture, Dra. Flávia Paiva, Dra. Grace Carvajal Mulatti Dela Veja, Dra. Harue Santiago Kumakura, Dr. Henry Melo, Dra. Inez Ohashi Torres, Dra. Nicole Inforsato, Dr. Simon Benabou e Dr. Zally Siqueira Reges.**

Aos médicos-residentes do Serviço de Cirurgia Vascular e Endovascular do Hospital das Clínicas da FMUSP.

Aos biólogos **Alexandre Queiroz Silva e Gina Camillo Rocha Silvestre** e à técnica de laboratório **Michele Alberto Marques**, colaboradores do LIM 02 da FMUSP.

À **Sra. Eliane F. Monica Gazetto**, secretária da Pós-graduação da Clínica Cirúrgica da FMUSP.

A meus queridos irmãos, **Gustavo, Juliana e Ana Cláudia**, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de gráficos

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS.....	14
3	MÉTODOS	16
3.1	Animais	17
3.2	Indução e Caracterização do Diabetes	19
3.3	Exposição à Fumaça de Cigarro	20
3.4	Coleta do Tecido.....	23
3.5	Teste Biomecânico.....	23
3.6	Estudo Histológico	31
3.6.1	Medida da razão adventícia/média.....	32
3.6.2	Avaliação das lâminas elásticas na túnica média.....	33
3.6.3	Avaliação qualitativa da túnica média.....	34
3.7	Zimografia - Atividade da Metaloproteinase 2	35
3.8	Cálculo da Amostra.....	36
3.9	Análise Estatística.....	37
4	RESULTADOS	38
4.1	Análise Descritiva da Amostra.....	39
4.2	Análise das Propriedades Biomecânicas.....	41
4.3	Análise das Propriedades Histológicas	45
4.4	Análise da atividade da metaloproteinase 2	51
5	DISCUSSÃO	53
5.1	Considerações Gerais.....	54
5.1.1	Modelo de indução do diabetes.....	56
5.1.2	Modelo de exposição à fumaça de cigarro	57
5.2	Ratos Diabéticos	59
5.3	Ratos Expostos à Fumaça de Cigarro	63
5.4	Ratos Diabéticos Expostos à Fumaça de Cigarro.....	66
5.5	Críticas ao Estudo e Perspectivas Futuras.....	69
6	CONCLUSÕES	73
7	ANEXOS.....	75
8	REFERÊNCIAS	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAA	- Aneurisma(s) da aorta abdominal
AGEs	- Produtos finais da glicação avançada
CO	- Monóxido de carbono
DPOC	- Doença pulmonar obstrutiva crônica
EUA	- Estados Unidos da América
FAPESP	- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
GC	- Grupo controle
GD	- Grupo diabético
GDT	- Grupo diabético e tabagista
GT	- Grupo tabagista
IC	- Intervalo de confiança
M	- Concentração molar
MEC	- Matriz extracelular
MMP	- Metaloproteinase(s) da matriz
MT-MMP	- Metaloproteinase(s) da matriz tipo membrana
n	- Tamanho amostral
OR	- <i>Odds ratio</i>
p	- Nível descritivo de probabilidade
PAGE	- Eletroforese em gel de poliacrilamida
PC	- <i>Personal computer</i>
pH	- Potencial hidrogeniônico
ppm	- Partícula(s) por milhão
RIPA	- Radioimunoprecipitação
rpm	- Rotações por minuto
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
STZ	- Streptozotocina
USP	- Universidade de São Paulo
vs	- <i>Versus</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração esquemática do complexo de elastina e colágeno em um vaso sanguíneo não esticado.....	6
Figura 2 - Gráfico do estresse <i>versus</i> deformação de um fragmento de parede arterial (diagrama elástico).....	10
Figura 3 - Ilustração da relação das fases do diagrama elástico com a extensão (recrutamento) das fibras elásticas, em azul, e colágenas, em vermelho, durante o teste biomecânico.....	12
Figura 4 - Caixa plástica com os ratos para exposição à fumaça de cigarro.....	21
Figura 5 - Ratos sendo expostos à fumaça de cigarro.....	22
Figura 6 - Amostra da aorta abdominal	23
Figura 7 - Sistema de apreensão do espécime a ser submetido ao teste biomecânico.....	24
Figura 8 - Aparelho para o teste biomecânico. À esquerda, a máquina de ensaios universal com o computador de bolso acoplado; e, à direita, o computador com o programa Series IX.....	25
Figura 9 - Medida do espécime com paquímetro digital	26
Figura 10 - Imersão do espécime em solução fisiológica	26
Figura 11 - Ilustração mostrando a sequência do teste de distensão uniaxial com a correspondente curva elástica	28
Figura 12 - Final do teste biomecânico com a ruptura do espécime	28
Figura 13 - Exemplo de curva elástica ao final do teste biomecânico.....	30
Figura 14 - Fotografia do material corado pela coloração de Picrossirius.....	32
Figura 15 - Fotografia do material corado pela coloração de Verhoeff-Van Gieson	33
Figura 16 - Fotografia do material corado pela coloração de tricrômico de Masson	34
Figura 17 - Diferença da quantidade de gordura visceral do rato não diabético (esquerda) e diabético (direita).....	40

Figura 18 - Fotomicrografias representativas de aortas de ratos na coloração de Picrossirius.....	46
Figura 19 - Fotomicrografias representativas de aortas de ratos mostrando fibras elásticas na coloração de Verhoeff	47
Figura 20 - Fotomicrografias representativas de aortas de ratos na coloração de tricrômico de Masson	49
Figura 21 - Zimografia representativa da pró-MMP-2 (72kDa) e MMP-2 (64kDa)	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média e desvio padrão da glicemia (mg/dL) dos ratos imediatamente antes e sete dias após a indução do diabetes.....	19
Tabela 2 - Média e desvio padrão da glicemia (mg/dL) dos ratos diabéticos no seguimento e no dia do sacrifício	20
Tabela 3 - Média e desvio padrão do peso (g) dos ratos no início e no dia do sacrifício	39
Tabela 4 - Números de ratos no início e no dia do sacrifício e o número de testes biomecânicos válidos ao fim do experimento	41
Tabela 5 - Comparação dos parâmetros biomecânicos de falência da aorta dos diferentes grupos	45

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Comparações da força máxima suportada pelos espécimes	42
Gráfico 2 -	Comparações do estresse máximo suportado pelos espécimes.....	42
Gráfico 3 -	Comparações da tensão máxima suportada pelos espécimes	43
Gráfico 4 -	Comparações da energia de deformação dos espécimes	43
Gráfico 5 -	Comparações da deformação máxima dos espécimes até a ruptura.....	44
Gráfico 6 -	Comparações da razão adventícia/média.....	46
Gráfico 7 -	Comparações da contagem total de lâminas elásticas	48
Gráfico 8 -	Comparações da fragmentação das lâminas elásticas	48
Gráfico 9 -	Comparações da matriz pericelular na túnica média.....	50
Gráfico 10 -	Comparações da perda/substituição celular na túnica média)	50
Gráfico 11 -	Comparações da atividade da MMP-2 (72 kDa).....	52
Gráfico 12 -	Comparações da atividade da MMP-2 (64 kDa).....	52

RESUMO

Barão FTF. *Estudo das propriedades biomecânicas e histológicas da aorta abdominal de ratos diabéticos e expostos à fumaça de cigarro* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

INTRODUÇÃO: O aneurisma da aorta abdominal (AAA) tem grande importância clínica em função de sua incidência e das complicações que pode acarretar, entretanto sua etiopatogenia não está completamente esclarecida. A associação entre tabagismo e desenvolvimento de AAA tem sido repetidamente confirmada. Apesar de o AAA ter sido inicialmente atribuído à aterosclerose, observou-se associação negativa entre diabetes (um dos principais fatores de risco para aterosclerose) e doença vascular aneurismática. O estudo biomecânico e histológico da parede aórtica pode contribuir para a elucidação da etiopatogenia dos aneurismas. **OBJETIVOS:** Avaliar as propriedades biomecânicas e histológicas da aorta abdominal de ratos em três situações: exposição à fumaça do cigarro, induzidos ao desenvolvimento do diabetes mellitus e com a associação desses dois fatores. **MÉTODOS:** Setenta e cinco ratos *Wistar* foram distribuídos em quatro grupos: controle (GC), tabagista (GT), diabético (GD), diabético e tabagista (GDT). Os ratos dos GT e GDT foram expostos à fumaça de cigarro por 30 minutos ao dia, 5 dias por semana. O diabetes foi induzido por injeção endovenosa de estreptozotocina. Após 16 semanas, os animais foram sacrificados para a coleta da aorta abdominal. Testes de tração uniaxiais destrutivos foram realizados para a obtenção das seguintes propriedades biomecânicas: força, tensão, estresse, deformação e energia de deformação. A análise histológica desses fragmentos consistiu na avaliação das fibras colágenas e elásticas e verificação da deposição de elementos da matriz extracelular na túnica média e avaliação da sua composição. Através da zimografia foi quantificada a atividade da metaloproteinase-2 nos espécimes aórticos obtidos. **RESULTADOS:** Foram analisados os testes biomecânicos válidos de 52 espécimes, sendo que 11 pertenciam ao GC, 10 ao GD, 16 ao GT e 15 ao GDT. A análise biomecânica dos fragmentos não revelou diferença entre os grupos controle, GD, GT e GDT. A deposição de colágeno também não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos estudados. A contagem total de lâminas elásticas foi maior nos ratos diabéticos (GD e GDT) quando comparados aos do GT. Foi observada resposta inflamatória mais intensa, com significância estatística, em todos os grupos estudados quando comparados ao GC. A atividade da MMP-2 apresentou diminuição no GD em relação ao GDT, com significância estatística. **CONCLUSÕES:** As propriedades biomecânicas da parede da aorta de ratos relacionadas à resistência e elasticidade não apresenta diferença entre o GC e os GD, GT e GDT. As alterações histológicas relacionadas à contagem total e fragmentação das lâminas elásticas, deposição de matriz pericelular e perda/substituição celular na túnica média são significativas na parede da aorta do GD, GT e GDT em relação ao GC. A atividade da MMP-2 na aorta do GD é menor que na aorta do GDT.

Descritores: fenômenos biomecânicos; histologia; metaloproteinase 2 de matriz; aorta abdominal; tabagismo; diabetes mellitus.

ABSTRACT

Barão FTF. *Study of the biomechanical and histological properties of the abdominal aorta of diabetic rats and exposed to cigarette smoke* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

INTRODUCTION: Abdominal aortic aneurysm (AAA) is of great clinical importance due to its incidence and complications, but its etiopathogenesis is not fully understood. The association between smoking and AAA development has been repeatedly confirmed. Although AAA was initially attributed to atherosclerosis, there was a negative association between diabetes (a major risk factor for atherosclerosis) and aneurysmal vascular disease. The biomechanical and histological study of the aortic wall may contribute to the elucidation of the etiopathogeny of the aneurysms. **OBJECTIVES:** To evaluate the biomechanical and histological properties of the abdominal aorta of rats in three situations: exposed to cigarette smoke, induced to the development of diabetes mellitus, and the association of these two factors. **METHODS:** Seventy-Five Wistar rats were divided into four groups: control (CG), smoker (GT), diabetic (GD), diabetic and smoker (GDT). The GT and GDT rats were exposed to cigarette smoke for 30 minutes a day, 5 days a week. Diabetes was induced by intravenous injection of streptozotocin. After sixteen weeks, the animals were sacrificed for collection of the abdominal aorta. Uniaxial destructive tensile tests were performed to obtain the following biomechanical properties: maximal force, failure stress, failure tension, failure strain and failure strain energy. The histological analysis of these fragments consisted in the evaluation of the collagen and elastin and verification of the deposition of elements of the extracellular matrix in the tunica media and evaluation of its composition. The activity of metalloproteinase-2 in the aortic specimens obtained was quantified by zymography. **RESULTS:** A total of 52 strips were studied (11 from GC, 10 from GD, 16 from GT and 15 from GDT). The biomechanical analysis of the fragments was not different between the control group and the GD, GT and GDT groups. Collagen deposition also did not present a statistically significant difference between the studied groups. The total of elastic fibers was higher in diabetic rats (GD and GDT) when compared to GT. A higher inflammatory response was observed, with statistical significance, in all groups studied when compared to CG. The activity of MMP-2 showed a decrease in GD in relation to GDT, with statistical significance. **CONCLUSIONS:** The biomechanical properties of the aortic wall of rats related to resistance and elasticity do not present a difference between GC and GD, GT and GDT. Histological changes related to total count and fragmentation of the elastic lamina, pericellular matrix deposition, and cell loss / substitution in the tunica media are significant in the aorta wall of GD, GT and GDT in relation to GC. The activity of MMP-2 in the GD aorta is smaller than in the GDT aorta.

Descriptors: biomechanical phenomena; histology; matrix metalloproteinase 2; aorta, abdominal; tobacco use disorder; diabetes mellitus.

1 INTRODUÇÃO

Aneurisma é definido como uma dilatação localizada e permanente de uma artéria superior a 50% do seu diâmetro normal ou do diâmetro do segmento proximal à dilatação¹. Qualquer artéria pode tornar-se aneurismática, porém o segmento infrarrenal da aorta abdominal é o local mais comum para o seu desenvolvimento².

Considerada uma doença relacionada ao envelhecimento, o aneurisma da aorta abdominal (AAA) inespecífico (antigamente denominado aterosclerótico) ocorre em 3% da população acima dos 50 anos³ e em 2% a 8,8% da população acima dos 60 anos, com prevalência nos homens dessa faixa etária de 4,1% a 14,2%⁴⁻⁷, e de 1% nas mulheres^{7,8}. A ruptura é a sua principal complicação e a 13ª causa de óbito nos Estados Unidos da América (EUA)⁹.

Por tratar-se de uma doença de grande relevância, dada a prevalência e mortalidade associada, há grande interesse em determinar quais os fatores que, atuando na aorta normal, podem desencadear, agravar ou proteger este território arterial de uma futura dilatação. Apesar de muitas pesquisas relacionadas aos aneurismas e à importância clínica, sua etiopatogenia não está completamente esclarecida.

O AAA inespecífico está associado a fatores como idade avançada, sexo masculino, história familiar e hipertensão arterial sistêmica¹⁰⁻¹².

Associação entre tabagismo e desenvolvimento de aneurisma, também, tem sido repetidamente confirmada¹³⁻¹⁸. Em um importante estudo epidemiológico, o histórico de tabagismo foi o fator mais forte associado à progressão do AAA (*odds*

ratio (OR) de 5,57, em comparação com 2,68 para o sexo masculino, 1,94 para uma história familiar de AAA, 1,71 para a idade acima de 65 anos, e 1,15 para hipertensão), assim como risco elevado de AAA relacionado à carga tabágica (OR de 2,75 para menos de 20 maços/ano em comparação com 9,55 para os pacientes que fumam mais do que 50 maços/ano)¹⁹. Com base nessas observações clínicas e em outros estudos, considera-se que o tabagismo crônico é provavelmente o fator de risco ambiental mais importante para o desenvolvimento e a progressão dos aneurismas da aorta classificados como inespecíficos.

Embora os AAA tenham sido tradicionalmente atribuídos à aterosclerose, existe evidência de que a relação é de associação em vez de causalidade^{19,20}. Os pacientes com essas duas doenças compartilham muitos fatores de risco, mas parece improvável que a exposição a esses fatores por si só determine o padrão da doença arterial. O papel dos fatores genéticos como causa dos AAA tem atraído interesse considerável, mas, como acontece com muitas doenças complexas, não há ainda respostas definitivas^{21,22}.

Um fator de risco para a aterosclerose que não é habitual no paciente com AAA é o diabetes mellitus. A primeira observação convincente de que há uma associação negativa (OR 0,78, 95% IC 0,62, 0,98) entre diabetes e AAA foi de LaMorte *et al.*²³, em 1995. Uma associação negativa "inesperada" entre diabetes e AAA (OR 0,68 IC 95 % 0,60, 0,77) foi também observada por Lederle *et al.*²⁴, em um grande estudo de triagem (n = 73.451). Em um rastreamento baseado na comunidade de homens diabéticos idosos, a prevalência de AAA foi de apenas 2,3%, em comparação a de 7% considerando todos os homens com mais de 65 anos de idade^{25,26}. A causa da associação negativa entre diabetes e AAA é desconhecida e tem sido pouco estudada^{27,28}.

O aneurisma da aorta, geralmente, resulta de uma degeneração da túnica média arterial, que conseqüentemente acarreta mudanças nas suas características mecânicas. É uma degeneração que envolve a matriz extracelular (MEC), definida como a reunião de grandes moléculas de diferentes naturezas dos elementos conjuntivos, compreendendo colágeno, elastina, glicoproteína e proteoglicano²⁹. Portanto, conhecer as características da parede arterial normal e sua biomecânica fisiológica tem relevante interesse científico.

A parede da aorta é formada por três túnicas dispostas em camadas concêntricas³⁰; a túnica íntima, formada pelo revestimento endotelial e por uma faixa subendotelial com algumas células musculares lisas e abundante MEC³¹; a túnica média, principal responsável pelas propriedades mecânicas das artérias, formada por lamelas paralelas de lâminas elásticas em meio às quais situam-se células musculares lisas, colágeno, proteoglicanos e glicosaminoglicanos³¹; e a túnica adventícia, composta por colágeno, fibroblastos e tecido adiposo, além de pequenos vasos (*vasa vasorum*) e nervos³¹.

As células musculares lisas são tipicamente fusiformes. A única capacidade funcional atribuída à célula muscular lisa, durante muito tempo, foi sua habilidade de se contrair, com isso, regulando a resistência periférica vascular e, portanto, a pressão sanguínea. No final da década de 1960, começou-se a responsabilizar esse tipo de célula, também, pela síntese de compostos extracelulares³². Estudos da parede de vasos ateroscleróticos têm demonstrado a existência de dois tipos de padrões fenotípicos de células musculares lisas. Um deles é o tipo contrátil, que é a célula muscular lisa típica presente em vasos normais. A outra população tem fenótipo secretor, com retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi bem

desenvolvidos; aparecem em vasos humanos com aterosclerose e, em vasos animais, em modelos experimentais de indução. Estas células são hiper-responsivas para fatores de crescimento e de produção de MEC, enquanto que as células de fenótipo contrátil são hipo-responsivas a esses fatores e apresentam baixa capacidade de síntese de macromoléculas da matriz³³. Além disso, as células com fenótipo sintético são capazes de produzir, elas mesmas, alguns fatores como o fator de crescimento derivado de plaquetas, de modo a estabelecer um círculo vicioso para a progressão da lesão^{34,35}.

Colágenos e elastina são os principais constituintes estruturais da parede dos vasos sanguíneos e são sintetizados pelas células musculares lisas³⁶ e, principalmente, pelos fibroblastos³⁷. As propriedades biomecânicas dos vasos, particularmente das grandes artérias e veias, são largamente dependentes da quantidade desses dois constituintes principais da MEC³⁸.

O colágeno é pouco distensível, mas com grande resistência quando submetido à tensão. A distribuição na forma de lamelas com ondulação de feixes de colágeno em graus variáveis permite que, sob tensão crescente, diferentes fibras com ondulações diversas sejam mobilizadas à medida que o diâmetro arterial aumenta³⁹ (Figura 1).

A elastina é caracterizada pela sua elasticidade, chegando a dobrar a sua dimensão e retornando ao seu tamanho original. Esta propriedade mecânica da elastina confere às artérias elásticas, como a aorta, grande variação do diâmetro arterial durante os ciclos cardíacos³¹.

Figura 1 - Ilustração esquemática do complexo de elastina e colágeno em um vaso sanguíneo não esticado

Numerosos estudos realizados no decorrer da última década têm relatado que a degradação da MEC é a responsável pelo início e expansão dos aneurismas⁴⁰. Em diversos trabalhos sobre AAA foi observado que o aumento da atividade elastolítica na parede aórtica pode ser o principal evento na alteração das propriedades mecânicas desse vaso, como a degradação de elastina e colágeno^{41,42}.

A importância da elastina na manutenção da estrutura da parede da aorta é demonstrada pela alta frequência de aneurismas em pacientes com Síndrome de Marfan, doença genética causada por mutações do gene da fibrilina-1, glicoproteína essencial para a organização da elastina amorfa. A síntese de uma fibrilina defeituosa compromete a formação das fibras elásticas do vaso. Modelos experimentais obtidos por perfusão de elastase em artérias normais demonstraram que a degradação da elastina provoca o desenvolvimento de dilatação e tortuosidade desta artéria, enquanto que a degradação do colágeno resulta em ruptura não precedida por dilatação^{43,44}.

Essa degradação é causada pelas metaloproteinases da matriz (MMP), que são endopeptidases cálcio-dependente contendo zinco, expressas em várias células e tecidos, incluindo células musculares lisas, endotélio, fibroblastos e células inflamatórias⁴⁵. A família das MMP apresenta mais de 23 enzimas que são responsáveis pela degradação de vários componentes da MEC, incluindo o colágeno

e a fibra elástica⁴⁵. Diferentes MMP são produzidas por diferentes tipos celulares⁴⁶ e diferem entre si em relação à especificidade de substratos. São classificadas em: (1) Colagenases intersticiais, (2) Gelatinases, (3) Estromelisinases, (4) Matrilisinases, (5) Metaloproteinases da matriz tipo membrana (MT-MMP) e (6) outras MMP que não se enquadram nesses grupos principais^{47,48}.

Uma vez em sua forma ativa, as MMP participam do processo fisiológico de remodelamento da MEC mediante a degradação de proteínas agindo em suas ligações peptídicas específicas, sendo este um de seus principais efeitos⁴⁸.

Estudos têm relatado que atividade excessiva ou desequilibrada de MMP está associada à patogênese de várias doenças como neoplasias⁴⁹, doenças inflamatórias crônicas⁵⁰ e doenças cardiovasculares, como os aneurismas^{51,52}.

A MMP-2 (gelatinase A) possui domínios “*fibronectin-like*” que são responsáveis por clivarem colágenos tipo I, IV, V, VII, e X, gelatina (colágeno desnaturado) e elastina^{53,54}. Alterações na regulação da expressão e atividade desta MMP podem estar envolvidas no processo de remodelamento vascular que acontece na fisiopatologia do aneurisma⁵⁵.

A MMP-2 caracteriza-se, em sua forma latente, por uma massa molecular de 72 kDa e, em sua forma ativa, por uma massa de 64 kDa, sendo encontrada nas células musculares lisas, nos fibroblastos e no endotélio⁵⁶. Alguns estudos apontam que a MMP-2 é expressa tanto em aorta normal como em tecido aneurismático, ou seja, é uma proteinase constitutiva⁵⁷. Está envolvida no remodelamento vascular uma vez que promove tanto a degradação de proteínas da MEC quanto acentua a migração de células musculares lisas⁵⁸⁻⁶⁰. Essas células musculares lisas desempenham um papel fundamental na MEC, pois sintetizam proteínas como colágeno e limitam a proteólise durante a inflamação⁶¹.

Como comentado anteriormente, o tabagismo é o fator de risco ambiental mais importante na gênese e evolução dos aneurismas. Os fumantes têm elevada atividade enzimática na parede da aorta^{62,63}, que pode ser a causa de degradação acentuada das fibras elásticas e da consequente perda da elasticidade e enfraquecimento da parede arterial. Recentemente foi sugerido que esta proteólise pode ser o resultado de uma infiltração de células mononucleares e de um aumento na produção local de MMP⁶⁴. As MMP que estão elevadas em aneurismas são as elastases de MMP-2, MMP-9, e MMP-12, juntamente com as collagenases MMP-1 e MMP-13^{65,66}. Takagi e Umemoto^{62,63} verificaram que o fumo de tabaco leva a um aumento da expressão gênica de 5-lipoxigenase no tecido aórtico, e que esta desempenha um importante papel na ativação de MMP-2, com consequente formação de aneurismas. Hiperatividade localizada da MMP poderia levar ao enfraquecimento focal de parede do aneurisma e ruptura em níveis relativamente baixos de pressão intraluminal^{67,68}.

Portanto, fumar está associado a alterações na composição estrutural da matriz proteica da parede arterial que leva a alterações das propriedades mecânicas da aorta⁶⁹. Como a elastina, o colágeno e a ação reparadora e secretora das células musculares lisas são as maiores responsáveis pelas propriedades biomecânicas da parede arterial, seria importante determinar se existe efeito dos componentes da fumaça do tabaco sobre esses elementos da parede arterial.

Diversos estudos também vêm comprovando outras alterações causadas pelo tabaco na parede da aorta, seja por alterações na síntese de vasoconstritores e vasodilatadores⁷⁰, seja por alterações no próprio DNA celular⁷¹, porém o efeito biomecânico dessas alterações é pouco estudado.

Em contraste com a proteólise e matriz destruída observada no tabagismo, o diabetes é caracterizado pelo acúmulo de colágeno com consequente aumento do volume da matriz⁷², resultando em alterações como espessamento da membrana basal e expansão mesangial⁷³. Isso parece ser devido a uma combinação de aumento da síntese e degradação reduzida da matriz associada à glicosilação não enzimática causada pelo estado hiperglicêmico⁷⁴. Estas alterações são responsáveis por muitas das complicações do diabetes, mas podem aumentar a rigidez do vaso⁷⁴, reduzindo o risco de AAA.

As consequências anatômicas e fisiológicas do aumento de tecido conjuntivo visto no diabetes têm sido documentadas na aorta abdominal. Em um estudo recente com ultrassom, o diabetes foi associado a um aumento de 22% na espessura da íntima-média da aorta e uma redução de 20% na tensão da sua parede⁷⁵. Em contraste, a formação de AAA está associada com o aumento do estresse da parede aórtica⁷⁶; isto é consistente com a associação negativa entre o diabetes e AAA ser devido a diferenças na matriz vascular.

Conquanto vários estudos tenham descrito os efeitos do diabetes nos vasos sanguíneos e em outros tecidos^{77,78}, as alterações biomecânicas da aorta no diabetes são malcompreendidas.

A biomecânica é o estudo da mecânica dos organismos vivos; e, nesse sentido, o sistema cardiovascular humano pode ser estudado sob duas perspectivas: biomecânica dos sólidos e dos fluidos. A primeira envolve o comportamento dos vasos sanguíneos, mais especificamente das suas paredes, enquanto que a última estuda o fluxo de sangue no interior desses vasos⁷⁹. As propriedades biomecânicas da parede aórtica estão intimamente relacionadas à sua composição estrutural e alterações nessa composição que, como as ocasionadas pelo tabagismo e diabetes, podem provocar importantes modificações na sua biomecânica.

Devido à sua fácil interpretação matemática e por já terem sido extensamente utilizados no campo da engenharia dos materiais, os testes biomecânicos de tração uniaxial destrutivos estão entre os métodos mais difundidos para a análise biomecânica.

Os parâmetros mais comumente estudados são:

- Estresse: é a força gerada no corpo em reação à força que atua sobre ele, normalizada pela área de secção transversa do espécime.
- Tensão: é a força gerada no corpo em reação à força que atua sobre ele, normalizada pela largura do espécime.
- Deformação: é uma medida de variação de comprimento de um corpo que é sujeito à ação de uma força externa; trata-se da razão entre a mudança de comprimento e o comprimento inicial do corpo⁷⁹.

A análise matemática das propriedades biomecânicas é baseada num gráfico conhecido por diagrama elástico, que relaciona o estresse gerado com a deformação sofrida pelo corpo de prova (Figura 2). O ápice da curva neste diagrama determina o limite de falência, que representa os limites máximos dos parâmetros biomecânicos: força máxima aplicada até a ruptura do espécime, estresse de falência, tensão de falência e deformação de falência.

Figura 2 - Gráfico do estresse *versus* deformação de um fragmento de parede arterial (diagrama elástico)

Um parâmetro mais moderno de análise e que tenta determinar a energia despendida até o momento da falência do fragmento é a energia de deformação. Esse parâmetro é definido pelo cálculo da área sob a curva do diagrama elástico até o limite de falência.

Uma das possíveis abordagens para a compreensão do comportamento biomecânico da parede da aorta é mediante os testes de distensão uniaxial, pelos quais, a partir de método padronizado, fragmentos provenientes da aorta são submetidos à distensão em uma direção, gerando um conjunto de pontos em um gráfico que correlaciona a força aplicada ao fragmento à deformação apresentada por este, sendo essa força normalizada subsequentemente pela área de secção transversa ou largura do espécime.

Os dois principais elementos constitutivos que contribuem para as características desse gráfico são as fibras colágenas e elásticas. Outros componentes, como o endotélio e as células musculares lisas, costumam ter participação menos relevante⁷⁹. No estado de relaxamento do tecido, as fibras elásticas encontram-se retesadas e as fibras colágenas tortuosas. Assim, com nenhuma ou pequena distensão do tecido, toda resistência é conferida pelas fibras elásticas. À medida que o tecido é esticado, aplicando-se um teste de distensão, por exemplo, as fibras colágenas vão sendo gradativamente mobilizadas, participando na resistência tecidual junto com as fibras elásticas, em um fenômeno denominado “recrutamento do colágeno”. Quanto mais fibras são recrutadas, maior a rigidez do tecido. Em proximidade da ruptura (isto é, falência do tecido), todas as fibras colágenas estão recrutadas para suportar a carga, e a rigidez tecidual atinge seu máximo. Em resumo, as fibras elásticas são recrutadas com deformações menores, sendo responsáveis pela resistência em

condições fisiológicas. Já as fibras colágenas, por sua vez, são recrutadas com deformações maiores, impondo limites à superdistensão da parede arterial e evitando sua ruptura. A curva elástica dos tecidos biológicos moles (exemplo, a artéria) é característica. Apresenta uma primeira fase representada por um traçado quase linear de baixa inclinação (refletindo a rigidez somente das fibras elásticas), seguindo-se de uma elevação gradual da inclinação (recrutamento do colágeno) até atingir a falência (máxima força suportada pela elastina e pelo colágeno) – com queda da inclinação final (Figura 3)^{39,80}.

Figura 3 - Ilustração da relação das fases do diagrama elástico com a extensão (recrutamento) das fibras elásticas, em azul, e colágenas, em vermelho, durante o teste biomecânico

Ao partir do princípio da existência de curvas características, infere-se que as propriedades biomecânicas podem espelhar o remodelamento inicial da parede da aorta na formação dos aneurismas: a predominância do colágeno, devido à degradação da elastina, é uma alteração estrutural típica dos aneurismas, tornando suas paredes mais rígidas, o que é refletido no diagrama elástico por uma curva de inclinação mais abrupta e precoce (desviada para esquerda).

Assim, mudanças na proporção e nas características das fibras de colágeno e elastina podem resultar em diferentes características do diagrama elástico. É possível, dessa forma, a partir da curva de estresse por deformação, especular (com dados numéricos e gráficos) qual seria a composição estrutural das paredes arteriais⁷⁹.

As propriedades biomecânicas dos vasos, principalmente das grandes artérias, são dependentes, portanto, da quantidade absoluta e relativa do colágeno e da elastina³⁸, sendo a razão entre esses dois elementos o principal determinante dessas propriedades na parede da aorta⁸¹. Mudanças no conteúdo e/ou na qualidade do colágeno e da elastina, como ocorrem no tabagismo e diabetes, desempenham, provavelmente, papel importante no desenvolvimento ou prevenção do AAA⁸². E, nesse contexto, este estudo foi desenvolvido, então, procurando aprofundar o conhecimento das propriedades biomecânicas e histológicas da aorta abdominal de ratos diabéticos e expostos à fumaça de cigarro com o intuito de contribuir para o conhecimento das alterações iniciais ocorridas nas aortas de fumantes e diabéticos.

2 OBJETIVOS

Analisar e comparar, em ratos controle e ratos expostos à fumaça de cigarro, induzidos ao desenvolvimento do diabetes mellitus, com estes dois fatores associados:

- a) As propriedades biomecânicas da aorta abdominal.
- b) As características histológicas da aorta abdominal.
- c) A atividade enzimática na aorta abdominal.

3 MÉTODOS

O método utilizado neste estudo foi desenvolvido e validado pelo Laboratório de Biomecânica Vascular do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), em parceria com o Departamento de Bioengenharia da Universidade de Iowa, por meio de um projeto conjunto que teve início em 2001 e vem expandindo-se⁸³⁻⁸⁸.

O protocolo de estudo desenvolvido nesta tese foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da USP com o número 071/14, em 26/06/2016. Todos os preceitos éticos foram seguidos rigorosamente.

Este trabalho recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Auxílio à Pesquisa - Regular, número do Processo 2014/16725-7).

3.1 Animais

Foram fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP 75 ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus albinus*), machos, com 12 semanas de vida, de peso corporal variando entre 300 g e 450 g. Os animais ficaram em gaiolas Growing 414x344x168 mm (três por gaiola) em condições controladas de temperatura (22-25°C), luminosidade (ciclo 12 h claro/12 h escuro) e umidade relativa de 70%. A alimentação foi de ração (Nuvilab CR1[®], São Paulo, Brasil) e água *ad libitum*.

Os animais foram divididos em quatro grupos mediante sorteio, conforme organograma a seguir discriminado:

- Grupo Controle (GC) - Animais não diabéticos e não expostos à fumaça de cigarro.
- Grupo Diabético (GD) - Animais diabéticos não expostos à fumaça de cigarro.
- Grupo Tabagista (GT) - Animais expostos à fumaça de cigarro, cinco vezes por semana durante 30 minutos.
- Grupo Diabético e Tabagista (GDT) - Animais diabéticos e expostos à fumaça de cigarro (cinco vezes por semana durante 30 minutos).

Os animais foram acompanhados por 16 semanas, quando ocorreu o sacrifício para a coleta do material.

Para facilitar o manuseio dos animais, optou-se por dividir os 75 animais em três grupos de igual número com datas de início diferentes. Portanto, essa divisão em três grupos foi apenas temporal para organizar o sacrifício, a coleta do material e os testes biomecânicos. A divisão em grupos, foco do estudo, permaneceu em quatro grupos como supradelineado.

O sacrifício dos animais deu-se de segunda a sexta-feira, cinco animais por dia, totalizando os 25 animais de cada grupo por semana.

- 1º Grupo - 25 animais: (GC - seis animais, GD - três animais, GT - quatro animais, GDT - 12 animais)
- 2º Grupo - 25 animais: (GC - seis animais, GD - 11 animais GT - oito animais, GDT - zero animais)
- 3º Grupo - 25 animais: (GC - cinco animais, GD - quatro animais, GT - oito animais, GDT - oito animais)

3.2 Indução e Caracterização do Diabetes

O diabetes foi induzido por injeção endovenosa de estreptozotocina (STZ) na veia peniana, sob anestesia inalatória com isoflurano 20% (1,5 mL/min - 2 mL/min)⁸⁹. A STZ foi dissolvida em tampão citrato (0,1 M, pH 6,5) e administrada na dose de 55 mg/kg de peso corporal⁹⁰.

Foi utilizado OneTouch – sistema de medição de glicose no sangue (Life Scan Johnson e Johnson Company) –, assim, os níveis de glicose no sangue foram monitorados uma semana após a injeção de STZ para confirmação do estado hiperglicêmico dos animais (Tabela 1). Todos os animais tiveram uma concentração de glicose no plasma superior a 270 mg/dL e foram incluídos no estudo como diabéticos⁹¹⁻⁹⁴.

Tabela 1 - Média e desvio padrão da glicemia (mg/dL) dos ratos imediatamente antes e sete dias após a indução do diabetes

Glicemia antes da indução	112,3 ± 15,78
Glicemia sete dias após a indução	435,7 ± 56,16

Para monitorizar o estado hiperglicêmico dos animais, a glicemia foi medida a cada 30 dias, após a indução do diabetes e imediatamente antes do sacrifício (Tabela 2). Em todas as medidas, os ratos apresentaram uma concentração de glicose no plasma superior a 270 mg/dL, não sendo necessária a exclusão de nenhum animal. A glicemia dos ratos não diabéticos também foi medida nas mesmas ocasiões para confirmação do estado euglicêmico desses animais.

Tabela 2 - Média e desvio padrão da glicemia (mg/dL) dos ratos diabéticos no seguimento e no dia do sacrifício

Glicemia 30 dias após indução	459,1 ± 50,90
Glicemia 60 dias após indução	448,9 ± 54,19
Glicemia 90 dias após indução	466,5 ± 59,39
Glicemia antes do sacrifício	438,5 ± 47,16

Os ratos diabéticos receberam 2 UI de insulina ultralenta, 3 vezes por semana (segunda, quarta e sexta-feira), às 10 horas, para manter o peso corporal, prevenir a cetoacidose diabética e melhorar a sobrevivência durante 16 semanas do estudo⁹¹⁻⁹⁴.

3.3 Exposição à Fumaça de Cigarro

Os ratos foram expostos à fumaça de cigarro de acordo com o protocolo já descrito e utilizado para outros estudos⁹⁵⁻⁹⁷. Os animais expostos (grupos GT e GDT) foram mantidos em caixa de exposição cinco dias por semana, permanecendo por um período de 30 minutos por dia, durante 16 semanas. A exposição ocorreu sempre às 11 horas em todo o período do experimento.

A exposição foi realizada em uma caixa de plástico de 28 litros (aproximadamente 40 cm x 27 cm na base, com altura de 26 cm) no interior de uma capela de exaustão com o intuito de aspirar a fumaça do cigarro. O interior da caixa foi dividido em quatro partes por uma estrutura de acrílico para a manutenção de dois ratos por célula, totalizando oito animais expostos ao mesmo tempo (Figura 4). A cada dia de exposição, fez-se o rodízio dos animais entre as células da caixa, para que todos recebessem a mesma concentração de fumaça de cigarro ao longo de todo o experimento.

Figura 4 - Caixa plástica com os ratos para exposição à fumaça de cigarro

Na face lateral da caixa, foram confeccionados dois orifícios: um para entrada da mistura de fumaça do cigarro e ar sintético e outro para entrada de ar sintético. Na tampa da caixa foi confeccionado um orifício para a saída espontânea de ar. O fluxo na entrada de ar sintético foi controlado por um fluxômetro conectado a um torpedão de ar comprimido e foi mantido em 1,5-2 l/min. A segunda entrada da caixa recebia uma mistura de ar sintético e fumaça de cigarro, que foi aspirada por um sistema de Venturi conectado a um cigarro aceso. O fluxo laminar de ar sintético passando por uma região de menor diâmetro foi acelerado, com consequente redução da pressão neste ponto (efeito Venturi), permitindo a aspiração da fumaça do cigarro.

A redução da pressão que ocorre no ponto de redução do diâmetro do tubo é dependente do fluxo de ar mantido. Desse modo, com o controle do fluxo de ar sintético na segunda entrada, a quantidade de fumaça de cigarro que foi aspirada para a tubulação e enviada para o interior da caixa foi igualmente supervisionada. Isso

permitiu regular a concentração de monóxido de carbono (CO) mantida na caixa, medida por um sensor de CO, no valor de 300-350 partículas por milhão (ppm).

Determinou-se que o fluxo fixo de ar sintético, na segunda entrada, seria de aproximadamente 1,5 l/min devido à concentração de CO – que variava entre 300 ppm e 350 ppm. Os cigarros utilizados foram da marca Derby[®], contendo 0,8 mg de nicotina, 10 mg de alcatrão e 10 mg de monóxido de carbono por cigarro. Em cada dia de exposição, em torno de 10-12 cigarros foram consumidos durante 30 minutos (Figura 5).

A: entrada de ar sintético, B: entrada da mistura de fumaça do cigarro e ar sintético, C: orifício para a saída de ar
Figura 5 - Ratos sendo expostos à fumaça de cigarro

Os ratos não expostos foram colocados em caixa semelhante pelo mesmo período, respirando apenas ar ambiente e sem fumaça.

3.4 Coleta do Tecido

Dezesseis semanas após o estabelecimento do diabetes e início da exposição à fumaça de cigarro, os ratos foram sacrificados por supradose de pentobarbital intraperitoneal, com exsanguinação pela aorta.

Imediatamente, as amostras da aorta abdominal foram cuidadosamente retiradas por meio de uma laparotomia mediana, sob condições estéreis e respeitando os princípios de assepsia e antissepsia, bem como princípios técnicos de cirurgia vascular periférica. Todos os segmentos foram removidos por cirurgião vascular (autor principal deste estudo). Os segmentos da aorta infrarrenal foram colocados em solução fisiológica para, em seguida, serem submetidos ao teste biomecânico. Um fragmento de aorta de secção transversal, imediatamente adjacente ao segmento infrarrenal submetido ao teste biomecânico, foi preparado para análise histológica e zimografia.

3.5 Teste Biomecânico

Para o teste biomecânico, o segmento da aorta abdominal infrarrenal foi preparado com a remoção do tecido gorduroso da face adventícia (Figura 6).

Figura 6 - Amostra da aorta abdominal

A manipulação do segmento foi executada segundo técnicas da restauração arterial, utilizando pinças e tesouras vasculares para não danificar o material.

O segmento total da aorta infrarrenal foi aberto longitudinalmente para acondicionamento em um sistema de presilhas delicadas o suficiente para firme fixação das extremidades da amostra, mas sem causar dano excessivo ao material biológico (Figura 7).

Embora as fibras aórticas estejam dispostas transversalmente, a tração do segmento teve de ser realizada de modo longitudinal, pois se trata de espécime com tamanho reduzido, impossibilitando a preensão transversal.

Figura 7 - Sistema de apreensão do espécime a ser submetido ao teste biomecânico

Na continuidade, o sistema de presilhas era conectado ao aparelho *INSTRON SPEC 2200* (Figura 8), responsável pela tração do espécime durante o teste de distensão uniaxial.

Figura 8 - Aparelho para o teste biomecânico. À esquerda, a máquina de ensaios universal com o computador de bolso acoplado; e, à direita, o computador com o programa Series IX

Uma vez conectado às presilhas, o teste era coordenado através do programa *INSPEC* – instalado em computador de bolso (*palmtop*) acoplado ao aparelho de tração e alimentado com informações relacionadas à velocidade, à extensão e ao sentido da deformação a ser aplicada ao corpo de prova. O gerenciamento de dados de força aplicada ao espécime e deformação sofrida era realizado por *PC* através do programa *SERIES IX* (Figura 8).

Para que todos os testes tivessem um início em comum, com a mesma força aplicada a todos os fragmentos, o primeiro passo consistia em provocar um deslocamento inicial do espécime até que ele acusasse uma tensão de 0,01 N, assim, eliminando dobraduras macroscópicas do espécime. A partir desse ponto, eram realizadas as medidas manuais do corpo de prova com paquímetro (medidas em mm com duas casas decimais) determinando os valores médios de largura, espessura e comprimento baseados em três medidas para cada dimensão (Figura 9).

Figura 9 - Medida do espécime com paquímetro digital

Com as características do fragmento obtidas, o teste era realizado sob ótimas condições de umidade. Para tanto, o sistema foi construído permitindo-se o fechamento de um compartimento e execução do teste com as presilhas e o corpo de prova mergulhados em solução fisiológica à temperatura ambiente (Figura 10).

Figura 10 - Imersão do espécime em solução fisiológica

Antes do início do teste destrutivo, a amostra era submetida a um pré-teste. Esse visava homogeneizar as amostras com um recrutamento de fibras (colágeno e elastina) semelhante para todos os testes, eliminando a histerese do material. O condicionamento era feito com 10 ciclos de distensão e relaxamento correspondente à distensão de 5% do comprimento útil do espécime e a velocidade de deslocamento do dispositivo de tração calculada em 20% do seu comprimento útil inicial por minuto. O pequeno valor de distensão máxima neste momento evitava que o espécime sofresse uma deformação permanente na sua estrutura.

Ao final do pré-teste, tinha início o teste biomecânico destrutivo uniaxial. A velocidade de deslocamento do dispositivo de tração do espécime era calculada em 20% do seu comprimento útil por minuto e, com esse parâmetro, os dados da força necessária para deformar o fragmento e a sua deformação segundo a força aplicada eram registrados no computador até a ruptura do material. Os testes foram considerados inválidos quando ocorria o escorregamento do espécime das garras ou sua ruptura com menos de 2 mm de distância das garras durante a execução do teste (Figuras 11 e 12).

ϵ , deformação; S , estresse

Figura 11 - Ilustração mostrando a sequência do teste de distensão uniaxial com a correspondente curva elástica

Figura 12 - Final do teste biomecânico com a ruptura do espécime

Os dados da força aplicada (em N) e do comprimento (em mm) obtidos eram armazenados automaticamente no computador e transferidos para o programa Curve Fitting Tool (MathWorks, Natick, EUA). A partir dos valores de força e comprimento, esse programa produzia uma curva de estresse por deformação, o diagrama elástico para cada um dos testes (Figura 13). O programa permitia a seleção de um ponto específico da curva para que fossem calculados os parâmetros biomecânicos: tensão, estresse, energia de deformação e deformação do fragmento.

O ponto utilizado para medida foi o ápice da curva (limite de falência) quando, logo após, ocorria uma queda abrupta dos parâmetros de resistência e demonstrava a ruptura do material.

Os parâmetros de resistência medidos foram:

- força máxima aplicada até a ruptura do espécime (em N);
- estresse de falência (força dividida pela área da secção transversa do espécime no limite de falência, em N/cm^2);
- tensão de falência (força dividida pela largura do espécime no limite de falência, em N/cm);
- energia de deformação (energia acumulada pelo espécime até a ruptura, em N/cm^2).

O parâmetro de elasticidade medido foi:

- deformação máxima até a ruptura.

Para os cálculos, foram aplicadas as seguintes equações através do programa Curve Fitting Tool (MathWorks, Natick, EUA):

$S_f = (F_f / w_0 t_0)(1 + \varepsilon_f)$	(1)
$T_f = (F_f / w_0)(\sqrt{1 + \varepsilon_f})$	(2)
$\varepsilon_f = l - l_0 / l_0$	(3)

Sendo: l_0 , comprimento inicial; l , comprimento final; w_0 , largura inicial; t_0 , espessura inicial; F_f , força máxima; S_f , estresse de falência; T_f , tensão de falência; e ε_f , deformação de falência.

As fórmulas apresentadas levam em consideração a propriedade de incompressibilidade do tecido, que é a capacidade de não alterar o seu volume quando sujeito a forças externas. Esperava-se, portanto, mudanças da largura e área de secção transversa do fragmento à medida que o comprimento fosse modificado.

Os testes de falência ocorreram sob influência do empuxo do meio líquido. Esse efeito foi corrigido pelo programa nos cálculos.

O programa Curve Fitting Tool forneceu a relação entre estresse e deformação para cada teste bem-sucedido realizado (Figura 13). A energia de deformação foi calculada pelo programa como a área sob a curva elástica.

cm, centímetro; N, Newton; *strain*, deformação; *stress*, estresse

Figura 13 - Exemplo de curva elástica ao final do teste biomecânico

3.6 Estudo Histológico

Um fragmento de aorta de secção transversal, imediatamente adjacente ao segmento infrarrenal submetido ao teste biomecânico, foi submetido à fixação química com solução aquosa de formol a 10%, seguida de desidratação com etanol, clareamento com xilol e embebição em parafina. Os blocos de parafina foram submetidos à microtomia com secção seriada com espessura de cinco micrômetros. Para cada espécime, foram produzidas três lâminas, cada uma com colorações distintas, específica para o elemento a ser avaliado: a) coloração de Picrosirius, a fim de serem avaliadas as fibras colágenas perivasculares e facilitar as medidas de área das túnicas média e adventícia; b) coloração de Verhoeff-Van Gieson, avaliação das lâminas elásticas; e c) coloração tricrômico de Masson, para verificar a deposição de elementos de MEC na túnica média e avaliar sua composição.

A análise dos cortes foi realizada em um sistema computadorizado acoplado ao microscópio (AxioCam MRc, Zeiss, Alemanha) com um programa específico para captura e análise de imagens (Axion Vision 4.8, Alemanha).

A avaliação histológica foi realizada no Instituto de Ciências Biomédicas da USP, sendo a leitura das lâminas realizada por um só examinador. Todos os dados foram colocados em planilha Excel para posterior análise estatística.

3.6.1 Medida da razão adventícia/média

A utilização da coloração de Picrosirius (Figura 14) permite fácil identificação e delimitação da túnica adventícia e da túnica média. Assim, foram feitas as medidas referentes à área externa da túnica adventícia (A), à área externa da túnica média (B) e da área interna da túnica média (C). A diferença entre a área externa da túnica adventícia e da área externa da túnica média (A-B) resulta na área total da túnica adventícia. Já a diferença entre as áreas externa e interna da túnica média (B-C) resulta na área total da túnica média. Com esses dados, foi calculada a razão adventícia/média para analisar se ocorrera alteração na proporção da deposição de fibras de colágeno em torno da artéria.

Figura 14 - Fotografia do material corado pela coloração de Picrosirius

3.6.2 Avaliação das lâminas elásticas na túnica média

As lâminas elásticas, evidenciadas pela coloração de Verhoeff-Van Gieson (Figura 15), foram avaliadas de forma quantitativa, contando-se o número de lâminas elásticas em cada segmento arterial. A contagem das lâminas elásticas foi realizada pela contagem simples do número de lâminas elásticas presentes em determinado segmento da aorta; vale ressaltar que para essa contagem a aorta foi dividida em 6 a 8 segmentos, sendo, ao final, calculada a média por animal. A análise qualitativa foi usada para avaliar a possível descontinuidade das lâminas elásticas e, para tal, foi aplicado um escore, que variou de 0 (sem alteração) até 4 (grande alteração). Para a avaliação, cada artéria foi novamente dividida em 6 a 8 segmentos, sendo calculada a média final por animal. O escore de avaliação seguiu o apresentado no Quadro 1:

Quadro 1 - Escore de avaliação qualitativa das lâminas elásticas

Pontuação	Alterações consideradas
0	nenhuma alteração
1	descontinuidade em 0% a 25% das lâminas
2	descontinuidade em 26% a 50% das lâminas
3	descontinuidade em 51% a 75% das lâminas
4	descontinuidade em mais de 75% das lâminas

Figura 15 - Fotografia do material corado pela coloração de Verhoeff-Van Gieson

3.6.3 Avaliação qualitativa da túnica média

Para a avaliação qualitativa da túnica média e suas possíveis alterações, foi utilizada a coloração de tricrômico de Masson (Figura 16). Essa permite verificar a deposição de elementos de MEC na túnica média e avaliar se houve modificação da deposição da MEC em torno das células musculares lisas ou se ocorreu perda celular e substituição por elementos da MEC. Embora essa coloração não permita identificar quais elementos específicos da MEC foram alterados, ela apresenta a distribuição da MEC nas diferentes túnicas vasculares, e isso pode relacionar-se de forma importante com seu funcionamento.

A avaliação qualitativa dos cortes corados também seguiu o quadro de escore (de 0 a 4), mas considerando a intensidade de deposição de MEC em torno das células musculares lisas (MEC pericelular), e a aparente perda de células na túnica média e sua substituição por MEC.

Figura 16 - Fotografia do material corado pela coloração de tricrômico de Masson

3.7 Zimografia - Atividade da Metaloproteinase 2

A zimografia em gel é uma técnica utilizada para avaliar a atividade das gelatinases, como a MMP-2. Seu princípio baseia-se no fato da MMP-2 degradar a gelatina presente no gel após a eletroforese. Os tecidos de aorta, imediatamente adjacente ao segmento enviado para a histologia, foram triturados em nitrogênio líquido e, depois, foram lisados com tampão radioimunoprecipitação (RIPA) (R0278, Sigma-Aldrich, EUA), contendo uma mistura de inibidores de protease (S8820, Sigma-Aldrich, EUA, 1X), ortovanadato de sódio (S6508, Sigma-Aldrich, EUA, 1 mM) e fluoreto de sódio (201154, Sigma-Aldrich, EUA, 10 mM). Os homogenatos foram centrifugados a 13.000 rpm, durante 10 minutos, a 4 °C e, depois, os sobrenadantes foram recolhidos para análise. Os extratos de tecidos, normalizados para a concentração de proteína pela análise de Bradford (B6916, Sigma-Aldrich, EUA) foram então misturados a um tampão não redutor [SDS (dodecil sulfato de sódio) 2%, Tris-HCl 125 mM, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,001%] na proporção de 1:1. As amostras foram aplicadas em géis de poliacrilamida a 12% e separadas por eletroforese, conforme a técnica de SDS-PAGE. Após esse processo, os géis foram submetidos a dois banhos de Triton X-100 a 2% para remoção do SDS e foram colocados em solução 50 mM Tris-HCl e 10 mM CaCl₂ pH 7.4, por no mínimo 16 horas, a 37 °C. Posteriormente, os géis foram corados em solução Coomassie Blue 0,05% por no mínimo uma hora.

Para visualização das bandas referentes às MMP, os géis foram descorados com solução de 30% metanol e 10% ácido acético. Observou-se a formação de bandas claras contra o fundo azul-escuro do Coomassie (devido à degradação da

gelatina incorporada ao gel). Para cada gel foi utilizado um controle interno positivo (Soro fetal Bovino a 2%). O gel foi visualizado em fotodocumentador Amersham Imager 600 (GE Healthcare, USA). A quantificação das bandas de MMP deu-se por meio do *software Image J* (National Institute of Health, EUA). A atividade de MMP foi normalizada pelo padrão de soro fetal bovino em cada gel.

3.8 Cálculo da Amostra

Baseado no estudo de Reddy⁹⁸, constatou-se que os grupos dos animais diabéticos e dos controles apresentaram diferença significativa entre as medidas biomecânicas. O percentual dessas diferenças varia aproximadamente de 18% a 35%.

Com essa informação, utilizou-se como menor diferença significativa a ser encontrada entre os quatro grupos (GC, GD, GT e GDT) o valor de 10% para a variável deformação com desvio padrão igual a 7. Assim, para obtenção de testes com nível de significância de 5% e poder de 80%, seriam necessários no mínimo nove ratos em cada grupo, totalizando 36 animais.

A partir da experiência de outros trabalhos, estimou-se uma perda de 30% a 50% dos experimentos (isto é, testes biomecânicos inválidos). Portanto, para o desenvolvimento deste estudo seria necessário no mínimo 54 ratos. Optou-se por um número ainda maior (75 animais) pela possibilidade de morte do animal no período de observação de 16 semanas.

O cálculo da amostra foi realizado através do *software* BioEstat 3.0⁹⁹ (Instituto Mamirauá, Brasil).

3.9 Análise Estatística

Os dados coletados foram inicialmente analisados quanto à sua normalidade e homogeneidade de variância pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, bem como por inspeção gráfica dos histogramas. Para aqueles dados que não atenderam aos critérios de normalidade, aplicaram-se transformações matemáticas sugeridas pelo comando “*Ladder*” do *software* Stata versão 10.0. Os dados transformados foram utilizados para os procedimentos de estatística inferencial.

Os dados são apresentados em média e desvio padrão. A comparação das variáveis entre os grupos foi realizada por meio da Análise de Variância *one-way*, seguida do teste *post-hoc* de *Scheffe*, quando necessário. A relação entre as variáveis foi investigada pelo teste de correlação de Pearson. Para ambas as análises, considerou-se significativo valor de *p* menor que 0.05.

4 RESULTADOS

4.1 Análise Descritiva da Amostra

Dos 75 animais que iniciaram o experimento, 71 (94,66%) sobreviveram 16 semanas, sendo possível a coleta do espécime. Quatro (5,33%) animais morreram durante o acompanhamento, 1 rato do GC, 2 do GD e 1 do GDT.

Com relação ao peso, na Tabela 3, estão elencados os valores aferidos no início do experimento e no dia do sacrifício para a coleta do material. Em todos os animais não diabéticos (GC e GT) detectou-se um ganho ponderal significativo, enquanto, nos animais diabéticos (GD e GDT), ocorreu perda de peso no mesmo período. O peso corporal final dos ratos diabéticos foi de $308,4 \pm 33,93$ gramas, 30,15% menor que o peso dos animais não diabéticos, $441,5 \pm 50,14$ gramas.

Tabela 3 - Média e desvio padrão do peso (g) dos ratos no início e no dia do sacrifício

	Início do experimento	Dia do sacrifício
Controle	$378,3 \pm 49,90$	$454,6 \pm 39,42$ ‡ †
Diabético	$380,9 \pm 41,94$	$301,8 \pm 29,20$ *
Tabagista	$378,2 \pm 49,62$	$431,0 \pm 56,06$ #
Diabético + Tabagista	$374,0 \pm 44,57$	$313,8 \pm 37,34$

‡ p < 0,05: controle vs diabético; † p < 0,05: controle vs diabético + tabagista; * p < 0,05: diabético vs tabagista; # p < 0,05: tabagista vs diabético + tabagista.

A Figura 17 revela a diferença na quantidade de gordura visceral de um rato não diabético (fotografia à esquerda) para um rato diabético (fotografia à direita), demonstrando um dos motivos para o peso menor dos ratos diabéticos.

Figura 17 - Diferença da quantidade de gordura visceral do rato não diabético (esquerda) e diabético (direita)

Todos os animais que chegaram ao final do acompanhamento tiveram a aorta removida para a realização do teste biomecânico. Dezenove (26,76%) espécimes foram excluídos do estudo por falha no teste segundo critério de exclusão adotado (escorregamento do corpo de prova das garras ou ruptura dele numa distância menor do que 2 mm das garras durante a execução). Dos 52 (73,23%) espécimes inclusos, 11 (21,15%) pertenciam ao GC, 10 (19,23%) ao GD, 16 (30,76%) ao GT e 15 (28,84%) ao GDT (Tabela 4).

Tabela 4 - Números de ratos no início e no dia do sacrifício e o número de testes biomecânicos válidos ao fim do experimento

	Início do Experimento	Dia do Sacrifício	Testes válidos
Controle	17	16	11
Diabético	18	16	10
Tabagista	20	20	16
Diabético + Tabagista	20	19	15

Foi realizada a análise histológica de 71 espécimes imediatamente adjacente ao segmento infrarrenal submetido ao teste biomecânico. Devido à presença de artefatos consequentes à coleta do material, como a dissecação acidental da adventícia da aorta, e ao processamento que sofreram, como cortes espessos (insuficientemente transparentes), retração do volume subsequente à fixação, aspecto das estruturas não evidenciado pela coloração, 30 lâminas da coloração de Picrossirius, 2 lâminas da coloração de Verhoeff-Van Gieson e 14 lâminas da coloração Tricrômico de Masson foram excluídas.

4.2 Análise das Propriedades Biomecânicas

Quanto aos parâmetros de resistência, quando comparados os três grupos individualmente com o GC, não foi individuada diferença estatística (Gráficos 1, 2, 3 e 4 e valores numéricos na Tabela 5). Encontrou-se significância apenas quando aprofundada a avaliação e comparadas as propriedades de resistência do GT, do GD e do GDT entre si. Os valores da força máxima aplicada até a ruptura do espécime foram menores nos GD e GDT, quando comparados ao GT com significância estatística. Não ocorreu diferença desse parâmetro entre o GD e o GDT (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Comparações da força máxima suportada pelos espécimes

† $p < 0,05$: diabético vs tabagista; ‡ $p < 0,05$ tabagista vs diabético + tabagista

Gráfico 2 - Comparações do estresse máximo suportado pelos espécimes

Gráfico 3 - Comparações da tensão máxima suportada pelos espécimes **Gráfico 4 - Comparações da energia de deformação dos espécimes**

A elasticidade, avaliada pelo parâmetro deformação, foi semelhante nos diferentes grupos do estudo, sem diferença significativa entre eles (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Comparações da deformação máxima dos espécimes até a ruptura

Os valores médios (com desvio padrão), assim como os valores máximos e mínimos das propriedades biomecânicas obtidos em todos os grupos, estão elencados na Tabela 5.

Tabela 5 - Comparação dos parâmetros biomecânicos de falência da aorta dos diferentes grupos

	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	p
Força (N)					
Controle	2,20	0,62	1,5	3,3	0,04
Diabético	1,81†	0,29	1,3	2,3	
Tabagista	2,24‡	0,42	1,7	3,3	
Diabético + Tabagista	1,88	0,47	1,3	2,9	
Estresse (N/cm²)					
Controle	217	75	125	351	0,50
Diabético	182	31	126	223	
Tabagista	212	47	135	310	
Diabético + Tabagista	198	66	111	374	
Tensão (N/cm)					
Controle	8,64	2,66	5,18	12,27	0,26
Diabético	7,28	0,92	5,20	8,58	
Tabagista	8,51	1,65	6,24	11,49	
Diabético + Tabagista	7,60	2,38	4,59	13,06	
Deformação					
Controle	0,98	0,19	0,51	1,19	0,59
Diabético	1,02	0,18	0,69	1,24	
Tabagista	0,91	0,25	0,47	1,34	
Diabético + Tabagista	1,05	0,43	0,52	2,25	
Energia de deformação (N/cm²)					
Controle	60,0	24,8	18,0	115,4	0,99
Diabético	54,8	17,4	32,1	90,0	
Tabagista	59,4	26,6	26,7	124,1	
Diabético + Tabagista	68,5	56,9	16,7	253,5	

† p<0,05: diabético vs tabagista; ‡ p<0,05 tabagista vs diabético + tabagista

4.3 Análise das Propriedades Histológicas

A avaliação da proporção da deposição de fibras de colágeno em torno das aortas dos animais foi mensurada pela razão adventícia/média pela coloração de Picrossirius (Figura 18).

A razão adventícia/média não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos estudados (Gráfico 6).

GC: grupo controle, GD: grupo diabético, GT: grupo tabagista, GDT: grupo diabético e tabagista

Figura 18 - Fotomicrografias representativas de aortas de ratos na coloração de Picrosirius

Gráfico 6 - Comparações da razão adventícia/média

Foram avaliadas as lâminas elásticas usando a coloração Verhoeff (Figura 19). A contagem total de lâminas elásticas foi maior nos ratos diabéticos (GD e GDT) quando comparados aos do GT com diferença estatística significativa (Gráfico 7).

Com a mesma coloração, foi analisada a fragmentação das lâminas elásticas intermediárias visando avaliar indiretamente a resposta inflamatória do vaso. Foi observada maior fragmentação, com significância estatística, em todos os grupos estudados quando comparados ao GC. Esse parâmetro foi também maior nos ratos tabagistas (GT e GDT) quando comparados aos do GD (Gráfico 8).

GC: grupo controle, GD: grupo diabético, GT: grupo tabagista, GDT: grupo diabético e tabagista

Figura 19 - Fotomicrografias representativas de aortas de ratos mostrando fibras elásticas na coloração de Verhoeff

Gráfico 7 - Comparações da contagem total de lâminas elásticas **Gráfico 8 - Comparações da fragmentação das lâminas elásticas**

Com a coloração de Masson (Figura 20), determinou-se a matriz pericelular na túnica média (Gráfico 9) e a perda/substituição celular na túnica média (Gráfico 10), dois parâmetros que avaliam indiretamente a inflamação vascular. A matriz pericelular na túnica média foi maior no GDT, quando comparado aos demais grupos (GC, GT e GD), com diferença significativa. Esse parâmetro também foi maior no GT quando comparado ao GD (Gráfico 9). Relativamente à perda/substituição celular na média, também, foi observada uma alteração dos valores do GDT em relação aos demais grupos (GC, GT e GD) (Gráfico 10).

GC: grupo controle, GD: grupo diabético, GT: grupo tabagista, GDT: grupo diabético e tabagista

Figura 20 - Fotomicrografias representativas de aortas de ratos na coloração de tricrômico de Masson

Gráfico 9 - Comparações da matriz pericelular na túnica média

* $p < 0,05$: controle vs diabético + tabagista; † $p < 0,05$: diabético vs diabético + tabagista; O $p < 0,05$: tabagista vs diabético + tabagista; ‡ $p < 0,05$: diabético vs tabagista

Gráfico 10 - Comparações da perda/substituição celular na túnica média)

* $p < 0,05$: controle vs diabético + tabagista; † $p < 0,05$: diabético vs diabético + tabagista; O $p < 0,05$: tabagista vs diabético + tabagista

4.4 Análise da atividade da metaloproteinase 2

Pela técnica de Zimografia, foi obtido o resultado da atividade colagenolítica da MMP-2. No gel de eletroforese, individuaram-se duas bandas de degradação correspondentes à MMP-2: a MMP-2 inativa (pró- MMP-2), com peso molecular de aproximadamente 72 kDa, e a forma ativa, com peso molecular de aproximadamente 64 kDa (Figura 21).

Figura 21 - Zimografia representativa da pró-MMP-2 (72kDa) e MMP-2 (64kDa)

As duas formas de MMP-2 apresentaram diminuição no GD em relação ao GDT, com significância estatística (Gráficos 11 e 12). No que tange ao GC, nenhum dos grupos apresentou variação significativa.

Gráfico 11 - Comparações da atividade da MMP-2 (72 kDa)

† p<0,05: diabético vs diabético + tabagista

Gráfico 12 - Comparações da atividade da MMP-2 (64 kDa)

† p<0,05: diabético vs diabético + tabagista

5 DISCUSSÃO

5.1 Considerações Gerais

O método utilizado neste estudo foi desenvolvido em conjunto pelos pesquisadores do Laboratório de Biomecânica Vascular (Laboratório de Investigação Médica 02) do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da USP e do Departamento de Bioengenharia da Universidade de Iowa, EUA. Em 2001, o projeto inicial, apoiado e patrocinado pela *National Science Foundation*, EUA, e pela FAPESP (Auxílio à Pesquisa - Pesquisador Visitante Internacional, número do Processo 2001/05030-8), permitiu a visita do engenheiro Prof. Dr. Madhavan Lakshmi Raghavan ao Laboratório de Biomecânica Vascular. Em 2003, o projeto financiado pela *American Heart Association*, EUA (*reference number* 0365408Z), possibilitou a aquisição e instalação dos equipamentos necessários para a realização dos testes destrutivos uniaxiais em material biológico. A partir de então, a linha de pesquisa progrediu: houve desenvolvimento de teses de doutorado e projetos de iniciações científicas, tendo recebido mais dois apoios financeiros da FAPESP, em 2009 (Auxílio à Pesquisa - Regular, número do processo 2009/17759-4) e em 2010 (Auxílio à Pesquisa - Regular, número do processo 2010/07307-6). Este trabalho também foi contemplado com apoio financeiro da FAPESP (Auxílio à Pesquisa - Regular, número do processo 2014/16725-7). O método deste estudo corresponde a uma linha de pesquisa estabelecida, com produção de publicações em periódicos importantes⁸³⁻⁸⁸.

O conhecimento do comportamento e da estrutura da aorta de ratos tem relevância para a área da cirurgia vascular. Diversos autores já propuseram métodos terapêuticos para diminuir a progressão da doença aneurismática em humanos mediante esse conhecimento¹⁰⁰⁻¹⁰³. Nesse sentido, a biomecânica colabora na compreensão da função normal, prediz alterações que possam ocorrer e pode propor mudanças nos métodos de intervenção¹⁰⁴.

Os tecidos moles representam um desafio especial para os estudos mecânicos, pois são estruturas heterogêneas, de manuseio difícil e de comportamento pouco previsível ao serem testados. Em vista disso, a pesquisa continuada sobre o tema é justificada pela riqueza de novas informações que ainda podem ser extraídas. Entre os tecidos moles, uma atenção especial vem sendo dada ao fragmento de aorta.

O vaso sanguíneo apresenta comportamento mecânico complexo por ser constituído de material heterogêneo (células, fibras, matriz) com uma natureza biológica ativa que sofre constantes mudanças.

Este estudo analisou as propriedades biomecânicas de falência do tecido aórtico de ratos diabéticos, ratos expostos à fumaça de cigarro e ratos diabéticos e expostos à fumaça de cigarro a partir da quantificação dos parâmetros força, estresse, tensão, deformação e energia de deformação. O estudo analisou também as alterações histológicas e a atividade das MMP-2 na aorta dos animais, sendo possível correlacionar alterações biomecânicas, histológicas e enzimáticas.

Este estudo biomecânico abre um novo campo de pesquisa com relação aos atuais relatos pertinentes da literatura, utilizando testes uniaxiais destrutivos que, ao mesmo tempo, analisaram as mudanças na aorta de ratos expostos à fumaça de cigarro, ratos diabéticos e ratos diabéticos expostos à fumaça de cigarro. Combinou-

se, assim, no mesmo estudo, o principal fator de risco ambiental e um fator considerado como “protetor” da doença aneurismática. Além disso, esses dois fatores foram associados em um mesmo animal para estudar as alterações ocorridas na aorta.

5.1.1 Modelo de indução do diabetes

O diabetes em animais pode ser induzido por operação, infecção viral, administração de agentes químicos ou de forma espontânea por modificação genética (ratos Biobreeding, Non-Obese Diabetic e Nude atímicos)¹⁰⁵.

Pela dificuldade de obtenção e pelo elevado custo de animais geneticamente manipulados no nosso meio, o desenvolvimento do diabetes em ratos fica restrito aos induzidos quimicamente ou pancreatectomizados.

A pancreatectomia a 90%, 95% ou 99,5% é método pouco fiel para redução do número de células beta, pois ocorrem resultados imprevisíveis e de difícil reprodutibilidade. Seu resultado passa da simples intolerância à glicose ou leve hiperglicemia (pancreatectomia a 90% ou 95%) ao diabetes severo que, sem tratamento, evolui para óbito (pancreatectomia a 99,5%)^{105,106}.

Em abril de 1943, Dunn e McLetchie relataram que a aloxana (ácido mesoxálico ureico) causava necrose de células beta do pâncreas¹⁰⁷. Foi o início do diabetes experimental induzido quimicamente. Entretanto a aloxana é menos específica contra a célula beta, a dose diabetogênica é muito próxima da letal e há grande variabilidade entre a dose inoculada e o efeito provocado^{90,108}.

O primeiro relato de injeção da STZ foi acidental na produção do diabetes. A ação diabetogênica da STZ foi descrita por Raikeeten *et al.*, em 1963, que descreveram também uma avaliação morfológica da alteração ultraestrutural da

célula beta¹⁰⁹. Em uma série de estudos, Junod *et al.* confirmaram a especificidade da lesão das células beta, documentando que evidência histológica é observável entre uma hora e sete horas, sendo que, após 24 horas, o conteúdo de insulina das células beta é reduzido em 95% ou mais^{90,110}.

A STZ é um agente nitrosureico antineoplásico que induz a lesão no DNA das ilhotas pancreáticas. Doses altas provocam um efeito tóxico direto à célula beta e doses baixas resultam em hiperglicemia de 1 a 2 dias após a injeção¹¹¹. Observações ultraestruturais revelam necrose de células beta e infiltrado de linfócitos e macrófagos. Células alfa e delta mostram-se normais, ou seja, há redução do conteúdo pancreático de insulina e pouco efeito no conteúdo de somatostatina e glucagon¹¹².

A STZ foi a droga utilizada neste trabalho pela alta eficácia e permanência do estado de diabetes em médio e longo prazo¹¹³⁻¹¹⁵. A dose utilizada de STZ foi de 55 mg/Kg, com base em trabalho experimental que avaliou a eficácia dessa substância em provocar o estado diabético sem causar a morte do animal⁹⁰.

5.1.2 Modelo de exposição à fumaça de cigarro

Griffith *et al.* foram pioneiros na descrição de modelos experimentais para exposição de roedores à fumaça de cigarro em 1985¹¹⁶. Atualmente, encontram-se, na literatura, diversos modelos para esse fim¹¹⁷⁻¹²¹. Apesar de alguns questionamentos relacionados ao tempo e à quantidade de cigarros utilizados, acredita-se que os modelos criados para exposição à fumaça de cigarro são os que mais se aproximam do quadro clínico apresentado por pacientes fumantes, sendo, portanto, o método mais adequado para o estudo dos aspectos fisiopatológicos do tabagismo humano^{122,123}. O modelo experimental de injeção intraperitoneal de

nicotina não representa a realidade clínica, uma vez que o cigarro contém mais de 1.000 elementos⁹⁵ que podem também alterar as propriedades biomecânicas e os tecidos da parede da aorta.

O equipamento de exposição à fumaça de cigarro escolhido foi desenvolvido no Laboratório de Investigação Médica 20 da Faculdade de Medicina da USP⁹⁵. A escolha desse aparato baseou-se na necessidade de um modelo que reproduzisse no animal o hábito de fumar em humanos. Uma série de aparatos utiliza a fumaça da queima do cigarro para a exposição, o que simula condições fisiológicas de um fumante passivo, enquanto que, no modelo escolhido, a exposição dos animais à fumaça é resultado da sucção (“tragada”) do cigarro pelo sistema de Venturi, simulando, dessa maneira, uma condição de um fumante ativo^{96,118,121,122,124}.

Há também, em modelos experimentais, uma grande variação quanto aos parâmetros de tempo de exposição dos animais à fumaça de cigarro. Na literatura são reportadas séries de trabalhos utilizando ratos, nas quais o período de exposição à fumaça varia de 4 a 26 semanas^{69,125,126}. Considerando a expectativa de vida dos ratos em torno de 21 meses¹²⁷, ao projetar-se a expectativa de vida de um ser humano em torno de 74 anos¹²⁸, esses tempos de exposição corresponderiam a um histórico tabágico que varia entre 3,5 a 21 anos.

O período de 16 semanas de exposição empregado neste estudo, corresponde à carga tabágica de 13,6 anos no ser humano. Esse período foi escolhido na tentativa de encontrar alterações na aorta referentes à exposição à fumaça de cigarro e ao mesmo tempo compatibilizar este tempo com a maior causa de mortalidade deste modelo – que é a indução do diabetes por longo período.

5.2 Ratos Diabéticos

As complicações vasculares do diabetes são mais graves, difusas e aceleradas quando comparadas à doença vascular do não diabético¹²⁹. Doenças vasculares representam a maior causa de mortalidade e morbidade em pacientes diabéticos¹³⁰⁻¹³³. Essa morbi-mortalidade é essencialmente relacionada às lesões vasculares ateroscleróticas que se desenvolvem ao longo do tempo¹³². Além disso, doença cardíaca coronária, doença cerebrovascular e doença arterial periférica, todas elas decorrentes da aterosclerose, ocorrem, em idade mais precoce, em diabéticos em comparação com a população sem essa afecção^{134,135}. Embora o surgimento do AAA tenha sido inicialmente atribuído à aterosclerose, observou-se associação negativa "inesperada" entre diabetes (um dos principais fatores de risco para aterosclerose) e doença vascular aneurismática²⁴.

Observações que pessoas diabéticas (5 a 6% da população adulta na Europa) têm menor risco de desenvolver doença aneurismática estão bem documentadas. Dados de 17 estudos baseados na população geral foram agrupados e estimaram que a chance de desenvolver AAA em pacientes com diabetes é de 0,80 (IC 95% 0,70 e 0,90) em comparação com a população não diabética¹³⁶.

Explicações plausíveis para essa associação negativa podem ser encontradas quando analisada a MEC: o excesso de matriz nos vasos é uma característica do diabetes⁷², enquanto a perda da matriz é observada nas paredes de aortas aneurismáticas⁶⁹. É provável que os AAA surjam quando indivíduos geneticamente suscetíveis estejam expostos a riscos adicionais, como fumar e envelhecer. Para indivíduos que desenvolvem diabetes é possível que o aumento da matriz, devido ao estado hiperglicêmico, compense qualquer diminuição relacionada à susceptibilidade ao AAA.

Os resultados deste estudo corroboram essa informação. Encontrou-se aumento no colágeno e na elastina na parede da aorta dos ratos diabéticos, dois dos principais elementos da MEC.

Este aumento do colágeno vem ao encontro aos demais resultados de estudos em ratos diabéticos que demonstram níveis aumentados de colágeno na parede aórtica¹³⁷⁻¹³⁹. Somado a isso, estudos *in vitro* indicam que altas concentrações de glicose resultam em aumento da síntese de colágeno¹⁴⁰⁻¹⁴².

Outra explicação, segundo a literatura, para a associação negativa está na diminuição da atividade da MMP-2 encontrada no diabético^{143,144}. Em um estudo em humanos, o conteúdo de MMP-2 das artérias coronárias foi reduzido em pacientes diabéticos¹⁴⁵. Da mesma forma, biópsias renais humanas de pacientes diabéticos parecem conter menos MMP-2 do que as de pacientes não diabéticos¹⁴⁶.

Esse resultado também foi encontrado neste trabalho, em que se encontrou uma tendência à diminuição da atividade de MMP-2 nos ratos diabéticos.

Atividade aumentada de MMP-2 foi identificada no sangue e no tecido aneurismático humano, em associação com macrófagos¹⁴⁷, sendo capaz de degradar ampla gama de proteínas de matriz, incluindo a elastina. O significado das mudanças nos níveis de MMP-2 e MMP-9 observadas em tecido humano aneurismático é embasado em estudos de modelos animais^{40,148}. Os ratos knockout, deficientes em MMP-2 ou MMP-9, não desenvolvem dilatação aórtica após aplicação perivascular de cloreto de cálcio em comparação com um aumento médio de 74% no diâmetro aórtico observado em camundongos de tipo selvagem tratados da mesma maneira⁴⁰. As MMP também podem ser importantes na patogênese da AAA devido às interações com respostas inflamatórias¹⁴⁹. Assim, a diminuição da atividade de

MMP-2 encontrada no diabetes pode suprimir a dilatação aórtica e todo o processo que segue a doença aneurismática.

Complementarmente, uma terceira explicação para o efeito protetor do diabetes pode ser dada por uma resposta inflamatória diferente, causada pela glicação não enzimática.

Dados da literatura sugerem que a formação do AAA está associada à inflamação crônica da parede da aorta, que leva ao aumento da atividade proteolítica e, por conseguinte, depleção de elastina e posterior deposição de colágeno perivascular^{42,81}. Esses processos resultam em disfunção progressiva da elastina e do colágeno da parede aórtica, evoluindo com expansão gradual e potencial de ruptura da aorta. A inflamação vascular também é importante no diabetes^{150,151}: biópsias de ateroma removidas de pacientes diabéticos geralmente mostram mais inflamação que as de indivíduos sem diabetes^{152,153}.

Seria de se esperar que a inflamação aórtica induzida pelo diabetes causasse a destruição da MEC e, como resultado, a formação do aneurisma seria mais comum nesses pacientes; o que pode explicar o achado contrário, relaciona-se às diferenças na resposta inflamatória da patogênese dos AAA em comparação com a da aterosclerose oclusiva, podendo haver alterações na interação entre MEC e células inflamatórias no diabetes. A conformação em que a matriz é apresentada aos monócitos-macrófagos (e outras células) determina a resposta celular^{154,155}. Assim, as mudanças conformacionais da matriz induzidas pela glicação podem suprimir quaisquer sinais pró-inflamatórios que resultariam da estimulação de células inflamatórias¹⁵⁶. E isso pode limitar a inflamação ao ateroma intimal, promovendo as complicações oclusivas do ateroma, mas protegendo a camada média da degradação e consequente dilatação vascular.

Este estudo confirma a presença de inflamação na parede arterial secundária ao diabetes. A fragmentação da lâmina elástica da camada média, um dos parâmetros que avaliaram a inflamação vascular, apresentou aumento estatisticamente significativo em relação ao grupo controle. Os demais parâmetros utilizados para a mensuração inflamatória (perda/substituição celular e matriz pericelular na túnica média) não apresentaram variação em relação ao grupo controle.

Quanto à biomecânica, alguns autores já avaliaram as consequências do diabetes na aorta. Reddy demonstrou os efeitos do diabetes na parede da aorta descendente de ratos diabéticos induzidos por STZ. Sete semanas após o estabelecimento do diabetes, os testes biomecânicos evidenciaram um aumento significativo da resistência e uma diminuição também significativa da elasticidade da aorta desses animais⁹⁸.

Oxlund *et al.* analisaram as propriedades biomecânicas das amostras aórticas de pacientes com diabetes tipo I e indivíduos controle com idade e sexo compatíveis. Na aorta dos diabéticos tipo I foi encontrada uma elasticidade diminuída correlacionada com a duração do diabetes. A resistência não se mostrou alterada em relação aos controles¹⁵⁷.

Andreassen *et al.* desenvolveram dois trabalhos, um após 30 dias e outro após 3 meses de indução de diabetes em ratos, e não encontraram alterações nas propriedades biomecânicas das aortas^{158,159}.

Os resultados desta investigação mostram que, apesar da indução com sucesso do diabetes, evidenciada pela perda ponderal, mudança macroscópica na quantidade de gordura visceral e alterações histológicas, não ocorreram mudanças biomecânicas esperadas para a hipótese proposta de perda da elasticidade e aumento

da resistência do tecido aórtico. Esse resultado, a princípio, acompanha os achados da escassa literatura publicada e, assim como ela, não foi capaz de elucidar completamente o efeito protetor do diabetes à dilatação e posterior ruptura da aorta abdominal do ponto de vista biomecânico.

5.3 Ratos Expostos à Fumaça de Cigarro

Os primeiros a relatar uma associação entre tabagismo e a doença aneurismática da aorta foram Hammond e Horn em 1958¹⁶⁰. Estudo caso-controle, publicado no *American Journal Epidemiology* no ano 2000, investigou fatores de risco para AAA e sugeriu que a aterosclerose por si só não é uma explicação adequada como causa e que o tabagismo é o fator de risco modificável mais forte para a progressão da doença¹⁹. A partir desse estudo, outros trabalhos surgiram deixando evidente a importância do cigarro como fator de risco para o desenvolvimento e progressão do AAA^{13,15,18}.

Os fumantes apresentam atividade enzimática elevada na parede da aorta, que pode ser a causa da degeneração acentuada da MEC; portanto, o hábito de fumar está associado a alterações na composição estrutural da matriz proteica da parede arterial com consequente modificação da elasticidade e resistência do vaso⁶⁹.

Este estudo experimental em ratos avaliou os efeitos da exposição à fumaça de cigarro nas propriedades biomecânicas e histológicas da aorta desses animais, assim como a atividade enzimática na parede desse vaso mediante o estudo da MMP-2. A motivação foi baseada na escassez de estudos que correlacionam diretamente a interferência do tabagismo sobre o comportamento biomecânico da aorta.

Em estudo experimental inédito desenvolvido por Jardin *et al.*, ratos foram confinados numa câmara conectada a um aparelho de fumar e as propriedades biomecânicas da aorta desses animais foram avaliadas após 2, 4 e 6 meses de exposição. Não foram observadas alterações na biomecânica da aorta abdominal dos animais expostos a períodos menores ou iguais a 4 meses; já a análise do grupo exposto a 6 meses evidenciou redução da elasticidade e resistência da parede do vaso⁶⁹.

Neste estudo, as propriedades biomecânicas de resistência e elasticidade não apresentaram diferença estatística entre os ratos tabagistas e o grupo controle. Uma explicação plausível seria a não caracterização da cronicidade de exposição (período $\geq$ a 6 meses), visto que o tempo de exposição assim como a carga tabágica estão relacionados diretamente ao desenvolvimento dos aneurismas em humanos¹⁹.

Em analogia às doenças pulmonares, fumantes apresentam acúmulo de macrófagos, linfócitos e neutrófilos nas paredes das vias aéreas e espaços aéreos adjacentes periféricos antes do desenvolvimento do enfisema. Associado a esses achados, estudos indicam maior expressão de MMP e de outras proteinases em tecido pulmonares de pacientes com enfisema, apoiando também a presença de enzimas elastolíticas e colagenolíticas no DPOC¹⁶¹⁻¹⁶³. As semelhanças entre enfisema e AAA sugerem que a ativação local de leucócitos dentro do pulmão possa causar uma resposta inflamatória mais generalizada, potencialmente resultando em aumento da degradação da matriz em tecidos remotos ao do pulmão¹²⁵. O tabagismo tem muitos efeitos sistêmicos com potencial para influenciar a degeneração aneurismática, refletido pelo aumento dos marcadores circulantes de inflamação e produção de leucócitos de citocinas pró-inflamatórias^{164,165}, aterogênese e trombose^{166,167} e diminuição das células-tronco hematopoéticas¹⁶⁸. No presente estudo, o aumento da

atividade inflamatória inferiu-se pelo aumento dos parâmetros perda/substituição celular na túnica média, da matriz pericelular na túnica média e degradação das lâminas elásticas, corroborando o remodelamento da parede da aorta causado pelo fumo.

Os resultados de Takagi e Umemoto relataram que o fumo de tabaco leva a um aumento da expressão genética de 5-lipoxigenase no tecido aórtico e que esta desempenha um importante papel na ativação da MMP-2, com consequente formação de aneurismas^{62,63}.

Embora fosse esperado que ratos submetidos à exposição à fumaça de cigarro apresentassem todo o curso nocivo do processo inflamatório/degradativo, os resultados demonstraram que 16 semanas de exposição ao fumo não influenciaram a atividade das MMP-2. A exposição à fumaça de cigarro por 4 meses não alterou significativamente a lesão tecidual inicial ou substancialmente a resposta inflamatória subsequente, que se pensa ser responsável pelo desenvolvimento inicial do AAA induzido pela MMP-2.

Há evidências de que a degeneração da elastina seja uma das alterações iniciais na degeneração da parede aórtica durante o processo de dilatação, contribuindo com a perda da integridade estrutural e o desenvolvimento dos aneurismas. Em trabalho experimental, Dobrin estudou as alterações associadas à degradação enzimática da parede arterial e sugeriu que a dilatação aneurismática é resultado do processo de degradação das fibras elásticas. Ele demonstrou dilatação arterial após a infusão de elastase, enquanto a infusão de collagenase foi capaz de causar a ruptura das artérias sem que houvesse dilatação¹⁶⁹.

As aortas dos animais expostos à fumaça de cigarro não acusaram alterações significativas em relação à contagem total de lâminas elásticas e deposição de fibras colágenas. Contudo observou-se um processo degenerativo na túnica média caracterizada pela fragmentação do tecido elástico. Esse processo foi estatisticamente significativo em relação aos ratos controle.

Desse modo, parece que uma carga tabágica mínima associada a um fator predisponente (genético ou idade, por exemplo) é necessária para estabelecer a lesão tecidual responsável pelo aneurisma, a ponto da interrupção do hábito não ser capaz de reverter esse processo já estabelecido.

5.4 Ratos Diabéticos Expostos à Fumaça de Cigarro

Este experimento teve a intenção de avaliar conjuntamente dois fatores envolvidos no aneurisma da aorta: o tabagismo, considerado o principal fator de risco; e o diabetes, apontado como um fator protetor.

Os resultados desta investigação indicaram que a associação do diabetes com a exposição à fumaça de cigarro causou efeitos sobre a integridade global do tecido conjuntivo aórtico. Como a cronicidade do tabagismo não fora estabelecida nesse modelo experimental, esperava-se maior influência do diabetes no período de 16 semanas do experimento.

Do ponto de vista biomecânico, resumido aos parâmetros resistência e elasticidade, o GDT não apresentou variação significativa em relação ao GC. Encontrou-se significância apenas quando se analisou as propriedades de resistência intergrupos. Os GD e GDT indicaram valores menores de força máxima de falência em comparação ao GT, com significância estatística. Este resultado pode

inicialmente ser controverso aos publicados na literatura, porém, quando se normalizaram os valores da força com a área de secção transversa do espécime (estresse) e largura deste (tensão), esses valores menores de força máxima não se repetiram. E isso pode ser explicado pelo baixo peso e menor crescimento dos animais diabéticos durante o acompanhamento de 16 semanas. Com um menor crescimento devido ao estado hiperglicêmico, as aortas desses animais eram menores do que as dos animais não diabéticos. Aortas menores refletem um valor menor de força até a ruptura. Quando a força foi normalizada com as características do espécime, houve uma correção deste viés na análise biomecânica.

Em relação à MEC, ao colágeno e à fibra elástica, notou-se no GDT, assim como no GD, uma tendência de aumento em relação aos GC e GT. Os trabalhos mostram que a produção de colágeno patológico em tecido diabético pode ser o resultado da expressão excessiva dos fatores de crescimento que são conhecidos por induzir síntese de colágeno¹⁷⁰ e da baixa regulação da produção de MMP que regulam o catabolismo de colágeno, que parece ter impacto na deposição de colágeno na parede do vaso diabético^{171,145}. Além disso, a superexpressão dos receptores de ancoragem de colágeno por células musculares lisas pode contribuir para as anormalidades do colágeno no vaso sanguíneo diabético¹⁷². Maiores concentrações de colágeno estiveram presentes nas aortas do GDT em relação àsquelas do GC e ao GT, e em concentração semelhante ao do GD, mais uma vez reiterando que o diabetes possa compensar qualquer diminuição relacionada ao fator de risco tabagismo.

Observou-se que a contagem total de fibras elásticas foi maior no GDT do que no GT ($p < 0,05$). Esse achado vai ao encontro à ação das MMP, que, embora não tenha variado em relação ao grupo controle, apresentou uma atividade maior que a do GD com significância estatística. O resultado parece controverso, entretanto a

análise pormenorizada revela que o GD apresentou atividade de MMP menor que no GT. Considerando que o GDT tem influência dos dois fatores, pode-se considerar que o tabagismo promoveu um “controle” da produção/degradação das fibras elásticas gerada exclusivamente pelo diabetes no GD, provada pelo aumento significativo em relação ao GC.

Identificou-se elevação, com significância estatística, do processo inflamatório em todos os parâmetros testados (fragmentação das lâminas elásticas intermediárias, matriz pericelular e a perda/substituição celular na túnica média). Processos inflamatórios desempenham um papel importante no desenvolvimento da doença vascular aterosclerótica, sendo o fumo um dos fatores de risco¹⁵¹. A disfunção vascular induzida pelo tabagismo é iniciada pela redução da biodisponibilidade do óxido nítrico e pelo aumento da expressão de moléculas de adesão. O aumento da adesão de plaquetas e macrófagos provoca o desenvolvimento de um ambiente pró-coagulante e inflamatório. Após a migração e ativação transendotelial, os macrófagos absorvem lipoproteínas oxidadas decorrentes de modificações oxidativas e diferenciam-se em células espumosas. Além do dano físico direto às células endoteliais, o tabagismo induz remodelação tecidual e processos pró-trombóticos e, com a ativação de sinais inflamatórios sistêmicos, contribuem para mudanças na parede vascular¹⁷³. O diabetes – outro fator de risco importante para doença aterosclerótica –, também, causa um processo inflamatório na parede do vaso¹⁵¹. Os estudos referentes a doenças vasculares mostram que o tabagismo ativo é um fator de risco significativo e independente para mortalidade por doenças cardiovasculares^{174,175}, assim como o diabetes^{176,177}; pode-se supor, então, que o aumento importante nos parâmetros inflamatórios reflete a atuação de dois importantes fatores de risco na gênese da doença aterosclerótica.

Os resultados deste estudo indicam que o efeito protetor do diabetes tendeu a sobrepor-se ao efeito degradativo da exposição à fumaça do cigarro, com isso, permitindo inferir que o processo inflamatório precede as alterações biomecânicas da doença degenerativa da aorta. A hipótese mencionada inicialmente sobre a temporalidade da exposição necessita ser confrontada com o efeito biológico do diabetes em aumentar a MEC. Com as lacunas científicas identificadas, não é possível afirmar que a atividade proteolítica do fumo foi inócua a ponto de o diabetes dominar as alterações morfofuncionais da parede da aorta ou que o efeito sintetizador desta doença fosse forte o suficiente para inibir as manifestações do tabagismo. Com isso, reforça-se a necessidade de ampliar o conhecimento desta área por meio de estudos experimentais e caso-controle com a perspectiva não só de desvendar o processo fisiopatológico do aneurisma e da ação dos fatores de risco, mas, também, de desenvolver medicamentos capazes de prevenir ou paralisar a progressão do aneurisma de aorta.

5.5 Críticas ao Estudo e Perspectivas Futuras

Esse foi o primeiro estudo experimental com ratos do Laboratório de Biomecânica Vascular do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da USP, assim como o pioneiro em induzir o diabetes e expor à fumaça de cigarro no modelo animal. Assim sendo, este estudo poderá servir de base para pesquisas mais complexas sobre a doença, como a indução do próprio aneurisma nesse modelo e a associação de terapia/interrupção do fator de risco para analisar o comportamento do seu crescimento.

O uso de modelos animais pode propiciar uma série de vantagens para a elucidação dos mecanismos fisiopatológicos de determinadas doenças. Mas ainda que grande parte das respostas biológicas seja altamente conservada entre as diferentes espécies, há características próprias de cada tipo de animal que podem não se aplicar ao homem. É possível que existam muitas diferenças entre as duas espécies no tocante à resposta inflamatória, sinalização intercelular, entre outras. Por conseguinte, é possível que os mecanismos de lesão presentes em um modelo animal não sejam os mesmos encontrados no modelo humano.

Ademais, não é viável contemplar todas as influências em um só estudo. Por exemplo, outros componentes da MEC, que não o colágeno e a elastina, podem influenciar as propriedades biomecânicas da aorta. Os proteoglicanos são moléculas hidrofílicas que prendem a água e, entre outras propriedades, influenciam a hidratação do tecido¹⁷⁸. A quantidade de proteoglicanos não foi medida neste estudo e seu papel no comportamento biomecânico do tecido não é atualmente claro, embora estudos anteriores relatem que a digestão de proteoglicanos com tratamento enzimático não produz alterações nas propriedades biomecânicas do vaso sanguíneo¹⁷⁹ e cartilagem¹⁸⁰.

No tocante à indução do diabetes, os resultados podem ser modelo ou método específico. A STZ foi utilizada para induzir o diabetes, porém existem indicações que essa substância possa causar outras alterações no animal, além da indução de diabetes⁹⁸. Outra possível interferência é o retardamento do crescimento observado nos animais diabéticos, que pode ter impacto nas propriedades biomecânicas e bioquímicas da parede do vaso.

Ao considerar o modelo de exposição à fumaça de cigarro, deve-se ponderar também que não foram determinados os níveis de carboxi-hemoglobina no sangue do animal após a exposição à fumaça.

Quanto à análise biomecânica, os testes uniaxiais fornecem informações importantes sobre as propriedades dos materiais analisados, porém poucas informações a respeito dessas propriedades em condições fisiológicas¹⁸¹; em outras palavras, o ponto adotado para análise do diagrama elástico corresponde à falência do tecido, ponto não atingido habitualmente em condições fisiológicas. Entretanto a necessidade de uniformização na análise e comparação de gráficos tem levado, a maioria dos autores, a adotar o limite de falência como o ponto em comum destinado às análises biomecânicas^{39,79,83-85,87,182,183}.

Outro aspecto que deve ser ponderado criticamente refere-se ao teste biomecânico unidirecional. O tecido aórtico é heterogêneo, anisotrópico e sofre estresses em múltiplas direções; logo, a execução de testes multiaxiais traria informações mais detalhadas da resistência e da elasticidade do tecido nas várias direções, assemelhando-se à situação fisiológica tridimensional da aorta. Porém esse tipo de teste aumenta a dificuldade no manuseio do espécime e na execução do teste biomecânico, podendo aumentar de forma considerável o número de testes inválidos.

Os parâmetros biomecânicos foram avaliados exclusivamente no momento mais crítico do diagrama elástico: a falência. O grupo do Laboratório de Biomecânica Vascular tem por objetivo, futuramente, desenvolver um modelo matemático que permita analisar e comparar diferentes momentos do diagrama elástico dos espécimes testados, dessa forma, possibilitando maior conhecimento biomecânico do tecido. Entretanto a segmentação do diagrama elástico de tecidos

moles representa um desafio particular, pois não há um ponto específico da curva onde se possa observar uma mudança clara de formato, como uma separação de duas fases distintas³⁹.

Ao longo deste estudo, ocorreram testes inválidos em 26,76% dos espécimes testados, uma percentagem elevada. O escorregamento do espécime das garras do aparelho foi a causa da maioria das falhas. Uma lixa colada à presilha, para aumentar o atrito, foi utilizada para tentar solucionar o problema. Alguns pesquisadores com a mesma dificuldade também utilizaram lixa¹⁸⁴; outros adotaram cola³⁹ ou, ainda, membrana plástica¹⁸⁵.

Como perspectiva futura, espera-se um aprimoramento técnico no sistema de garras, com componentes eletrônicos que possibilitem um cálculo preciso da pressão de prensão que possa ser uniforme para todos os testes, diminuindo o escorregamento ou a destruição do material nas suas extremidades presas. Quanto ao fragmento da aorta testado, haverá sempre certa limitação física na quantidade de material para estudo, o que não ocorre habitualmente com pesquisas na área da engenharia de materiais.

Em suma, os parâmetros biomecânicos de falência da aorta foram avaliados nos ratos diabéticos, nos ratos expostos à fumaça de cigarro e nos ratos diabéticos expostos à fumaça de cigarro. Este estudo com testes destrutivos uniaxiais apresenta limitações, mas fornece uma ampla quantidade de informações do comportamento biomecânico do tecido aórtico de rato exposto a diferentes fatores. Os achados permitirão o direcionamento de novas pesquisas nesta área, com isso, colaborando para a compreensão dos fatores que interferem nesta estrutura tão complexa e dinâmica que é a aorta.

6 CONCLUSÕES

As propriedades biomecânicas da parede da aorta de ratos relacionadas à resistência e elasticidade não apresenta diferença entre o grupo controle e os grupos diabético, tabagista e diabético tabagista.

As alterações histológicas relativas à contagem total e fragmentação das lâminas elásticas, deposição de matriz pericelular e perda/substituição celular na túnica média são significativas na parede da aorta dos ratos dos grupos diabético, tabagista e diabético tabagista em relação aos do grupo controle.

A atividade da metaloproteinase da matriz 2 na aorta de ratos diabéticos é menor que na aorta de ratos com diabetes e expostos à fumaça de cigarro.

Anexo A - Planilha de dados: peso e glicemia

Grupo controle

animal	peso inicial (g)	peso final (g)	glicemia inicial (mg/dL)	glicemia 30 dias após indução (mg/dL)	glicemia 60 dias após indução (mg/dL)	glicemia 90 dias após indução (mg/dL)	glicemia antes do sacrifício (mg/dL)
Rato C1	408	512	125	87	97	117	123
Rato C2	339	458	86	110	106	97	98
Rato C3	373	445	145	130	95	101	97
Rato C4	339	431	105	122	117	147	112
Rato C5	430	465	95	12	97	95	119
Rato C6	381	511	90	129	102	106	95
Rato C7	307	461	114	110	124	119	92
Rato C8	302	441	107	99	93	97	110
Rato C9	321	449	105	93	103	125	132
Rato C10	341	469	131	96	128	101	128
Rato C11	425	469	117	121	123	95	94
Rato C12	425	414	156	112	121	132	97
Rato C13	329	469	116	91	110	106	99
Rato C14	435	353	112	99	98	104	105
Rato C15	402	503	96	132	87	112	109
Rato C16	435	425	111	112	98	93	95
Rato C17	440	†	100	91	118	†	†

Grupo diabético

animal	peso inicial (g)	peso final (g)	glicemia inicial (mg/dL)	glicemia 7 dias após indução (mg/dL)	glicemia 30 dias após indução (mg/dL)	glicemia 60 dias após indução (mg/dL)	glicemia 90 dias após indução (mg/dL)	glicemia antes do sacrifício (mg/dL)
Rato D1	369	303	106	405	457	508	397	414
Rato D2	390	323	106	478	439	441	549	445
Rato D3	390	306	140	471	385	448	452	473
Rato D4	347	301	102	508	487	435	487	397
Rato D5	371	277	111	491	427	437	464	415
Rato D6	435	268	105	499	541	415	441	530
Rato D7	449	287	112	536	547	410	483	373
Rato D8	395	320	123	427	553	442	411	511
Rato D9	396	308	96	422	511	346	471	483
Rato D10	335	317	100	422	443	404	552	455
Rato D11	369	260	112	421	522	472	502	462
Rato D12	371	289	110	423	413	448	420	397
Rato D13	305	351	102	307	434	547	445	467
Rato D14	448	338	101	385	433	458	510	401
Rato D15	434	247	114	468	396	468	371	421
Rato D16	318	335	99	386	501	501	480	474
Rato D17	385	†	94	418	491	404	†	†
Rato D18	350	†	122	338	410	†	†	†

Grupo tabagista

animal	peso inicial (g)	peso final (g)	glicemia inicial (mg/dL)	glicemia 30 dias após indução (mg/dL)	glicemia 60 dias após indução (mg/dL)	glicemia 90 dias após indução (mg/dL)	glicemia antes do sacrifício (mg/dL)
Rato T1	401	424	124	88	95	87	97
Rato T2	354	446	92	98	116	95	104
Rato T3	387	399	126	121	98	97	128
Rato T4	418	375	110	124	97	136	91
Rato T5	414	377	98	97	87	101	110
Rato T6	360	510	112	126	95	92	98
Rato T7	385	461	97	96	113	117	92
Rato T8	307	488	105	101	120	121	117
Rato T9	450	355	99	99	89	126	109
Rato T10	303	509	110	103	131	118	98
Rato T11	328	468	117	93	111	94	92
Rato T12	302	427	127	98	119	93	114
Rato T13	440	333	112	103	97	121	103
Rato T14	439	444	122	122	125	89	109
Rato T15	357	422	94	111	90	121	98
Rato T16	314	526	93	93	105	112	100
Rato T17	356	336	104	87	98	117	104
Rato T18	420	438	107	120	89	95	123
Rato T19	390	458	94	98	123	92	98
Rato T20	439	424	112	114	115	118	93

Grupo diabético e tabagista

animal	peso inicial (g)	peso final (g)	glicemia inicial (mg/dL)	glicemia 7 dias após indução (mg/dL)	glicemia 30 dias após indução (mg/dL)	glicemia 60 dias após indução (mg/dL)	glicemia 90 dias após indução (mg/dL)	glicemia antes do sacrifício (mg/dL)
Rato DT1	352	330	96	361	476	459	434	461
Rato DT2	412	394	88	395	483	389	579	473
Rato DT3	303	300	132	401	506	459	394	411
Rato DT4	398	323	90	373	476	507	421	518
Rato DT5	343	280	101	391	495	501	533	318
Rato DT6	396	332	109	440	449	390	456	382
Rato DT7	369	235	112	450	392	322	482	371
Rato DT8	412	325	118	509	361	447	480	391
Rato DT9	369	263	110	518	360	526	340	438
Rato DT10	350	343	129	504	459	450	554	458
Rato DT11	405	325	120	492	402	359	486	468
Rato DT12	379	310	144	434	442	427	483	418
Rato DT13	405	306	135	427	449	389	545	408
Rato DT14	309	340	143	468	450	470	535	423
Rato DT15	306	321	116	385	561	542	457	453
Rato DT16	327	299	133	493	460	449	341	483
Rato DT17	438	251	129	482	462	447	447	393
Rato DT18	335	347	131	453	456	501	508	460
Rato DT19	425	340	90	455	458	543	420	505
Rato DT20	448	†	89	323	†	†	†	†

Anexo B - Planilha de dados: biomecânica

Animal	força (N)	estresse (N/cm ²)	tensão (N/cm)	deformação	failure strain energy (N/cm ²)
Rato C1	2,200	176,550	8,120	1,000	43,980
Rato C2	3,300	308,450	12,200	0,860	71,780
Rato C3	1,700	143,440	6,110	0,920	40,720
Rato C5	1,700	167,660	6,750	1,010	48,960
Rato C8	3,000	351,360	12,120	1,190	115,470
Rato C9	2,300	216,520	9,310	1,150	51,480
Rato C11	1,900	201,900	8,070	1,180	74,160
Rato C12	2,800	292,400	12,270	0,980	69,960
Rato C13	2,3	248,34	9,33	1	67,5
Rato C14	1,5	124,69	5,18	0,51	17,96
Rato C15	1,5	152	5,62	1,02	58,26
Rato D1	1,8	138,28	7,14	1,06	52,17
Rato D3	1,5	223,35	6,93	1,11	90,05
Rato D5	1,3	126,22	5,2	1,19	42,66
Rato D6	1,9	199,69	7,9	1,15	48,34
Rato D7	1,7	168,65	7,35	0,84	51,72
Rato D9	2	205,69	8,11	1,24	78,74
Rato D10	1,8	176,31	6,97	0,87	43,95
Rato D12	2,3	205,54	8,58	1,07	59,55
Rato D15	2,1	187,9	7,66	0,69	32,09
Rato D16	1,7	186,85	6,99	0,94	48,58
Rato T1	2,3	186,75	8,94	0,86	38,59
Rato T2	2	169,88	7,11	1,07	67,78
Rato T3	2	199,18	7,58	0,94	62,34
Rato T4	1,7	178,47	6,65	0,88	57,81
Rato T5	2,5	253,93	10,72	1,09	74,33
Rato T6	1,9	166,55	7,48	0,79	39,02
Rato T8	1,8	194,09	6,88	1,15	64,42
Rato T10	2,7	206,86	9,56	0,47	41,02
Rato T11	2	278,11	9,28	1,34	124,06
Rato T12	2,7	309,88	11,49	1,2	108,44
Rato T13	3,3	257,75	10,94	0,56	40,91
Rato T14	2,1	216,56	7,98	0,92	46,52
Rato T15	2,4	208,06	8,67	0,94	46,9
Rato T16	1,9	173,87	6,97	0,88	37,03
Rato T17	2,5	251,8	9,62	1	75,22
Rato T20	2	134,72	6,24	0,47	26,65
Rato DT1	2,700	373,700	13,060	2,250	253,500
Rato DT2	1,300	173,650	5,670	1,740	86,470
Rato DT5	1,600	190,000	6,680	1,210	75,550
Rato DT7	2,900	311,960	12,880	1,040	100,410
Rato DT8	1,500	160,790	6,740	1,040	61,000
Rato DT9	1,800	147,140	7,550	0,920	37,270
Rato DT11	1,900	220,940	7,870	1,160	99,490
Rato DT12	2,100	212,880	7,550	0,830	51,960
Rato DT13	1,9	172,93	6,58	0,8	43,85
Rato DT14	2,3	206,61	8,3	0,76	46,36
Rato DT15	1,5	166,69	5,95	0,98	47,45
Rato DT16	1,3	111,09	4,59	0,52	16,68
Rato DT17	1,6	152,64	6,18	0,99	37,55
Rato DT18	1,9	174,53	6,81	0,92	39,3
Rato DT19	1,9	191,44	7,49	0,64	30,5

Anexo C - Planilha de dados: razão adventícia/média

Animal	área interna da túnica adventícia (µm ²)	área externa da túnica média (µm ²)	área externa da túnica adventícia (µm ²)	área da média (µm ²)	área da adventícia (µm ²)	razão adventícia/média
Rato C1	347179,49	485323,14	666525,02	138143,7	181201,9	1,311692
Rato C2	254964,26	374072,51	606672,69	119108,3	232600,2	1,952847
Rato C5	462570,86	601283,76	837082,69	138712,9	235798,9	1,699906
Rato C6	378363,96	567384,06	826823,48	189020,1	259439,4	1,372549
Rato C8	510889,7	682844,12	940798,93	171954,4	257954,8	1,500135
Rato C10	420762,42	559102,03	750530,11	138339,6	191428,1	1,383755
Rato C11	479614,59	627543,1	816296,42	147928,5	188753,3	1,275977
Rato C14	359778,52	492959,77	744041,55	133181,3	251081,8	1,885264
Rato C16	397507,46	506829,89	705661,9	109322,4	198832	1,818767
Rato D1	351324,5	458280,78	631942,11	106956,3	173661,3	1,623667
Rato D3	360491,01	489027,23	658136,49	128536,2	169109,3	1,315655
Rato D5	222897,44	331612,81	540100,17	108715,4	208487,4	1,917736
Rato D7	375730,2	483577,59	640335,24	107847,4	156757,7	1,453514
Rato D8	425894,15	530376,13	724260,11	104482	193884	1,855669
Rato D9	353666,45	483097,27	664822,07	129430,8	181724,8	1,40403
Rato D10	394756,54	507968,91	741252,83	113212,4	233283,9	2,060587
Rato D14	386807,87	516376,08	736516,75	129568,2	220140,7	1,699033
Rato D15	384998,42	494540,77	713140,38	109542,4	218599,6	1,995572
Rato D16	411864,28	541464,98	753346,52	129600,7	211881,5	1,63488
Rato T2	456223,42	597175,5	832020,18	140952,1	234844,7	1,666131
Rato T3	435777,95	570833,61	801379,93	135055,7	230546,3	1,707047
Rato T4	332235,31	452645	608290,97	120409,7	155646	1,292637
Rato T5	254290,11	388827,65	620489,03	134537,5	231661,4	1,721909
Rato T7	259206,72	413034,73	652999,43	153828	239964,7	1,559955
Rato T10	258636,41	378216,99	611188,32	119580,6	232971,3	1,948237
Rato T12	352770,78	466411,81	624294,83	113641	157883	1,389314
Rato T13	379587,12	499526,07	699039,68	119939	199513,6	1,66346
Rato T14	286864,42	393850,22	606254,15	106985,8	212403,9	1,985347
Rato T16	395909,95	523560,62	702186,25	127650,7	178625,6	1,399332
Rato T18	327431,06	489128,94	738131,83	161697,9	249002,9	1,539927
Rato T20	538675,2	702433,86	949988,34	163758,7	247554,5	1,511703
Rato DT2	409962,18	518499,7	720805,23	108537,5	202305,5	1,863923
Rato DT4	389437,9	517772,3	797433,01	128334,4	279660,7	2,179156
Rato DT5	391010,92	512961,67	722308,49	121950,8	209346,8	1,716651
Rato DT8	365916,16	508868,31	716940,85	142952,2	208072,5	1,45554
Rato DT10	314664,29	433101,06	608045,49	118436,8	174944,4	1,477112
Rato DT11	431496,62	567383,52	776097,73	135886,9	208714,2	1,535941
Rato DT13	416059,88	556905,45	862020,36	140845,6	305114,9	2,166308
Rato DT14	442224,97	563502,1	780206,53	121277,1	216704,4	1,786853
Rato DT15	180307,81	313921,45	563147,46	133613,6	249226	1,865274
Rato DT16	324052,86	428125,88	594730,24	104073	166604,4	1,600841

Anexo D - Planilha de dados: contagem total de lâminas elásticas e fragmentação das lâminas elásticas intermediárias

Animal	contagem total de lâminas elásticas (UA)	frag. lâmina elástica interm. (UA)
Rato C1	7,833333	
Rato C2	8,333333	1,2
Rato C3	7,833333	1,2
Rato C4	7,5	1,2
Rato C5	7,666667	0,666667
Rato C6	8	2
Rato C7	7,333333	1,166667
Rato C8	7,142857	1,25
Rato C9	6,5	1,2
Rato C10	6	
Rato C11	6,285714	1,25
Rato C12	6,8	0,8
Rato C13	6,8	1
Rato C14	8,428571	2,2
Rato C15	6,857143	1,714286
Rato C16	6,285714	0,714286
Rato D1	7,5	2
Rato D2	7,75	2
Rato D3	8,25	1,75
Rato D4	7,75	1,8
Rato D5	7,8	2,2
Rato D6	7,25	2,666667
Rato D7	7	2,166667
Rato D8	8,333333	1,333333
Rato D9	7,833333	2,166667
Rato D10	8	2,2
Rato D11	8,4	2
Rato D12	7	2,166667
Rato D13	7,25	3,25
Rato D14	7	2,8
Rato D15	7,8	2,6
Rato D16	7,666667	2,666667
Rato T1	7,166667	3,166667
Rato T2	6,142857	3,5
Rato T3	7,142857	3,166667
Rato T4	6,857143	3,142857
Rato T5	7,142857	3,428571
Rato T6	7,25	3
Rato T7	6,833333	3,2
Rato T8	7	2,6
Rato T9	7,428571	3,5
Rato T10	7,2	3,333333
Rato T11	8,666667	2,666667
Rato T12	7,5	3
Rato T13	6,75	2,75
Rato T14	6,4	2,6
Rato T15	6,571429	2,5
Rato T16	6,8	4
Rato T17	7,666667	3,5
Rato T18	6,75	2,125
Rato T19	7,428571	2,285714
Rato T20	6,833333	3,333333
Rato DT1	7,5	2,5
Rato DT2	7,8	2
Rato DT3	7,333333	2,5
Rato DT4	8	2,833333
Rato DT5	8,166667	2,666667
Rato DT6	7	3
Rato DT7	7,25	3,25
Rato DT8	7,8	3,4
Rato DT9	8,4	3,333333
Rato DT10	8,2	3
Rato DT11	8,8	3,8
Rato DT12	7	2,75
Rato DT13	9,25	3,666667
Rato DT14	7,6	3
Rato DT15	8	2,666667
Rato DT16	7,6	3,5
Rato DT17	7	2,666667
Rato DT18	7,333333	3
Rato DT19	6,666667	3

Anexo E - Planilha de dados: matriz pericelular na túnica média e a perda/substituição celular na túnica média

Animal	matriz pericelular na túnica média (UA)	perda/substituição celular na túnica média (UA)
Rato C1	1,875	0,375
Rato C2	1,833333	0,333333
Rato C3	2,166667	0,333333
Rato C5	1,857143	0,285714
Rato C6	2	1
Rato C8	1,625	0,25
Rato C9	1,4	0,2
Rato C10	2	0,25
Rato C11	2	0,4
Rato C13	1,6	0,2
Rato C16	1	0
Rato D1	2	0,125
Rato D2	2	1
Rato D3	2,571429	0,857143
Rato D4	2	0,333333
Rato D5	2,125	1
Rato D6	1,166666667	0,166666667
Rato D7	1,428571429	0,5
Rato D8	1,285714286	0,285714286
Rato D9	1,5	1,375
Rato D10	1,714285714	0,428571429
Rato D14	1,8	1,2
Rato D15	1,333333333	0,166666667
Rato D16	1	0,666666667
Rato T1	3,125	2,375
Rato T2	3,428571	2,714286
Rato T3		
Rato T4	2,375	1,5
Rato T5	3,142857	1,571429
Rato T7	2	0,571428571
Rato T8	1,4	0,4
Rato T9	2,333333333	0,5
Rato T10	2	1
Rato T11	1,4	0,6
Rato T12	2	0,6
Rato T13	2,4	0,6
Rato T14	1,333333333	0,333333333
Rato T15	2,6	0,8
Rato T16	2,142857143	1,142857143
Rato T17	1,875	0,5
Rato T18	1,8	1,2
Rato T19	1,857142857	0,142857143
Rato T20	2,428571429	0,142857143
Rato DT2	2,428571	0,714286
Rato DT3	3	2,142857
Rato DT4	2,833333	2,333333
Rato DT5	3	1,666667
Rato DT6	2,8	2,2
Rato DT7	2,666666667	1,166666667
Rato DT8	2,25	0,5
Rato DT9	2,75	1,5
Rato DT10	3,2	1,8
Rato DT11	3,363636364	2,181818182
Rato DT12	3	1,5
Rato DT14	3,142857143	2
Rato DT17	3	2,333333333
Rato DT18	2,555555556	1,888888889
Rato DT19	3	1

Anexo F - Planilha de dados: MMP-2 (72 kDa e 64 kDa).

Animal	MMP-2 (72 kDa)	MMP-2 (64 kDa)
Rato C1	0,792177664	
Rato C2	0,789218429	0,071292045
Rato C6	0,63102303	0,159213568
Rato C7	0,667967753	0,130670073
Rato C13	0,792249854	0,060566013
Rato D1	0,821841362	0,085715463
Rato D5	0,529106579	
Rato D6	0,567520098	0,047032676
Rato D7	0,579337171	0,057292677
Rato D10	0,687623168	0,044069302
Rato D14	0,678405628	0,045888319
Rato T1	0,980541014	0,093788562
Rato T6	0,716427493	
Rato T7	0,572379455	0,05352352
Rato T13	0,814617863	0,167005296
Rato T14	0,8000214	0,124228593
Rato T15	0,629127011	0,090617447
Rato DT1	1,088649725	0,082636759
Rato DT2	0,76244973	
Rato DT3	0,941961986	0,154533887
Rato DT12	0,781335826	0,147400611
Rato DT13	0,664000258	0,079884499
Rato DT14	0,894325634	0,087753986
Rato DT15	0,9530049	0,141631051

8 REFERÊNCIAS

1. Johnston KW, Rutherford RB, Tilson MD, Shah DM, Hollier L, Stanley JC. Suggested standards for reporting on arterial aneurysms. *J Vasc Surg.* 1991;13(3):452-8.
2. Taylor LM, Porter JM. Basic data related to clinical decision-making in abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg.* 1987;1(4):502-4.
3. Diehm N, Dick F, Schaffner T, Schmidli J, Kalka C, Di Santo S, Voelzmann J, Baumgartner I. Novel insight into the pathobiology of abdominal aortic aneurysm and potential future treatment concepts. *Prog Cardiovasc Dis.* 2007;50(3):209-17.
4. Truijers M, Pol JA, SchultzeKool LJ, Sterkenburg van SM, Filingier MF, Blankensteijn JD. Wall stress analysis in small asymptomatic, symptomatic and ruptured abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2007;33(4):401-7.
5. Sandford RM, Bown MJ, London NJ, Sayers RD. The genetic basis of abdominal aortic aneurysms: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2007;33(4):381-90.

6. Gasser TC, Gorgulu G, Folkesson M, Swedenborg J. Failure properties of intraluminal thrombus in abdominal aortic aneurysm under static and pulsating mechanical loads. *J Vasc Surg*. 2008;48(1):179-88.
7. Puech-Leão P, Molnar LJ, Oliveira IR, Cerri GG. Prevalence of abdominal aortic aneurysms - a screening program in São Paulo, Brazil. *São Paulo Medical J*. 2004;122(4):158-160.
8. Dua MM, Dalman L. Hemodynamic influences on abdominal aortic aneurysm disease: application of biomechanics to aneurysm pathophysiology. *Vascul Pharmacol*. 2010;53(1-2):11-21.
9. Patel MI, Hardman DT, Fisher CM, Appleberg M. Current views on the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *J Am Coll Surg*. 1995;181(4):371-82.
10. Alcorn HG, Wolfson SK Jr, Sutton-Tyrrell K, Kuller LH, O'Leary D. Risk factors for abdominal aortic aneurysms in older adults enrolled in The Cardiovascular Health Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16(8):963-70.
11. Wanhainen A, Bergqvist D, Boman K, Nilsson TK, Rutegard J, Bjorck M. Risk factors associated with abdominal aortic aneurysm: a population-based study with historical and current data. *J Vasc Surg*. 2005;41(3):390-6.
12. Lindblad B, Borner G, Gottsater A. Factors associated with development of large abdominal aortic aneurysm in middle-aged men. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2005;30(4):346-52.

13. MacSweeney ST, Ellis M, Worrell PC, Greenhalgh RM, Powell JT. Smoking and growth rate of small abdominal aortic aneurysms. *Lancet*. 1994;344(8923):651-2.
14. Chang JB, Stein TA, Liu JP, Dunn ME. Risk factors associated with rapid growth of small abdominal aortic aneurysms. *Surgery*. 1997;121(2):117-22.
15. Lee AJ, Fowkes FG, Carson MN, Leng GC, Allan PL. Smoking, atherosclerosis and risk of abdominal aortic aneurysm. *Eur Heart J*. 1997;18(4):671-6.
16. Brown LC, Powell JT. Risk factors for aneurysm rupture in patients kept under ultrasound surveillance. UK Small Aneurysm Trial Participants. *Ann Surg*. 1999;230(3):289-96; discussion 296-7.
17. Vardulaki KA, Walker NM, Day NE, Duffy SW, Ashton HA, Scott RA. Quantifying the risks of hypertension, age, sex and smoking in patients with abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg*. 2000;87(2):195-200.
18. Lindholt JS, Heegaard NH, Vammen S, Fasting H, Henneberg EW, Heickendorff L. Smoking, but not lipids, lipoprotein(a) and antibodies against oxidised LDL, is correlated to the expansion of abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2001;21(1):51-6.
19. Blanchard JF, Armenian HK, Friesen PP. Risk factors for abdominal aortic aneurysm: results of a case-control study. *Am J Epidemiol*. 2000;151(6):575-83.

20. Shteinberg D, Halak M, Shapiro S, Kinarty A, Sobol E, Lahat N, Karmeli R. Abdominal aortic aneurysm and aortic occlusive disease: a comparison of risk factors and inflammatory response. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2000;20(5):462-5.
21. Marian AJ. On genetics, inflammation, and abdominal aortic aneurysm: can single nucleotide polymorphisms predict the outcome?. *Circulation.* 2001;103(18):2222-4.
22. Eriksson P, Jormsjo-Pettersson S, Brady AR, Deguchi H, Hamsten A, Powell JT. Genotype-phenotype relationships in an investigation of the role of proteases in abdominal aortic aneurysm expansion. *Br J Surg.* 2005;92(11):1372-6.
23. LaMorte WW, Scott TE, Menzoian JO. Racial differences in the incidence of femoral bypass and abdominal aortic aneurysmectomy in Massachusetts: relationship to cardiovascular risk factors. *J Vasc Surg.* 1995;21(3):422-31.
24. Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE, Chute EP, Litooy FN, Bandyk D, Krupski WC, Barone GW, Acher CW, Ballard DJ. Prevalence and associations of abdominal aortic aneurysm detected through screening. *Ann Intern Med.* 1997;126(6):441-9.
25. Jamrozik K, Norman PE, Spencer CA, Parsons RW, Tuohy R, Lawrence-Brown MM, Dickinson JA. Screening for abdominal aortic aneurysms: lessons from a population-based study. *Med J Aust.* 2000;173(7):345-50.

-
26. Mattes E, Davis TM, Yang D, Ridley D, Lund H, Norman PE. Prevalence of abdominal aortic aneurysms in men with diabetes. *Med J Aust.* 1997;166(12):630-3.
 27. Blanchard JF. Epidemiology of abdominal aortic aneurysms. *Epidemiol Rev.* 1999;21(2):207-21.
 28. Le MTQ, Jamrozik K, Davis TM, Norman P. Negative association between infra-renal aortic diameter and glycaemia: the health in men study. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2007;33(5):599-604.
 29. Schuppan D, Rühl M. Matrix in signal transduction and growth factor modulation. *Braz J Med Biol Res.* 1994;27(9):2125-41.
 30. Silver FH, Doillon CJ. *Biocompatibility: interactions of biological and implantable materials*. New York: VCH Publishers; 1989. v. 1.
 31. Silver FH, Christiansen DL, Buntin CM, Mechanical properties of the aorta: a review. *Crit Rev Biomed Eng.* 1989;17(4):323-58.
 32. Wissler RW. The arterial medial cell, smooth muscle, or multifunctional mesenchyme? *Circulation.* 1967;36(1):1-4.
 33. Yoshida Y, Mitsumata M, Yamane T, Tomikawa M, Nishida K. Morphology and increased growth rate of Atherosclerotic intimal smooth-muscle cells. *Arch Pathol Lab Med.* 1988;112(10):987-96.

34. Chamley-Campbell JH, Campbell GR, Ross R. Phenotype-dependent response of cultured aortic smooth muscle to serum mitogens. *J Cell Biol.* 1981;89(2):379-83.
35. Thyberg J, Palmberg L, Nilsson J, Ksiazek T, Sjolund M. Phenotype modulation in primary cultures of arterial smooth muscle cell: on the role of platelet derived growth factor. *Differentiation.* 1983;25(2):156-67.
36. Mecham RP, Heuser JE. The Elastic Fiber. In: HAY, E.D. (Ed.). Cell biology of extracellular matrix. 2 ed. New York: Plenum Press; 1991. p. 79-106.
37. Hay ED. Biogenesis and organization of extracellular matrix. *FASEB J.* 1999;13(Suppl 2):S281-3.
38. Jacob MP, Badier-Commander C, Fontaine V, Benazzoug Y, Feldman L, Michel JB. Extracellular matrix remodeling in the vascular wall. *Pathol Biol (Paris).* 2001;49(4):326-32.
39. Raghavan ML, Webster MW, Vorp DA. Ex vivo biomechanical behavior of abdominal aortic aneurysm: assessment using a new mathematical model. *Ann Biomed Eng.* 1996;24(5):573-82.
40. Longo GM, Xiong W, Greiner TC, Zhao Y, Fiotti N, Baxter BT. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest.* 2002;110(5):625-32.
41. Longo GM, Pehm JP, Mayhan WG, Baxter BT. Calcium-chloride-induced experimental aneurysms in mice. *Surg Forum.* 1999;450-1.

-
42. Freestone T, Turner RJ, Coady A, Higman DJ, Greenhalgh RM, Powell JT. Inflammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15(8):1145-51.
 43. Dobrin PB, Baker WH, Gley WC. Elastolytic and collagenolytic studies of arteries: implications for the mechanical properties of aneurysms. *Arch Surg.* 1984;119(4):405-9.
 44. Dobrin PB, Mrkvicka R. Failure of elastin or collagen as possible critical connective tissue alterations underlying aneurysmal dilatation. *Cardiovasc Surg.* 1994;2(4):484-8.
 45. Ohbayashi H. Matrix metalloproteinases in lung diseases. *Curr Protein Pept Sci.* 2002;3(4):409-21.
 46. Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(3):207-14.
 47. Donnelly R, Collinson DJ, Manning G. Hypertension, matrix metalloproteinases and target organ damage. *J Hypertens.* 2003;21(9):1627-30.
 48. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003;92(8):827-39.
 49. Farias E, Ranuncolo S, Cresta C, Specterman S, Armanasco E, Varela M, Lastiri J, Pallotta MG, Bal de Kier Joffe E, Puricelli L. Plasma metalloproteinase activity is enhanced in the euglobulin fraction of breast and lung cancer patients. *Int J Cancer.* 2000;89(4):389-94.

-
50. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999;274(31):21491-4.
 51. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res.* 2002;90(3):251-62.
 52. Tayebjee MH, Nadar S, Blann AD, Gareth Beevers D, MacFadyen RJ, Lip GY. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in hypertension and their relationship to cardiovascular risk and treatment: a substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT). *Am J Hypertens.* 2004;17(9):764-9.
 53. Yasumitsu H, Miyazaki K, Umenishi F, Koshikawa N, Umeda M. Comparison of extracellular matrix-degrading activities between 64-kDa and 90-kDa gelatinases purified in inhibitor-free forms from human schwannoma cells. *J Biochem.* 1992;111(1):74-80.
 54. Creemers EE, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen MJ. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ Res.* 2001;89(3):201-10.
 55. Zhang B, Ye S, Herrmann SM, Eriksson P, de Maat M, Evans A, Arveiler D, Luc G, Cambien F, Hamsten A, Watkins H, Henney AM. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation.* 1999;99(14):1788-94.

-
56. Carome MA, Striker LJ, Peten EP, Elliot SJ, Yang CW, Stetler-Stevenson WG, Reponen P, Tryggvason K, Striker GE. Assessment of 72-kilodalton gelatinase and TIMP-1 gene expression in normal and sclerotic murine glomeruli. *J Am Soc Nephrol*. 1994;5(6):1391-9.
 57. Newman KM, Malon AM, Shin RD, Scholes JV, Ramey WG, Tilson MD. Matrix metalloproteinases in abdominal aortic aneurysm: characterization, purification, and their possible sources. *Connect Tissue Res*. 1994;30(4):265-76.
 58. Li Z, Li L, Zielke H, Cheng L, Xiao R, Crow M, Stetler-Stevenson W, Froehlich J, Lakatta E. Increased expression of 72-kd type IV collagenase (MMP-2) in human aortic atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*. 1996;148(1):121-8.
 59. Bendeck MP, Zempo N, Clowes AW, Galaray RE, Reidy MA. Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat. *Circ Res*. 1994;75(3):539-45.
 60. Jenkins GM, Crow MT, Bilato C, Gluzband Y, Ryu WS, Li Z, Stetler-Stevenson W, Nater C, Froehlich JP, Lakatta EG, Cheng L. Increased expression of membrane- type matrix metalloproteinase and preferential localization of matrix metalloproteinase-2 to the neointima of balloon-injured rat carotid arteries. *Circulation*. 1998;97(1):82-90.
 61. Camp TM, Smiley LM, Hayden MR, Tyagi SC. Mechanism of matrix accumulation and glomerulosclerosis in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2003;21(9):1719-27.

-
62. Takagi H, Umemoto T. Smoking promotes pathogenesis of aortic aneurysm through the 5-lipoxygenase pathway. *Med Hypotheses*. 2005;64(6):1117-9.
 63. Takagi H, Umemoto T. How cigarette smoke accelerates abdominal aortic aneurysm. *J Am Coll Surg*. 2005;201(1):149-50.
 64. Wu G, Chen T, Shahsafaei A. Complement regulator CD59 protects against angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysms in mice. *Circulation*. 2010;121(11):1338-46.
 65. Ailawadi G, Eliason JL, Upchurch GR Jr. Current concepts in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg*. 2003;38(3):584-8.
 66. Keeling WB, Armstrong PA, Stone PA, Bandyk DF, Shames ML. An overview of matrix metalloproteinases in the pathogenesis and treatment of abdominal aortic aneurysms. *Vasc Endovascular Surg*. 2005;39(6):457-64.
 67. Yasmin SW, McEniery CM, Wallace S, Dakham Z, Pulsalkar P, Maki-Petaja K, Ashby MJ, Cockcroft JR, Wilkinson IB. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(2):372.
 68. Li ZZ, Dai QY. Pathogenesis of abdominal aortic aneurysms: role of nicotine and nicotinic acetylcholine receptors. *Mediators Inflamm*. 2012;2012:103120.
 69. Jaldin RG, Castardelli É, Perobelli JE, Yoshida WB, de Castro Rodrigues A, Sequeira JL, Paiva SA. Morphologic and biomechanical changes of thoracic and abdominal aorta in a rat model of cigarette smoke exposure. *Ann Vasc Surg*. 2013;27(6):791-800.

-
70. Rodella LF, Favero G, Rossini C, Foglio E, Reiter RJ, Rezzani R. Endothelin-1 as a potential marker of melatonin's therapeutic effects in smoking-induced vasculopathy. *Life Sci.* 2010;87(17-18):558-64.
 71. Izzotti A, Camoirano A, Cartiglia C, Tampa E, De Flora S. Formation of DNA adducts in the aorta of smoke-exposed rats, and modulation by chemopreventive agents. *Mutat Res.* 2001;494(1-2):97-106.
 72. Sun H, Zhong M, Miao Y, Ma X, Gong HP, Tan HW, Zhang Y, Zhang W. Impaired elastic properties of the aorta in fat-fed, streptozotocin-treated rats. Vascular remodeling in diabetic arteries. *Cardiology.* 2009;114(2):107-13.
 73. Mauer SM. Structural-functional correlations of diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 1994;45(2):612-22.
 74. Zhao JB, Lu X, Zhuang FY, Gregersen H. Biomechanical and morphometric properties of the arterial wall referenced to the zero-stress state in experimental diabetes. *Biorheology.* 2000;37(5-6):385-400.
 75. Astrand H, Ryden-Ahlgren A, Sundkvist G, Sandgren T, Lanne T. Reduced aortic wall stress in diabetes mellitus. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2007;33(5):592-8.
 76. Sonesson B, Hansen F, Stale H, Lanne T. Compliance and diameter in the human abdominal aorta - the influence of sex and age. *Eur J Vasc Surg.* 1993;7(6):690-7.

-
77. Paneni F, Beckman JA, Creager MA, Cosentino F. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *Eur Heart J*. 2013;34(31):2436-43.
 78. Guerin-Dubourg A, Cournot M, Planesse C, Debussche X, Meilhac O, Rondeau P, Bourdon E. Association between fluorescent advanced glycation end-products and vascular complications in type 2 diabetic patients. *Biomed Res Int*. 2017;2017:7989180.
 79. Raghavan ML. *Lectures notes on cardiovascular bio-solid mechanics section*. Iowa City: University of Iowa; 2002.
 80. Wolinsky H, Glagov S. Structural basis for the static mechanical properties of the aortic media. *Circ Res*. 1964;14:400-13.
 81. Sakalihasan N, Heyeres A, Nussgens BV, Limet R, Lapiere CM. Modifications of the extracellular matrix of aneurysmal abdominal aortas as a function of their size. *Eur J Vasc Surg*. 1993;7(6):633-7.
 82. Carmo M, Colombo L, Bruno A, Corsi FRM, Roncoroni L, Cuttin MS. Alteration of elastin, collagen and their cross-links in abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2002;23(6):543-9.
 83. Raghavan ML, Kratzberg J, Castro de Tolosa EM, Hanaoka MM, Walker P, da Silva ES. Regional distribution of wall thickness and failure properties of human abdominal aortic aneurysm. *J Biomech*. 2006;39(16):3010-6.

-
84. Raghavan ML, Hanaoka MM, Kratzberg JA, Higuchi ML, da Silva ES. Biomechanical failure properties and microstructural content of ruptured and unruptured abdominal aortic aneurysm. *J Biomech*. 2011;44(13):2501-7.
 85. Sincos IR, da Silva ES, Belczak SQ, Baptista Sincos AP, de Lourdes Higuchi M, Gornati V, Otoch JP, Aun R. Histologic analysis of stent graft oversizing in the thoracic aorta. *J Vasc Surg*. 2013;58(6):1644-1651.e4.
 86. Sincos IR, Aun R, Simão da Silva E, Belczak S, de Lourdes Higuchi M, Gornati VC, Gigglione PN, Baptista AP, de Figueiredo LF. Impact of stent- graft oversizing on the thoracic aorta: experimental study in a porcine model. *J Endovasc Ther*. 2011;18(4):576-84.
 87. Monteiro JAT, Simão da Silva E, Raghavan ML, Puech-Leão P, Higuchi MD, Otoch JP. Histologic, histochemical, and biomechanical properties of fragments isolated from the anterior wall of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 2014;59(5):1393-401.
 88. Ninomiya OH, Tavares Monteiro JA, Higuchi ML, Puech-Leão P, de Luccia N, Raghavan ML, da Silva ES. Biomechanical Properties and Microstructural Analysis of the Human Nonaneurysmal Aorta as a Function of Age, Gender and Location: An Autopsy Study. *J Vasc Res*. 2015;52(4):257-64.
 89. Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med*. 2005;22(4):359-70.
 90. Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest*. 1969 Nov;48(11):2129-39.

91. Forbes JM, Cooper ME, Thallas V, Burns WC, Thomas MC, Brammar GC, Lee F, Grant SL, Burrell LA, Jerums G, Osicka TM. Reduction of the accumulation of advanced glycation end products by ACE inhibition in experimental diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2002;51(11):3274-82.
92. Russo LM, Osicka TM, Brammar GC, Candido R, Jerums G, Comper WD. Renal processing of albumin in diabetes and hypertension in rats. *Am J Nephrol*. 2003;23(2):61-70.
93. Forbes JM, Thorpe SR, Thallas-Bonke V, Pete J, Thomas MC, Deemer ER, Bassal S, El-Osta A, Long DM, Panagiotopoulos S, Jerums G, Osicka TM, Cooper ME. Modulation of soluble receptor for advanced glycation end products by angiotensin-converting enzyme-1 inhibition in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(8):2363-72.
94. Thallas-Bonke V, Thorpe SR, Coughlan MT, Fukami K, Yap FY, Sourris KC, Penfold SA, Bach LA, Cooper ME, Forbes JM. Inhibition of NADPH oxidase prevents advanced glycation end product-mediated damage in diabetic nephropathy through a protein kinase C- α -dependent pathway. *Diabetes*. 2008;57(2):460-9.
95. Biselli PJ, Lopes FD, Moriya HT, Rivero DH, Toledo AC, Saldiva PH, Mauad T, Martins MA. Short-term exposure of mice to cigarette smoke and/or residual-oil fly ash produces proximal airspace enlargemnts and airway epithelium remodeling. *Braz J Med Biol Res*. 2011;44(5):460-8.

96. Toledo AC, Magalhaes RM, Hizume DC, Vieira RP, Biselli PJ, Moriya HT, Mauad T, Lopes FD, Martins MA. Aerobic exercise attenuates pulmonary injury induced by chronic exposure to cigarette smoke in mice. *Eur Respir J*. 2012;39(2):254-64.
97. Hizume DC, Toledo AC, Moriya HT, Saraiva-Romanholo BM, Almeida FM, Arantes-Costa FM, Vieira RP, Dolhnikoff M, Kasahara DI, Martins MA. Cigarette smoke dissociates inflammation and lung remodeling in OVA-sensitized and challenged mice. *Respir Physiol Neurobiol*. 2012;181(2):167-76.
98. Reddy GK. AGE-related cross-linking of collagen is associated with aortic wall matrix stiffness in the pathogenesis of drug-induced diabetes in rats. *Microvasc Res*. 2004;68(2):132-42.
99. Ayres M, Ayres Junior M, Ayres DL, Santos AAS. *BioEstat 3.0.: aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biomédicas*. Sociedade Civil Mamirauá: Belém; 2003.
100. Petrinec D, Liao S, Holmes DR, Reilly JM, Parks WC, Thompson RW. Doxycycline inhibition of aneurysmal degeneration in an elastase-induced rat model of abdominal aortic aneurysm: preservation of aortic elastin associated with suppressed production of 92 kD gelatinase. *J Vasc Surg*. 1996;23(2):336-46.
101. Slaiby JM, Ricci MA, Gadowski GR, Hendley ED, Pilcher DB. Expansion of aortic aneurysms is reduced by propranolol in a hypertensive rat model. *J Vasc Surg*. 1994;20(2):178-83.

102. Holmes DR, Petrincec D, Webster W, Thompson RW, Reilly JM. Indomethacin prevents elastase-induced abdominal aortic aneurysms in the rat. *J Surg Res.* 1996;63(1):305-9.
103. Steinmetz EF, Buckley C, Shames ML, Ennis TL, Vanvickle-Chavez SJ, Mao D, Goeddel LA, Hawkins CJ, Thompson RW. Treatment with simvastatin suppresses the development of experimental abdominal aortic aneurysms in normal and hypercholesterolemic mice. *Ann Surg.* 2005;241(1):92-101.
104. Fung YC. *Biomechanics: mechanical properties of living tissues*. 2 ed. New York: Springer; 1993.
105. Mendez JD, Ramos HG. Animal models in diabetes research. *Arch Med Res.* 1994;25(4):367-75.
106. Leahy JL, Bonner-Weir S, Weir GC. Abnormal glucose regulation of insulin secretion in models of reduced B-cell mass. *Diabetes.* 1984;33(7):667-73.
107. Dunn JS, McLetchie NG. Experimental alloxan diabetes in the rat. *Lancet.* 1943;245:384-7.
108. Goldner MG; Gomori G. Studies on the mechanism of alloxan diabetes. *Endocrinology.* 1944;35(4):241-8.
109. Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MV. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. *Cancer Chemother Rep.* 1963;29:91-8.
110. Junod A, Lambert AE, Orci L, Gonet AE, Renold AE. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1967;126(1):201-5.

-
111. Weide LG, Lacy PE. Low-dose streptozotocin-induced autoimmune diabetes in islet transplantation model. *Diabetes*. 1991;40(9):1157-62.
112. Bonner-Weir S, Trent DF, Honey RM, Weir GC. Responses of neonatal rat islets to streptozotocin. Limited B-cell regeneration and hyperglycemia. *Diabetes*. 1981;30(1):64-9.
113. Rossini AA, Like AA, Chick WL, Appel MC, Cahill GF. Studies of streptozotocin-induced insulinitis and diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977;74(6):2485-9.
114. Perloff JR, Levy MM, Ketchum RJ, Read AD, White D, Drayman KL. Streptozotocin-induced hyperglycemia in rats, analysis of complement activity after streptozotocin administration. *Transpl Proc*. 1995;27(6):3399.
115. West E, Simon OR, Morrison EY. A Streptozotocin alters pancreatic beta-cell responsiveness to glucose within six hours of injection into rats. *West Indian Med J*. 1996;45(2):60-2.
116. Griffith RB, Hancock R. Simultaneous mainstream smoke exposure systems I. Equipment and procedures. *Toxicology*. 1985;34(2):123-38.
117. Cendon SP, Battlehner C, Lorenzi Filho G, Dohnnikoff M, Pereira PM, Conceição GM, Beppu OS, Saldiva PH. Pulmonary emphysema induced by passive smoking: an experimental study in rats. *Braz J Med Biol Res*. 1997;30(10):1241-7.

-
118. Huh JW, Kim SY, Lee JH, Lee JS, Van Ta Q, Kim M, Oh YM, Lee YM, Lee SD. Bone marrow cells repair cigarette smoke-induced emphysema in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2011;301(3):L255-66.
119. Nikula KL, March TH, Seagrave J, Finch G, Barr E, Menache M, Hahn F, Hobbs C. A mouse model of cigarette smoke-induced emphysema. *Chest*. 2000;117(5 Suppl 1):246S-7S.
120. Xu L, Cai BQ, Zhu YJ. Pathogenesis of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease and therapeutic effects of glucocorticoids and N-acetylcysteine in rats. *Chin Med J (Engl)*. 2004;117(11):1611-9.
121. Zheng H, Liu Y, Huang, T, et al. Development and characterization of a rat model of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) induced by sidestream cigarette smoke. *Toxicol Lett*. 2009;189(3):225-34.
122. Jardim JR, Bizeto L, Fleig Mayer A, Camelier A, Rosa FW, Oliveira D, Azevedo D, Saldiva PH, Martins Mde A, Bonassa J, Nascimento AO. An inhalation chamber model for controlled studies of tobacco smoke toxicity in rodents. *Arch Bronconeumol*. 2010;46(9):455-8.
123. March TH, Green FH, Hahn FF, Nikula KJ. Animal models of emphysema and their relevance to studies of particle-induced disease. *Inhal Toxicol*. 2000;12(Suppl 4):155-87.
124. Zhang X, Zhang C, Sun Q, LI Dan, Luo R, Wan Z, Ye X. Infliximab protects against pulmonary emphysema in smoking rats. *Chin Med J (Engl)*. 2011;124(16):2502-6.

-
125. Buckley C, Wyble CW, Borhani M, Ennis TL, Koayashi DK, Curci JA. Accelerated enlargement of experimental abdominal aortic aneurysms in a mouse model of chronic cigarette smoke exposure. *J Am Coll Surg*. 2004;199(6):896-903.
126. Bergoeing MP, Arif B, Hackmann AE, Ennis TL, Thompson RW, Curci JA. Cigarette smoking increases aortic dilatation without affecting matrix metalloproteinase-9 and -12 expression in a modified mouse model of aneurysm formation. *J Vasc Surg*. 2007;45(6):1217-1227.
127. Quinn R. Comparing rat's to human's age: How old is my rat in people years? *Nutrition*. 2005;21(6):775-7.
128. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Tábua completa de mortalidade para o Brasil – 2015 Breve análise da evolução da mortalidade no Brasil. Disponível em <http://www.ibge.gov.br>.
129. Santilli SM, Fiegel VD, Aldridge DE, Knighton DR. The effect of diabetes on the proliferation of aortic endothelial cells. *Ann Vasc Surg*. 1992;6(6):503-10.
130. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414(6865):813-20.
131. Caprio S, Wong S, Alberti KG, King G. Cardiovascular complications of diabetes. *Diabetologia*. 1997;40(Suppl 3):B78-82.

-
132. Carson JL, Scholz PM, Chen AY, Peterson ED, Gold J, Schneider SH. Diabetes mellitus increases short-term mortality and morbidity in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40(3):418-23.
133. Lotufo PA, Gaziano JM, Chae CU, Ajani UA, Moreno-John G, Buring JE, Manson JE. Diabetes and all-cause and coronary heart disease mortality among US male physicians. *Arch Intern Med*. 2001;161(2):242-7.
134. Manson JE, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Krolewski AS, Rosner B, Arky RA, Speizer FE, Hennekens CH. A prospective study of maturity-onset diabetes mellitus and risk of coronary heart disease and stroke in women. *Arch Intern Med*. 1991;151(6):1141-7.
135. Orchard TJ, Dorman JS, Maser RE, Becker DJ, Drash AL, Ellis D, LaPorte RE, Kuller LH. Prevalence of complications in IDDM by sex and duration. Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study II. *Diabetes*. 1990;39(9):1116-24.
136. Rango P, Farchioni L, Fiorucci B, Lenti M. Diabetes and abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2014;47(3):243-61.
137. Candido R, Allen TJ, Lassila M, Cao Z, Thallas V, Cooper ME, Jandeleit-Dahm KA. Irbesartan but not amlodipine suppresses diabetes-associated atherosclerosis. *Circulation*. 2004;109(12):1536-42.

138. Mizushige K, Noma T, Yao L, Yu Y, Kiyomoto H, Hosomi N, Fukui T, Kimura S, Abe Y, Matsuo H. Effects of troglitazone on collagen accumulation and distensibility of aortic wall in prestage of non-insulin-dependent diabetes mellitus of Otsuka Long–Evans Tokushima Fatty rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000;35(1):150-5.
139. Tsuji T, Mizushige K, Noma T, Murakami K, Miyatake A, Kohno M. Improvement of aortic wall distensibility and reduction of oxidative stress by pioglitazone in pre-diabetic stage of Otsuka Long – Evans Tokushima fatty rats. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2002;16(5):429-34.
140. Jones SC, Saunders HJ, Pollock CA. High glucose increases growth and collagen synthesis in cultured human tubulointerstitial cells. *Diabet Med.* 1999;16(11):932-8.
141. Lam S, Verhagen NA, Strutz F, van der Pijl JW, Daha MR, van Kooten C. Glucose-induced fibronectin and collagen type III expression in renal fibroblasts can occur independent of TGF- β 1. *Kidney Int.* 2003;63(3):878-88.
142. Asbun J, Manso AM, Villareal FJ. (2005). Profibrotic influence of high glucose concentration on cardiac fibroblast functions: effects of losartan and vitamin E. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;288(1):H227-34.
143. Rittie L, Berton A, Monboisse JC, Hornebeck W, Gillery P. Decreased contraction of glycated lattices coincides with impaired matrix metalloproteinase production. *Biochem Biophys Res Comm.* 1999;264(2):488-92.

-
144. Kuzuya M, Asai T, Kanda S, Maeda K, Cheng X, Iguchi A. Glycation cross-links inhibit matrix metalloproteinase-2 activation in vascular smooth muscle cells cultured on collagen lattice. *Diabetologia*. 2001;44(4):433-6.
 145. Portik-Dobos V, Anstadt MP, Hutchinson J, Bannan M, Ergul A. Evidence for a matrix metalloproteinase induction/activation system in arterial vasculature and decreased synthesis and activity in diabetes. *Diabetes*. 2002;51(10):3063-8.
 146. Del Prete D, Anglani F, Forino M, Ceol M, Fioretto P, Nosadini R, Baggio B, Gambaro G. Down-regulation of glomerular matrix metalloproteinase-2 gene in human NIDDM. *Diabetologia*. 1997;40(12):1449-54.
 147. Thompson RW, Holmes DR, Mertens RA, Liao S, Botney MD, Mecham RP, Welgus HG, Parks WC. Production and localization of 92-kilodalton gelatinase in abdominal aortic aneurysms. An elastolytic metalloproteinase expressed by aneurysm-infiltrating macrophages. *Clin Invest*. 1995;96(1):318-26.
 148. Pyo R, Lee JK, Shipley JM, Curci JA, Mao D, Ziporin SJ, Ennis TL. Targeted gene disruption of metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest*. 2000;105(11):1641-9.
 149. Pearce WH, Shively VP. Abdominal aortic aneurysm as a complex multifactorial disease. Interactions of polymorphisms of inflammatory genes, features of autoimmunity, and current status of MMPs. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1085:117-32.

150. Fogelstrand L, Hulthe J, Hulten LM, Wiklund O, Fagerberg B. Monocytic expression of CD14 and CD18, circulating adhesion molecules and inflammatory markers in women with diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. *Diabetologia*. 2004;47(11):1948-52.
151. Ziegler D. Type 2 diabetes as an inflammatory cardiovascular disorder. *Curr Mol Med*. 2005;5(3):309-22.
152. Marfella R, D'Amico M, Esposito K, Baldi A, Di Filippo C, Siniscalchi M, Sasso FC, Portoghese M, Cirillo F, Cacciapuoti F, Carbonara O, Crescenzi B, Baldi F, Ceriello A, Nicoletti GF, D'Andrea F, Verza M, Coppola L, Rossi F, Giugliano D. The ubiquitin-proteasome system and inflammatory activity in diabetic atherosclerotic plaques: effects of rosiglitazone treatment. *Diabetes*. 2006;55(3):622-32.
153. Burke AP, Kolodgie FD, Zieske A, Fowler DR, Weber DK, Varghese PJ, Farb A, Virmani R. Morphologic findings of coronary atherosclerotic plaques in diabetics: a postmortem study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(7):1266-71.
154. Wesley RB, Meng X, Godin D, Galis ZS. Extracellular matrix modulates macrophage functions characteristic to atheroma: collagen type I enhances acquisition of resident macrophage traits by human peripheral blood monocytes in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18(3):432-40.
155. Lepidi S, Kenagy RD, Raines EW, Chiu ES, Chait A, Ross R, Clowes AW. MMP9 production by human monocyte-derived macrophages is decreased on polymerized type I collagen. *J Vasc Surg*. 2001;34(6):1111-8.

-
156. Soldatos G, Cooper ME. Advanced glycation end products and vascular structure and function. *Cuurr Hypertens Rep.* 2006;8(6):472-8.
157. Oxlund H, Rasmussen LM, Andreassen TT, Heickendorff L. Increased aortic stiffness in patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia.* 1989;32(10):748-52.
158. Andreassen TT, Seyer-Hansen K, Oxlund H, 1981. Biomechanical changes in connective tissues induced by experimental diabetes. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1981;98(3):432-6.
159. Andreassen TT, Oxlund H. Changes in collagen and elastin of the rat aorta induced by experimental diabetes and food restriction. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1987;115(3):338-44.
160. Hammond EC, Horn D. Smoking and death rates: report on forty-four months of follow-up of 187,783 men. II: death rates by cause. *J Am Med Assoc.* 1958;166(11):1294-308.
161. Shapiro SD. The pathogenesis of emphysema: the elastase: anti-elastase hypothesis 30 years later. *Proc Assoc Am Physicians.* 1995;107(3):346-52.
162. Shapiro SD. Proteinases in chronic obstructive pulmonary disease. *Biochem Soc Trans.* 2002;30(2):98-102.
163. Belvisi MG, Bottomley KM. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a therapeutic role for inhibitors of MMPs? *Inflamm Res.* 2003;52(3):95-100.

-
164. Bermudez EA, Rifai N, Buring JE, Manson JE, Ridker PM. Relation between markers of systemic vascular inflammation and smoking in women. *Am J Cardiol.* 2002;89(9):1117-9.
165. Zeidel A, Beilin B, Yardeni I, Mayburd E, Smirnov G, Bessler H. Immune response in asymptomatic smokers. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2002;46(8):959-64.
166. Gairola CG, Drawdy ML, Block AE, Daugherty A. Sidestream cigarette smoke accelerates atherogenesis in apolipoprotein E^{-/-} mice. *Atherosclerosis.* 2001;156(1):49-55.
167. Matetzky S, Tani S, Kangavari S, Dimayuga P, Yano J, Xu H, Chyu KY, Fishbein MC, Shah PK, Cercek B. Smoking increases tissue factor expression in atherosclerotic plaques: implications for plaque thrombogenicity. *Circulation.* 2000;102(6):602-4.
168. Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, Numaguchi Y, Kobayashi K, Lino S, Inden Y, Murohara T. Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(8):1442-7.
169. Dobrin PB. Pathophysiology and pathogenesis of aortic aneurysms. Current concepts. *Surg Clin North Am.* 1989;69(4):687-703.
170. Rumble JR, Cooper ME, Soulis T, Cox A, Wu L, Youssef S, Jasik M, Jerums G, Gilbert RE. Vascular hypertrophy in experimental diabetes. Role of advanced glycation end products. *J Clin Invest.* 1997;99(5):1016-27.

-
171. Mondy JS, Anstadt MP, Franga DL, Portik-Dobos V, Hutchinson J, Ergul A. Decreased vascular matrix metalloproteinase abundance in diabetic patients with symptomatic macroangiopathy. *Ethn Dis*. 2002;12(4):S3-18-22.
172. Clyman RI, McDonald KA, Kramer RH. Integrin receptors on aortic smooth muscle cells mediate adhesion to fibronectin, laminin, and collagen. *Circ Res*. 1990;67(1):175-86.
173. Messner B, Bernhard D. Smoking and cardiovascular disease: Mechanisms of endothelial dysfunction and early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(3):509-15.
174. Fuller JH, Stevens LK, Wang SL. Risk factors for cardiovascular mortality and morbidity: the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. *Diabetologia*. 2001;44(Suppl 2):S54-64.
175. Al-Delaimy WK, Willett WC, Manson JE, Speizer FE, Hu FB. Smoking and mortality among women with type 2 diabetes: The Nurses' Health Study cohort. *Diabetes Care*. 2001;24(12):2043-8.
176. Al-Delaimy WK, Manson JE, Solomon CG, Kawachi I, Stampfer MJ, Willett WC, Hu FB. Smoking and risk of coronary heart disease among women with type 2 diabetes mellitus. *Arch Intern Med*. 2002;162(3):273-9.
177. Cederholm J, Eeg-Olofsson K, Eliasson B, Zethelius B, Nilsson PM, Gudbjornsdottir S, Swedish National Diabetes Register. Risk prediction of cardiovascular disease in type 2 diabetes: a risk equation from the Swedish National Diabetes Register. *Diabetes Care*. 2008;31(10):2038-43.

178. Wight TN. Arterial wall. In: Copper, WD. (Ed.). *Extracellular matrix*. Academic Publishers: Amsterdam; 1996. p. 175-202.
179. Oxlund H, Andreassen TT. The roles of hyaluronic acid, collagen and elastin in the mechanical properties of connective tissues. *J Anat*. 1980;131(Pt 4):611-20.
180. Schmidt MB, Mow VC, Chun LE, Eyre DR. 1990. Effects of proteoglycan extraction on the tensile behavior of articular cartilage. *J Orthop Res*. 1990;8(3):353-63.
181. Inzoli F, Boschetti F, Zappa M, Longo T, Fumero R. Biomechanical factors in abdominal aortic aneurysm rupture. *Eur J Vasc Surg*. 1993;7(6):667-74.
182. Vorp DA. Biomechanics of abdominal aortic aneurysm. *J Biomech*. 2007;40(9):1887-902.
183. Vorp DA, Raghavan ML, Muluk SC, Makaroun MS, Steed DL, Shapiro R, Webster MW. Wall strength and stiffness of aneurysmal and nonaneurysmal abdominal aorta. *Ann N Y Acad Sci*. 1996;800:274-6.
184. He CM, Roach MR. The composition and mechanical properties of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 1994;20(1):6-13.
185. Xiong J, Wang SM, Zhou W, Wu JG. Measurement and analysis of ultimate mechanical properties, stress-strain curve fit, and elastic modulus formula of human abdominal aortic aneurysm and nonaneurysmal abdominal aorta. *J Vasc Surg*. 2008;48(1):189-95.