

**REMODELAMENTO VASCULAR EM CAMUNDONGOS
ATEROSCLERÓTICOS NA COEXISTÊNCIA DE
HIPERTENSÃO RENOVASCULAR 2R1C**

Breno Valentim Nogueira

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória – ES, 2005**

BRENO VALENTIM NOGUEIRA

**REMODELAMENTO VASCULAR EM CAMUNDONGOS
ATEROSCLERÓTICOS NA COEXISTÊNCIA DE
HIPERTENSÃO RENOVASCULAR 2R1C**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisição para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez

Vitória

2005

BRENO VALENTIM NOGUEIRA

**REMODELAMENTO VASCULAR EM CAMUNDONGOS
ATEROSCLERÓTICOS NA COEXISTÊNCIA DE
HIPERTENSÃO RENOVASCULAR 2R1C**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez (Orientador)

Profa. Dra. Silvana dos Santos Meyrelles (Co-Orientadora)

Prof. Dr. Carlos Alberto Redins (examinador interno)

Profa. Dra. Kelly Fabiane Santos Ricardo (examinador externo)

Vitória, ____ de _____ de ____.

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

N778r Nogueira, Breno Valentim, 1979-
Remodelamento vascular em camundongos ateroscleróticos
na coexistência de hipertensão renovascular 2R1C / Breno
Valentim Nogueira. – 2005.
141 f. : il.

Orientador: Elisardo Corral Vasquez.
Co-Orientadora: Silvana dos Santos Meyrelles.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito
Santo, Centro Biomédico.

1. Aterosclerose. 2. Hipertensão renovascular. 3. Sistema
renina-angiotensina. 4. Aorta. I. Corral Vasquez, Elisardo. II.
Meyrelles, Silvana dos Santos. III. Universidade Federal do
Espírito Santo. Centro Biomédico. IV. Título.

CDU: 612

Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.

Albert Einstein (1879-1955)

A Vida é um verdadeiro paradigma, que tentamos desvendar com curiosidade através da ciência.

Agradeço aos meus pais pela vida e espero que o sacrifício dos animais utilizados neste estudo não seja em vão.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao professor Vasquez, que para mim irrefutavelmente é o pai da ciência. Uma pessoa honrável, simples e que sempre buscou o caminho da justiça e da ciência. Tento seguir os seus passos, mas há ainda um longo caminho pela frente.

A professora Silvana, pelo acolhimento, orientações e puxões de orelha para o andamento do trabalho.

Ao professor Redins, pela atenção e disponibilidade em ensinar a histologia e discutir as diferentes técnicas de análise.

AGRADECIMENTOS

A minha Família. Aos meus pais, e irmãos. Vocês me transformaram na pessoa que sou hoje, e este momento também pertence a vocês. Às vezes meus irmãos atrapalhavam com o vício do jogo no CPU, mas no final eles me deixaram trabalhar. A Lê (Leandra), que soube me incentivar e dar apoio quando necessário. Você é uma pessoa especial na minha vida!

A Verônica Peotta, também conhecida como Mãe Vera por pegar no pé! Brincadeira! Quebramos um pouco a cabeça, mas esse experimento foi também fruto do seu extenuante trabalho. Acabei me tornando seu *scavenger*.

Aos amigos do LTCC: Ao mano e futuro pastor Thiago, Ágata amiga que sempre está disposta a ajudar que sofreu grandes transformações neste período de convivência, a minha irmã mais velha de coração de ouro Robéria pelas conversas e sabedoria transmitida nos momentos de dificuldade e alegrias. Aos demais colegas: Adriana, Camile, Débora, ao alegre professor colaborador Ian, Lídia, Maíne, Michele, aos pesquisadores da clínica e demais colegas que passaram pelo laboratório.

Ao Casal 20 Airton e Robéria, que possuem um novo membro na família. Airton Obrigado pelos artigos e atenção dada, pode ter certeza que influenciou grande parte deste trabalho.

A professora Maria Tereza pelo incentivo a pesquisa e por me mostrar onde fica o centro da ciência no Estado, no Curso de Verão da Fisiologia.

Ao professor Dr. Carlos Musso, guardo suas ótimas aulas até hoje (talvez um pouco mais do que 30%) e por isso acabava não estudando para suas provas. Obrigado pela permissão de uso do criostato do Dept. de Patologia, juntamente com o Prof. Fausto e seus alunos Alex – ensinamentos do Image J – e Robson.

Aos demais professores (primo Dalton, Profa. Margareth, Profa. Cláudia) e amigos da UFES (Roger, Luciana, etc.). Aos funcionários do PPGCF (Fonseca, Cláudia, Maria).

As fisioterapeutas: Grace Kelly e Wanize Rocha. Kelly pela oportunidade de lecionar, e Wanize pelos primeiros contatos com a morfometria.

Ao Prof. Mill, que me proporcionou colegas na FIOCRUZ – Salvador, Prof. Ricardão e Ricardinho, a Prof. Milena e Juliana. Da UFRJ – Alex Balduino e Profa. Christina Takia.

A Sueli, do laboratório do Prof. Redins, pelo empréstimo do corante *Verhoeff*.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

	Página
Lista de Figuras e Tabelas.....	9
Lista de Abreviaturas.....	12
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Epidemiologia e Fatores de Risco.....	18
1.2 Morfologia Vascular.....	19
1.3 Aterosclerose.....	22
1.31 Fluxo e Aterosclerose.....	23
1.3.2 Hipercolesterolemia e Modificação dos Lipídios.....	25
1.3.3 Patogenia.....	27
1.4 Hipertensão Renovascular.....	30
1.5 Remodelamento Arterial.....	32
1.6 Camundongos – Modelos Animais.....	37
2 OBJETIVOS.....	40
2.1 Objetivo Geral.....	41
2.2 Objetivos Específicos.....	41

3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.1 Animais Experimentais.....	44
3.2 Produção da Hipertensão Renovascular (2 Rins-1 Clipe)...	45
3.3 Instrumentação para Medidas Hemodinâmicas.....	46
3.4 Histoquímica.....	47
3.5 Análise Morfométrica.....	51
3.6 Medidas de tensão e estresse de parede.....	55
3.7 Análise Estatística.....	56
3.8 Protocolo Experimental.....	57
4 RESULTADOS.....	59
4.1 Valores Basais de Pressão Arterial Média e de Frequência Cardíaca em Camundongos com Hipertensão Experimental Renovascular 2R1C.....	60
4.2 Área de Secção Transversal Vascular (AST_v).....	62
4.3 Área de Secção Transversal da Luz Vascular (AST_L).....	64
4.4 Área de Secção Transversal da Parede Vascular (AST_p)....	66
4.5 Relação Parede:Luz (P:L).....	67
4.6 Razão ou Índice de Remodelamento (RR).....	68
4.7 Área Transversal de Deposição de Lipídios na Parede Vascular (AST_{Lip}).....	69
4.8 Tensão de Parede (T).....	70
4.9 Estresse de Parede (σ).....	70

4.10 Achados Morfológicos.....	71
4.10.1 C57-<i>Sham</i>.....	71
4.10.2 C57-2R1C.....	72
4.10.3 ApoE-<i>Sham</i>.....	73
4.10.4 ApoE-2R1C.....	74
5 DISCUSSÃO.....	78
6 CONCLUSÃO.....	96
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
ANEXOS.....	133

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

	Página
Figura 1: Corte transversal de aorta torácica humana, indicando as camadas ou túnicas vasculares e grande rede de fibras elásticas (orceína).	21
Figura 2: Classificação das lesões ateroscleróticas humanas segundo a <i>American Heart Association</i> .	30
Figura 3: Relação entre o tamanho do vaso (AST_v) e o lúmen (AST_L) com desenvolvimento de placa ateromatosa, determinando o remodelamento vascular.	34
Figura 4: Remodelamento vascular segundo AST_M , razão p:l e área do lúmen.	36
Figura 5: A e B mostram a dimensão do clipe em relação a uma escala milimetrada; C mostra o clipe implantado na artéria renal esquerda.	46
Figura 6: Sistema de perfusão sob pressão controlada.	48
Figura 7: Coração e aorta com a delimitação da região selecionada para a realização dos cortes.	49
Figura 8: Microscópio trinocular.	51
Figura 9: Diâmetros externos e internos para determinação da AST.	53
Figura 10: Imagens mostrando a análise da área de deposição lipídica.	55
Figura 11: Valores basais de pressão arterial média (mm Hg) e de frequência cardíaca (bpm).	61
Figura 12: Área de secção transversa vascular do arco aórtico.	62
Figura 13: Fotos de cortes transversais típicos da aorta dos camundongos C57BL/6 e apoE ^{-/-} normotensos e hipertensos.	63
Figura 14: Diâmetros para a determinação da AST_v .	64
Figura 15: Área de secção transversal do lúmen do arco aórtico.	65
Figura 16: Diâmetros para a determinação da AST_L .	66

Figura 17: Área de secção transversal da parede vascular.	67
Figura 18: Área transversal de deposição de lipídios na parede vascular.	69
Figura 19: Histologia de animal C57- <i>Sham</i> coloração <i>Oil-Red-O</i> .	71
Figura 20: Túnicas vasculares do animal C57- <i>Sham</i> , coloração HE.	72
Figura 21: Achados morfológicos em segmento da aorta do grupo C57-2R1C.	72
Figura 22: Histologia de animal apoE- <i>Sham</i> coloração <i>Oil-Red-O</i> .	73
Figura 23: Histologia de animal apoE- <i>Sham</i> , mostrando a associação entre ruptura da lâmina elástica interna e células espumosas.	73
Figura 24: Histologia de animal apoE- <i>Sham</i> coloração Verhoeff-floxina.	74
Figura 25: Seqüência de ampliação de duas lesões ateroscleróticas de um animal apoE-2R1C.	74
Figura 26: Histologia de animal apoE-2R1C mostrando a adesão de leucócitos na parede vascular.	75
Figura 27: Histologia de animal apoE-2R1C mostrando a adesão de leucócitos na parede vascular com maior detalhe.	75
Figura 28: Histologia das lesões ateroscleróticas de animal apoE-2R1C.	76
Figura 29: Histologia de placa ateroscleróticas em animal apoE-2R1C, e hipertrofia da camada média.	77
Figura 30: Histologia de animal apoE-2R1C mostrando ruptura da lâmina elástica e áreas de hipertrofia da camada média.	77
Tabela 1: Terminologia do Remodelamento Arterial	34
Tabela 2: Razão parede:luz (p:l)	68
Tabela 3: Índice de Remodelamento Vascular (RR)	68
Tabela 4: Tensão de Parede (T)	71
Tabela 5: Estresse de Parede (σ)	72

Organograma: Organograma mostrando a divisão dos grupos experimentais 45

LISTA DE ABREVIATURAS

- 1R1C: um rim, um clipe
- 2R1C: dois rins, um clipe
- Ang-1-7: angiotensina 1-7
- Ang II: angiotensina II
- ANOVA: análise de variância
- apoA: apolipoproteína (apoproteína) A
- apoB-100: apolipoproteína (apoproteína) B-100
- apoE: apolipoproteína E
- apoE^{-/-}: camundongo deficiente (*knockout*) homocigoticamente para apolipoproteína E
- AST_L: área de secção transversal do lúmen
- AST_{lip}: área de secção transversal de lipídios
- AST_M: área de secção transversal da camada média
- AST_p: área de secção transversal da parede (média-íntima)
- AST_v: área de secção transversal do vaso
- bpm: batimentos por minuto
- bFGF: fator de crescimento dos fibroblastos básico - *basic fibroblast growth factor*
- C57BL/6: linhagem de camundongo C57 black/6
- °C: grau Celsius
- cm H₂O: centímetros de água
- CCR2: receptor para MCP-1
- ECA: enzima conversora de angiotensina
- EPM: erro padrão da média
- *et alii*: e colaboradores
- FC: frequência cardíaca
- G-CSF: fator estimulador de colônia para granulócitos
- HAS: hipertensão arterial sistêmica
- HE: coloração por hematoxilina-eosina
- HDL: lipoproteína de alta densidade – *high density protein*

- ICAM-1: molécula de adesão intercelular do tipo 1
- IL-1: interleucina 1
- IL-6: interleucina 6
- i.p.: intraperitônio
- MCP-1: proteína quimiotática para monócitos 1
- M-CSF: fator estimulador de colônia para macrófagos
- mg: miligrama
- mm: milímetros
- mm Hg: milímetros de mercúrio
- μm : micrômetro
- MMP: metaloproteinase
- NF- κ B: fator nuclear kappa B
- NO: óxido nítrico
- Ox-LDL: lipoproteína de baixa densidade oxidada
- PAM: pressão arterial média
- p:l: razão (ou relação) parede-luz
- PDGF: fator de crescimento derivado das plaquetas - *platelet-derived growth factor*
- RR: razão ou índice de remodelamento
- SC: subcutâneo
- σ : estresse de parede
- SRA: sistema renina-angiotensina
- TNF- α : fator de necrose tumoral α
- TGF- β : fator de crescimento transformador β
- T: tensão de parede
- VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade – *very low density protein*
- VCAM-1: molécula de adesão celular vascular do tipo 1

PREMIAÇÕES DESTE TRABALHO

Prêmio Jovem Investigador: Menção Honrosa

Apresentação Oral:

NOGUEIRA, B. V. ; PEOTTA, V. A. ; REDINS, C. A. ; MEYRELLES, S. S. ; VASQUEZ, E. C. . Análise Morfométrica do Arco Aórtico em Camundongos Transgênicos para Aterosclerose Associada com Hipertensão Renovascular. In: I Encontro Científico de Ciências da Saúde, 2004, Vitória, ES. I Encontro Científico de Ciências da Saúde, 2004.

Apresentação Oral:

NOGUEIRA, B. V. ; PEOTTA, V. A. ; REDINS, C. A. ; MEYRELLES, S. S. ; VASQUEZ, E. C. . Morphometric Analysis of the Aortic Arch in Apolipoprotein E-Deficient Mice (ApoE^{-/-}) Associated with Two-Kidney One-Clip Hypertension. In: XVIth Scientific Meeting of the Interamerican Society of Hypertension, 2005, Cancún, México. XVIth Scientific Meeting of the Interamerican Society of Hypertension, 2005.

RESUMO



RESUMO

O camundongo *knockout* para apolipoproteína E (apoE^{-/-}) é um modelo para hipercolesterolemia e aterosclerose, cujas lesões se localizam principalmente nas grandes artérias. Sabe-se também que este processo é afetado pela angiotensina II. Por isto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da aterosclerose e da hipertensão renovascular sobre a morfologia do arco aórtico, um dos sítios das terminações barorreceptoras.

Camundongos, machos, 12-14 semanas de idade, C57 e apoE^{-/-} foram submetidos a estenose da artéria renal, para produção da hipertensão 2-rins e 1-clipe (2R1C; n=11 por grupo) e comparados com os respectivos controles (*Sham*, n=11 por grupo). Após 28 dias, a pressão arterial média (PAM), no animal acordado, foi maior nos grupos C57-2R1C e apoE-2R1C (128±3 e 126±3 mmHg) do que nos seus controles (103±2 e 104±2 mmHg, p<0,01, ANOVA). Em seguida, os animais foram sacrificados e perfundidos, sob pressão equivalente à PAM de cada animal. A área de secção transversa do arco aórtico foi maior no grupo C57-2R1C (0,75±0,05 mm²) do que no grupo C57-*Sham* (0,65±0,02 mm², p<0,01, ANOVA), enquanto que no grupo apoE-2R1C verificou-se uma tendência a maiores valores do que nos apoE-*Sham* (0,73±0,03 vs. 0,68±0,04 mm²) e um aumento significativo quando comparado com os C57-*Sham* (p<0,05, ANOVA). A área de parede vascular também foi maior nos grupos hipertensos (C57: 0,18±0,01 e apoE: 0,19±0,01 mm²) do que nos grupos controles (C57: 0,15±0,01 e apoE: 0,17±0,01 mm², p<0,05, ANOVA). A área do lúmen apresentou valores que seguiram o mesmo padrão da área de secção transversa.

Os dados indicam que a hipertensão 2R1C, por si só, causa um remodelamento positivo (alargamento compensatório) no arco aórtico de camundongos C57. Além de que no estágio inicial da aterosclerose, a associação desta hipertensão agrava o processo de remodelamento de maneira significativa quando comparado com o controle C57.

ABSTRACT



ABSTRACT

ApoE^{-/-} knockout mouse is a model for studies of hypercholesterolemia, which is characterized by developing atherosclerotic lesions mainly in great arterial vessels such as the aortic arch, which is a site of baroreceptor nerve endings. In addition, it is known that angiotensin affects the atherosclerotic process and baroreflex sensitivity. Thus, the aim of this study was to evaluate morphological changes in the aortic arch in ApoE^{-/-} mice with renovascular hypertension.

Male (12-14 weeks old) C57 and ApoE^{-/-} mice received a clip (0.12mm) on the renal artery to induce renovascular hypertension (C57-HT, N=11; ApoE-HT, N=11) and were compared with age-matched sham mice (C57-Sham, N=11; ApoE-Sham, N=11). After 28 days, mean arterial pressure (MAP) measured in conscious animals was higher in C57-HT and ApoE-HT (128±3 and 126±3 mmHg) than in their respective controls (103±2 and 104±2 mmHg, p<0.05). The animals were euthanized and perfused with a fixative solution at pressure equal to the MAP observed in each animal. The cross section area of the aortic arch was greater in C57-HT and ApoE-HT (0.76±0.05 and 0.73±0.03 mm²) than in their respective controls (0.64±0.02 and 0.63±0.03 mm², p<0.05). The wall vessel area was also greater in these hypertensive groups (0.18±0.01 and 0.19±0.01 mm²) than in the normotensive groups (0.15±0.01 and 0.17±0.01 mm², p<0.05). Consequently, the lumen vessel area followed the same results.

In conclusion, our data indicate that at least at the early stage of atherosclerosis the remodeling process is not yet observed in the ApoE^{-/-} mouse. Renovascular hypertension by itself leads to a positive remodeling of the aortic arch, which is aggravated by the association with atherosclerosis when compared with the C57 control.

1- INTRODUÇÃO

1 Introdução

A aterosclerose é a principal causa de morte nas sociedades dos países Ocidentais e em muitos países da Ásia. Essa é uma doença cardiovascular complexa, que resulta da interação entre múltiplos fatores genéticos e ambientais, tais como a hipercolesterolemia e a hipertensão arterial sistêmica (HAS) (Wilson, 1994; Braunwald, 1997; Ross, 1999; Balaguer, 2004). Entretanto os mecanismos da aterosclerose e da HAS e suas alterações no organismo não estão totalmente compreendidos. Sabe-se que tanto a aterosclerose quanto a HAS promovem o remodelamento vascular (Glagov *et alii*, 1987; Baumbach & Heistad, 1989; Levy *et alii*, 1991). Além de que, o remodelamento vascular, decorrente das alterações na estrutura vascular frente a estímulos dessas doenças, correlaciona-se positivamente com diversos eventos cardiovasculares, como angina, ruptura de placa, infarto do miocárdio e morte súbita (Ward *et alii*, 2000; Jormsjö *et alii*, 2002; Pasterkamp & Smits, 2002).

1.1 Epidemiologia e Fatores de Risco

A prevalência e a gravidade da aterosclerose entre indivíduos e grupos estão relacionadas com diversos fatores alguns constituintes do indivíduo (idade, sexo e fatores genéticos) e outros adquiridos. Os fatores de risco que predis põem à aterosclerose e cardiopatia isquêmica estão descritos em diversos estudos como sendo a hipercolesterolemia, hipertensão arterial, *diabetes mellitus*, tabagismo, história familiar, hipertrigliceridemia, hiper-homocisteinemia e infecções por vírus e bactérias intracelulares (Neaton *et alii*, 1992; Lewington *et alii*, 2002, Guimarães, 2003; Favarato & Luz, 2003; Higuchi *et alii*, 2003). Dentre os estudos prospectivos destacam-se mais notavelmente o estudo de Framingham (Massachusetts) e o *Multiple Risk Factor Intervention Trial* (MRFIT) (Balaguer, 2004). O *British Regional Heart Study* (BRHS), que acompanhou por 10 anos 6.513 homens ingleses, reafirma que os fatores de risco mais importantes para o surgimento da aterosclerose são em ordem decrescente: a hipercolesterolemia, a hipertensão arterial e o tabagismo (Emberson *et alii*, 2003). Há demonstrações epidemiológicas claras de que a hipertensão e a hipercolesterolemia são

os fatores de risco que mais prevalecem em portadores de aterosclerose. Em países ocidentais do hemisfério norte há predomínio de hipercolesterolemia (Cotran *et alii*, 2000; Favarato & Luz, 2003; Emberson *et alii*, 2003), enquanto que no Brasil, há predomínio da HAS (Santos *et alii*, 1994; Mansur *et alii*, 1997).

A hiperlipidemia é reconhecida como importante fator de risco para a aterosclerose, sendo que as maiores evidências apontam mais especificamente para hipercolesterolemia. O principal componente do colesterol sérico total associado a um risco aumentado é o colesterol das lipoproteínas de baixa densidade (LDL – *low density lipoprotein*). Deficiências genéticas envolvendo o receptor da LDL em qualquer uma de suas etapas metabólicas levam a *hipercolesterolemia familiar*, de modo que os níveis elevados de colesterol induzem a aterosclerose prematura e aumentando o risco de infarto do miocárdio (Hobbs *et alii*, 1990; Goldstein & Brown, 1992; Garcia *et alii*, 2001). Em contraste, há uma relação inversa entre a aterosclerose sintomática e os níveis de proteína de alta densidade (HDL – *high density lipoprotein*). Os níveis aumentados de HDL estão relacionados ao menor risco de cardiopatia isquêmica. Acredita-se que a HDL tenha a capacidade de mobilizar o colesterol do ateroma em desenvolvimento e estabelecido, transportando para o fígado para sua excreção na bile. Portanto, a HDL participa do transporte reverso do colesterol, explicando assim a sua designação de “*colesterol bom*”. Sabe-se que o exercício e o consumo moderado de etanol elevam os níveis de HDL, enquanto que a obesidade e o tabagismo os reduzem (Cotran *et alii*, 2000).

1.2 Morfologia Vascular

Didaticamente, os vasos arteriais são divididos, de acordo com o calibre crescente, em arteríolas, artérias de médio calibre ou musculares e artérias de grande calibre ou elásticas. Mas os diferentes vasos apresentam características peculiares de sua estrutura, havendo uma transição gradual de um tipo para outro. Com exceção dos capilares, a partir de certo aumento de calibre todos os vasos sanguíneos são formados por três camadas celulares distintas: a túnica íntima, média e adventícia. A camada íntima apresenta uma camada de células endoteliais que reveste a superfície interna do

vaso. Este endotélio se apóia na camada subendotelial, que consiste em tecido conjuntivo frouxo, muito delicado, e que ocasionalmente apresenta células musculares lisas esparsas. Nas artérias, a camada íntima apresenta ainda a lâmina elástica interna, que é a camada mais externa da íntima, separando-a da média. A lâmina elástica interna é fenestrada para permitir a difusão de nutrientes do sangue para as células situadas externamente na parede arterial. Devido ao desaparecimento da pressão sanguínea e à contração dos vasos no momento da morte, a túnica íntima das artérias geralmente se apresenta nos cortes com aspecto ondulado. A túnica média é formada principalmente por células musculares lisas, dispostas circularmente, às quais se agregam quantidades variáveis de fibras elásticas, fibras reticulares (colágeno tipo III) e proteoglicanas, sintetizados pelas mesmas. Nas artérias, a média possui também uma lâmina limitante elástica externa, que a separa da túnica adventícia. A túnica adventícia é formada principalmente por tecido conjuntivo, com fibroblastos, fibras colágenas (colágeno tipo I) e elásticas. A camada adventícia se continua gradativamente com o tecido conjuntivo dos órgãos vizinhos. Os vasos de grande calibre apresentam os *vasa vasorum* (vasos dos vasos), que são arteríolas, capilares e vênulas que se ramificam profusamente e desempenham função nutridora das túnicas adventícia e média, onde os nutrientes e sangue não chegariam por difusão a partir da luz do vaso, devido à grande espessura da parede. O *vasa vasorum* ocorre com menor freqüência nas artérias do que nas veias, atingindo a adventícia e apenas parte da túnica média (Junqueira & Carneiro, 1999).

As artérias elásticas são a aorta e seus grandes ramos, como as ilíacas e carótidas. Têm cor amarelada devido ao acúmulo de elastina na túnica média, a túnica íntima apresenta-se muito espessa, devido ao grande desenvolvimento da camada subendotelial, rica em fibras elásticas, quando comparada com outros vasos. A membrana elástica interna não é evidente, pois se confunde com as membranas da camada seguinte. A túnica média é formada por uma série de membranas elásticas perfuradas, dispostas concêntricamente. Estas membranas estão intercaladas por células musculares lisas, fibras colágenas, proteoglicanas e glicoproteínas. As lâminas elásticas aumentam de número e de espessura durante o crescimento. Não se pode distinguir com exatidão a membrana elástica externa. A camada adventícia é

relativamente pouco desenvolvida. A grande quantidade de lâminas elásticas na túnica média permite a regulação do fluxo sanguíneo, uma vez que sangue ejetado durante a sístole ventricular distende o tecido elástico sob o impacto das mais altas pressões sanguíneas do sistema, e durante a diástole o recuo elástico impulsiona o sangue. Além da manutenção dos níveis de pressão diastólica como consequência dessa ação, o fluxo e a pressão arterial se tornam cada vez mais regulados à medida que o sangue se distancia do coração.

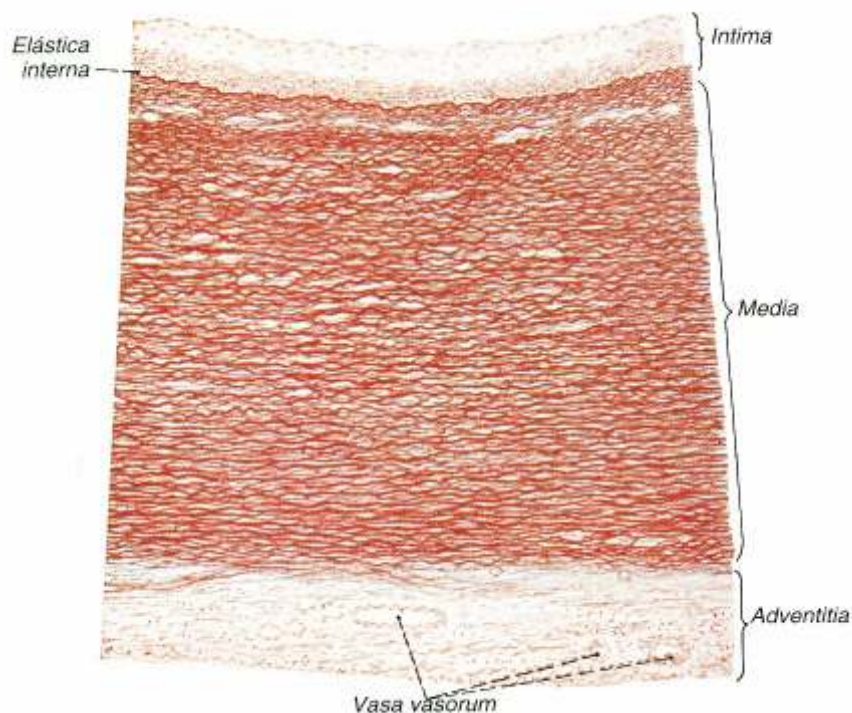


Figura 1: Corte transversal de aorta torácica humana, tratado por uma coloração para fibras elásticas (orceína), no aumento de 60x. Observe as três camadas que constituem a parede da artéria: 1. camada íntima, 2. camada média, 3. camada adventícia, composta por tecido conjuntivo (notar a presença de *vasa vasorum*). As lâminas elásticas interna e externa são menos evidentes nas artérias do tipo elástico do que nas artérias do tipo muscular. Fonte: Atlas de Histologia – Sobotta.

Em locais específicos das artérias, como seio carotídeo e arco aórtico, encontram-se terminações nervosas livres que formam uma rede na camada adventícia, próximo à borda medioadventicial. Fazendo parte do barorreflexo, essas terminações nervosas livres são mecanorreceptores (barorreceptores) responsáveis

pela aferência de sinais da pressão arterial. Feixes de colágeno unem as varicosidades entre si, aos fibroblastos, às lâminas elásticas e as células musculares da camada mais externa da média. Estando assim, as terminações unidas fortemente entre si e os elementos vasculares, de modo que as tensões circunferenciais deformam a parede vascular juntamente com as fibras nervosas sensibilizando-as e levando ao surgimento de muitos potenciais de ação durante a passagem da onda de pulso e elevação da pressão arterial. Alterações na estrutura da parede vascular com conseqüente diminuição da distensibilidade, podem afetar o desencadeamento dos potenciais de ação dessas terminações, diminuindo assim a sensibilidade dos barorreceptores, e dificultando a adaptação da pressão arterial diante de diferentes situações internas ou externas, em determinadas doenças como na aterosclerose (Agell-James *et alii*, 1974; Cox *et alii*, 1980; Hosomi *et alii*, 1986; Dart *et alii*, 1991; Li Z *et alii*, 1996), hipertensão arterial (Isnard *et alii*, 1989; Zanchetti & Mancia, 1991; Moysés *et alii*, 1994; Chapleau *et alii*, 1995) e *diabetes mellitus* (Bennet *et alii*, 1976; McVeigh, 1996), decorrente do próprio envelhecimento (Byyny *et alii*, 1995; Carvalho Filho *et alii*, 1983), ou mesmo por uma mudança na composição da parede por excesso de cálcio – elastocalcinose (Niederhoffer *et alii*, 1997).

1.3 Aterosclerose

Historicamente, com relação à patogenia da doença, predominaram duas hipóteses para a aterogênese: uma delas enfatizava a proliferação celular na íntima como reação à entrada de proteínas e lipídios plasmáticos do sangue, enquanto a outra postulava que a organização e o crescimento repetido de trombos resultavam na formação da placa. Atualmente, a patogenia da doença incorpora elementos de ambas as teorias antigas, além de considerar os fatores de risco. Este conceito, conhecido como *hipótese de resposta à lesão*, considera a aterosclerose como *uma resposta inflamatória crônica da parede arterial iniciada por algum tipo de lesão do endotélio* (Ross, 1993). A resposta inflamatória desencadeada por determinados estímulos celulares, deve-se a diversas interações celulares, que ocorrem através do contato intercelular e mediadores polipeptídicos solúveis de curta ação, as denominadas

citocinas, que são responsáveis por muitas interações e funções efetoras. As lesões ateroscleróticas se caracterizam pelo espessamento focal da íntima, proliferação das células musculares lisas e aumento do material extracelular do tecido conjuntivo, com deposição do colesterol nas células musculares e macrófagos. No centro das placas maiores, quando muitas dessas células estão carregadas de colesterol, forma-se um resíduo grumoso amarelado formando as chamadas *placas ateromatosas (lesões gordurosas)*, que são visíveis a olho nu quando avançadas. O termo *ateroma* deriva da palavra grega para mingau, devido ao aspecto descrito dessas lesões. As alterações podem estender-se à parte interna da túnica média, e o crescimento da placa pode chegar a obliterar o vaso sanguíneo, levando as graves conseqüências.

1.3.1 Fluxo Sanguíneo e Aterosclerose

As células endoteliais formam uma interface entre o sangue circulante e a parede vascular, servindo como uma barreira que é modulada por diferentes estímulos (químicos e mecânicos) e responsável por diversas ações vasculares. Tanto as células endoteliais quanto as células musculares lisas respondem a forças mecânicas como a pressão e o fluxo sanguíneo, e essas respostas desempenham um importante papel na regulação vascular da saúde e doença. De modo que o fluxo e a pressão sanguínea são responsáveis respectivamente pelo estresse tangencial (de cisalhamento ou *shear stress*) e o estresse circunferencial (ou radial) (Chien, 2003). Em pontos específicos das artérias, como as ramificações, óstios vasculares e curvaturas, surgem alterações características do fluxo sanguíneo, no qual geralmente a velocidade do fluxo é mais elevada, de modo que o fluxo deixa de ser laminar e torna-se turbilhonar. Nesses locais há uma localização preferencial das lesões ateroscleróticas, de modo que as forças hemodinâmicas parecem desempenhar um papel fundamental na gênese da aterosclerose (Glagov *et alii*, 1988; Cornhill *et alii*, 1990). Foi demonstrado que nos pontos de ramificação arterial (fluxo turbilhonar), quando comparado com locais onde o fluxo é laminar, há uma alta permeabilidade a LDL (Gerrity *et alii*, 1977) e são locais preferenciais de localização de macrófagos abaixo das células endoteliais (Malinauskas *et alii*, 1995). A raiz da aorta (próximo à valva), seio coronário (esquerdo

principalmente), curvatura menor do arco aórtico, as principais ramificações da aorta, carótida (seio carotídeo), artéria pulmonar, óstios intercostais, artérias renais e artérias ilíacas são os locais de predileção para o desenvolvimento das lesões ateroscleróticas nos camundongos apoE^{-/-} e que em sua maioria se correlacionam anatomicamente com os locais de lesões encontradas no ser humano (Nakashima *et alii*, 1994; Tse *et alii*, 1999; Hartley *et alii*, 2000; Bentzon *et alii*, 2003).

A ativação de receptores de membranas celulares modula a expressão de numerosos genes. Uma via que parece mediar a expressão de muitos genes durante a ativação endotelial é o fator de transcrição, o fator nuclear kappa B (NF-κB)/sistema IκB de fatores transcricionais. O *shear stress* hemodinâmico induz o NF-κB para expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais (Walpole *et alii*, 1995). Há evidências de que existem diversos tipos de sensores da membrana que são ativados por estímulos mecânicos, incluindo proteína G ligada ao receptor (Kuchan *et alii*, 1994), canais iônicos (Olesen *et alii*, 1988; Schwartz *et alii*, 1992; Traub *et alii*, 1999; Romanenko *et alii*, 2002), proteínas de junção intercelular (Osawa *et alii*, 2002) e glicocálice (Sato *et alii*, 2000), esses respondem principalmente ao *shear stress*. Além de que, a bicamada lipídica da membrana celular pode também participar da mecanossinalização (Chien, 2003). A fluidez da membrana plasmática é influenciada pelo nível do fluxo sanguíneo (Davies, 1995; Haidekker *et alii*, 2000; Butler *et alii*, 2002). De modo que o aumento do *shear stress* aumenta a fluidez da membrana nas células endoteliais (Haidekker *et alii*, 2000). Dois tipos principais de receptores de membrana, o receptor de tirosina quinase e as integrinas, respondem aos estímulos mecânicos (Jalali *et alii*, 2001). As integrinas também desempenham um papel crítico na modulação no metabolismo de lipídios das células endoteliais em resposta ao *shear stress* (Liu *et alii*, 2002).

Quimiocinas, que são citocinas que afetam o movimento dos leucócitos, como a proteína quimiotática dos monócitos 1 (MCP-1) secretada por células endoteliais, macrófagos ativados bem como por outros tipos celulares, promove a infiltração de monócitos na parede vascular. A expressão do gene para MCP-1 e sua secreção está diretamente relacionado com o fluxo sanguíneo. O aumento do *shear stress* aumenta a expressão de MCP-1 em cultura de células endoteliais humanas (Shyy *et alii*, 1994). A

ausência de MCP-1 em camundongos com ausência do receptor para LDL (ateroscleróticos) reduz significativamente a formação de lesões ateroscleróticas destes animais (Gu *et alii*, 1998). Através da técnica de DNA *microarray*, Chen *et alii* (2001) investigaram a expressão gênica de células endoteliais de aorta humana em cultura, submetidas a baixo *shear stress*, com fluxo laminar de 12 dinas/cm², por 24 h. Observando-se que os genes relacionados à inflamação e proliferação sofrem *down-regulation*, enquanto que genes envolvidos na sobrevivência das células endoteliais, para angiogênese e remodelamento vascular (metaloproteinase-1) sofrem *upregulation*. O fluxo turbilhonar aumenta o número de mitoses e acelera a morte das células endoteliais, além de aumentar a permeabilidade de macromoléculas, como a LDL e de albumina, através da camada endotelial (Weinbaum *et alii*, 1985; Chien *et alii*, 1988; Lin *et alii*, 1989).

1.3.2 Hipercolesterolemia e Modificação dos Lipídios

A liberação de triglicerídios dos hepatócitos requer a associação a apoproteínas (apoB-100, apoE, apoA, etc.) para formar as lipoproteínas, as quais podem então percorrer a circulação sanguínea. Parece haver dois mecanismos para remoção de LDL do plasma: um mediado por um receptor de LDL e outro mediado por receptores de LDL oxidada (receptor removedor – *scavenger*). A LDL pode ser modificada pela oxidação, glicosilação (no *diabetes*), agregação, associação com proteoglicanas, ou a incorporação a complexos imunes, sendo estas alterações a principal causa de injúria ao endotélio e ao músculo liso na aterosclerose (Ross, 1999). A LDL se difunde do plasma para o espaço subendotelial e se liga a proteoglicanas de matriz extracelular que promove a retenção da LDL na íntima (Camejo, 1982). Uma vez que a LDL é retida no espaço subendotelial, ela sofre uma modificação química através da peroxidação lipídica. Steinberg *et alii* (1989), conjectura que a LDL oxidada (Ox-LDL) seja a responsável pelo início da reação inflamatória na aterosclerose, através da ativação das células endoteliais, e pelo recrutamento de células do sistema imunológico (monócitos e linfócitos T). Estudos posteriores confirmaram que mínimas quantidades de Ox-LDL podem estimular a liberação de MCP-1 (Cushing *et alii*, 1990) e do fator estimulador de

colônia para macrófagos (Rajavashisth *et alii*, 1990) pelas células endoteliais, o que poderia levar facilmente ao desenvolvimento de estrias gordurosas pelo recrutamento de monócitos e sua diferenciação em macrófago no vaso. Ox-LDL ativa o endotélio através da via do fator de transcrição nuclear κ B, que leva ao aumento da expressão de moléculas de adesão celular, como P-selectina, VCAM-1 (molécula de adesão celular-vascular do tipo 1) e ICAM-1 (molécula de adesão intercelular do tipo 1) de forma a permitir a ligação de leucócitos ao endotélio (Collins *et alii*, 1995; Maziere *et alii*, 1996). A falta do receptor para proteína MCP-1 (CCR2) diminui acentuadamente a formação de placas ateromatosas em camundongos apoE^{-/-}. Esses dados revelam o importante papel da MCP-1 nos estágios iniciais de desenvolvimento das lesões ateroscleróticas, e sugere novamente que o aumento desta quimiocina por quantidades mínimas de Ox-LDL é uma chave importante da ligação entre hiperlipidemia e a formação de estrias gordurosas (Boring *et alii*, 1998).

A LDL modificada também é quimiotática para monócitos, de modo que ocorre uma maior atração destas células, que por sua vez aumentam a expressão de genes para o fator estimulador de colônia para macrófagos (M-CSF) e fator estimulador de colônia para granulócitos (G-CSF), além do gene para proteína quimiotática de monócitos derivada das células endoteliais (Rajavashisth *et alii*, 1990). Através desses fatores monócitos se diferenciam em macrófagos na parede vascular, e então passam a englobar o Ox-LDL através de receptores *scavenger*, ficando repletas de vacúolos lipídicos em seu citoplasma compostos de colesterol e ésteres de colesterol. Exibindo então o aspecto de uma célula espumosa (*foam cells*). Agregados dessas células formam os ateromas amarelos carregados de colesterol na parede vascular. A remoção e o sequestro da LDL modificada são etapas importantes no início, papel protetor dos macrófagos na resposta inflamatória e minimiza os efeitos da LDL modificada nas células endoteliais e musculares lisas (Ross, 1999). Mediadores da inflamação como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina-1 (IL-1) e M-CSF aumentam a ligação da LDL ao endotélio e músculo liso e aumentam a transcrição do gene do receptor de LDL (Stopeck *et alii*, 1993). Após a ligação da LDL modificada com o receptor *scavenger* inicia uma série de eventos intracelulares que induz a liberação de moléculas inflamatórias que perpetuam a inflamação. Formando-se assim, um círculo

vicioso de inflamação, modificação de lipoproteínas, e manutenção de mais inflamação na artéria pela presença desses lipídios. Trabalhos em camundongos apoE^{-/-} *knockout* compostos, deficientes para os receptores *scavenger* A (Sr-A) ou CD36, têm redução das lesões ateroscleróticas (Suzuki *et alii*, 1997; Febbraio *et alii*, 2000). Outros receptores *scavenger* têm surgido como CD32, CD64, LOX e o SR-PSOX (Steinbrecher, 1999; Shimaoka *et alii*, 2000). A utilização de antioxidantes, principalmente o probucol e também a vitamina E, pode reduzir o tamanho das lesões, e possui efeito antiinflamatório, prevenindo a maior expressão de moléculas de adesão para monócitos (Fruebis *et alii*, 1997). A oxidação de ácidos graxos na LDL gera aldeídos reativos (malondialdeído-MDA, e 4-hidroxinonenal) que modificam proteínas, que desta maneira funcionam como antígenos (Wuttge *et alii*, 1999).

1.3.3 Patogenia

O desenvolvimento de regiões focais de lesão endotelial crônica, de agressão branda geralmente, leva a disfunção endotelial, caracterizada pelo aumento da permeabilidade endotelial e aumento da adesão de leucócitos. Os distúrbios hemodinâmicos que acompanham a função circulatória normal e os efeitos adversos da hipercolesterolemia são cruciais para esse processo. De modo que há acúmulo de lipoproteínas na parede vascular, principalmente LDL que possui um elevado conteúdo de colesterol, bem como de proteínas de muito baixa densidade (VLDL), que são oxidadas inicialmente pelas células endoteliais (Steinberg, 1997). Vários dos ativadores das células endoteliais, como forças hemodinâmicas e produtos lipídicos, possuem em comum a capacidade e provocar estresse oxidativo, que ativa a via do NF- κ B, que por sua vez leva a resposta biológica implicadas na inflamação, como a expressão de moléculas de adesão, secreção de citocinas e fatores de crescimento, apoptose, etc. (Baeuerle *et alii*, 1996). Trabalhos mostram a inibição do NF- κ B por antioxidantes, como a cisteína (Meyer *et alii*, 1993; Schenk *et alii*, 1994). O prejuízo da função endotelial em camundongos apoE-deficiente (apoE^{-/-}), é causada pelo aumento da produção de ânions superóxidos (O_2^-) e redução da atividade enzimática da eNOS. Assim, a inativação química do NO pelo O_2^- e redução da biosíntese do NO são mecanismos

chaves responsáveis pela disfunção endotelial em aortas de camundongos ateroscleróticos apoE^{-/-} (d'Uscio *et alii*, 2001). Consequentemente, há uma maior expressão selectinas (P, E e L) no endotélio para rolagem e ativação dos leucócitos circulantes, além da expressão de moléculas de adesão no endotélio, como ICAM-1 (molécula de aderência intercelular 1) e principalmente VCAM-1 (molécula de aderência às células vasculares 1), que levam a adesão firme de leucócitos circulantes, principalmente monócitos além de linfócitos T, seguido da migração destas células para o espaço subendotelial da camada íntima (Dong, *et alii*, 1998; Bourdillon *et alii*, 2000; Collins *et alii*, 2000; Kitagawa, *et alii*, 2001; Cybulsky, *et alii*, 2001; Steinberg, 2002). Uma vez que os monócitos penetram na íntima, atraídos por moléculas como MCP-1 e a Ox-LDL, eles se diferenciam através do M-CSF em macrófagos que aumentam a oxidação dos lipídios e passam a expressar receptores *scavengers* para Ox-LDL, fagocitando assim as Ox-LDL e se transformando em células espumosas ricas em lipídios. A adesão de plaquetas ocorre nas áreas focais de desnudação ou a leucócitos aderentes. A Ox-LDL, fatores das plaquetas ativadas, macrófagos e outras células vasculares estimulam a migração das células musculares lisas da média para a íntima. Estudos em ratos submetidos à angioplastia, sugerem que o fator de crescimento dos fibroblastos básico (bFGF, *basic fibroblast growth factor*), liberados de células vasculares mortas, possa iniciar a proliferação das células musculares lisas da camada média (Lindner & Reidy, 1991), enquanto que o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF, *platelet-derived growth factor*) pode induzir a migração dessas células para a íntima (Ferns *et alii*, 1991). Em estágios mais avançados da aterosclerose, se a hipercolesterolemia ou outro evento desencadeante persiste, há intensa proliferação das células musculares lisas localizadas na íntima, e em menor intensidade fibroblastos, que desenvolvem intensa proliferação de matriz extracelular, resultando em acúmulo de colágeno e proteoglicanas. Há acúmulo de lipídios principalmente nos macrófagos, mas também este acúmulo ocorre nas células musculares lisas que também se tornam espumosas. Com a morte dessas células pela toxicidade do excesso de lipídios intracelulares, além da penetração direta no vaso, ocorre o acúmulo de lipídios no meio extracelular, o que pode formar o chamado *core necrótico*. Com a progressão da lesão, o *ateroma celular gorduroso*, geralmente, é

modificado pela deposição adicional de colágeno e proteoglicanas. Na face da íntima voltada para luz vascular, o tecido conjuntivo forma a capa fibrosa (cápsula fibrosa), formando assim o ateroma *fibrogorduroso* (Schwartz *et alii*, 1995). Alguns desses ateromas maduros sofrem proliferação celular adicional e formação de tecido conjuntivo, produzindo *placas fibrosas*. Com freqüência pela ação de proteases, as placas sofrem ruptura com trombo superposto, que levam ao surgimento de eventos clínicos catastróficos. Na doença avançada, também, fibroblastos e células musculares lisas com calcificação extracelular originam as lesões *fibrocalcificadas*.

As células T foram identificadas em lesões ateroscleróticas humanas e em lesões ateroscleróticas de camundongo apoE^{-/-} (Jonasson *et alii*, 1986; Zhou *et alii*, 1996). Tanto macrófagos quanto as células T ativadas, secretam potentes citocinas que levam a inflamação na parede vascular (Jonasson *et alii*, 1985; Zhou *et alii*, 1998; Frostegard *et alii*, 1999). A interação de CD44 em leucócitos ativados com hialuronato no endotélio medeia o rolamento sob condições *shear stress*, o que é fundamental para a migração dos linfócitos T ativados nos locais de inflamações. Essa interação é seguida pela ligação entre as integrinas das células inflamatórias com moléculas de adesão firme expressas pelo endotélio, como VCAM-1/VLA4, enquanto que a interação ICAM-1/LFA-1 parece não ser tão importante (Grendele *et alii*, 1996 Siegelman *et alii*, 2000).

A *American Heart Association* possui uma classificação para as lesões ateroscleróticas, subdividida em seis tipos, começando com as células espumosas isoladas (pontos gordurosos), passando pelo estágio de estrias gordurosas, ateromas e fibroateromas até as lesões complicadas (Figura 2). O diagrama também inclui os mecanismos de crescimento no decorrer de décadas e as correlações clínicas. Do tipo I ao IV, as mudanças morfológicas ocorrem principalmente devido ao acréscimo da acumulação de lipídios. As setas entre os tipos V e VI, indicam o aumento da espessura das lesões quando há precipitação trombótica na superfície da lesão. A lesão do tipo IV pode evoluir diretamente para a do tipo VI com o surgimento de evento trombótico. A lesão do tipo VI é caracterizada por um evento como ruptura da placa levando a formação do trombo, ou hemorragia na parede vascular, sendo que a lesão do tipo VI pode retornar ao estado do tipo V com a cicatrização do rombo. Trombos repetitivos

(superpostos) em variadas extensões de tempo no mesmo local, podem ser o mecanismo principal de oclusão gradual nas artérias de médio calibre (Stary *et alii*, 1995a, b).

Nomenclatura e principal aspecto histológico	Seqüências na progressão	Principal mecanismo de crescimento	Início mais precoce	Correlação clínica
Lesão tipo I (inicial) Macrófago isolado Células espumosas	I	Crescimento principalmente por acúmulo de lipídios	A partir da primeira década	Clinicamente silenciosa
Lesão tipo II (estria gordurosa) Acúmulo de lipídios principalmente intracelular	II			
Lesão tipo III (intermediária) Alterações do tipo II e pequenos reservatórios extracelulares de lipídios	III			
Lesão tipo IV (ateroma) Alteração do tipo II e núcleo de lipídio extracelular	IV			
Lesão tipo V (fibroateroma) Centro de lipídio e camada fibrótica, ou múltiplos núcleos de lipídios e camadas fibróticas, ou principalmente calcificada ou principalmente fibrótica	V	Aumento acelerado do músculo liso e colágeno	A partir da quarta década	Clinicamente silenciosa ou manifesta
Lesão tipo IV (complicada) Defeito de superfície, hematoma-hemorragia,	VI	Trombose, hematoma		

Figura 2: Classificação das lesões ateroscleróticas humanas segundo a *American Heart Association*. Os numerais romanos indicam as características histológicas dos seis tipos de lesões. As setas indicam a seqüência nas alterações morfológicas. Modificado Stary *et alii*, 1995.

1.4 Hipertensão Renovascular

Sabe-se que a hipertensão arterial é uma doença de origem multifatorial, como já descrito em 1949, pelo Dr. Irv Page em sua teoria do “mosaico” (Page, 1949). A hipertensão arterial incide aproximadamente um bilhão de pessoas no mundo, trazendo consigo uma série de complicações generalizadas ao organismo que geralmente passam a ser sintomáticas em sua fase tardia de evolução (Kaplan, 1997). A

hipertensão renovascular ocorre entre 2 a 5% de todos os casos de hipertensão da população geral (Lewandowski, 2003). A prevalência pode ser maior do que 40% nos pacientes que possuem hipertensão secundária. A maioria desses indivíduos, a formação de placas de ateroma provocando a estenose da artéria renal, é a principal causa da hipertensão renovascular (Ozsarlak & Parizel, 2004; Textor 2004). Entretanto deve-se ressaltar que nem toda estenose da artéria renal leva a hipertensão ou nefropatia isquêmica.

Desde o trabalho original de Goldblatt *et alii*, em 1934, que mostra uma elevação substancial da pressão arterial em cães através da colocação de um clipe de prata na artéria renal para suprimir o fluxo sanguíneo, muito se avançou no conhecimento deste tipo de hipertensão provocado pela estenose da artéria renal. Há dois tipos clássicos de hipertensão com obstrução do fluxo sanguíneo da artéria renal, a chamada hipertensão 1 rim, 1 clipe (1R1C), na qual é promovida a estenose da artéria renal por um clipe em volta da artéria e remoção do rim contra-lateral; e a hipertensão 2 rins, 1 clipe (2R1C), em que apenas um clipe causa a estenose da artéria renal com redução crônica da perfusão, sem remoção do outro rim. Esses modelos recebem o nome genérico de hipertensão de Goldblatt. Já no primeiro dia após a aplicação do clipe na artéria renal, observa-se uma pequena elevação da pressão arterial. O tempo de manutenção da pressão elevada e os níveis pressóricos atingidos no modelo 2R1C dependem da espécie e do grau de estenose da artéria renal (Ferrario *et alii*, 1971; Carretero *et alii*, 1977; Leenen *et alii*, 1984; Cabral *et alii*, 1997; Fazan *et alii*, 2001). O mecanismo envolvido na hipertensão 2R1C é diferente do observado na hipertensão 1R1C (Ledingham, 1971; Carretero *et alii*, 1977). Na hipertensão 2R1C o estabelecimento e a manutenção da hipertensão dependem principalmente da ativação contínua do sistema renina-angiotensina. Nesse modelo o rim contra-lateral excreta com eficiência a sobrecarga de sódio imposta pelo rim isquêmico, o que previne o acúmulo de sódio nesse modelo (Cabral *et alii*, 1997). O sistema renina-angiotensina (SRA) desempenha um importante papel na homeostasia do sistema cardiovascular. O hormônio biologicamente ativo Angiotensina II (Ang II) tem várias ações relacionadas à pressão sanguínea (Reid *et alii*, 1978).

Na arteríola aferente dos glomérulos renais encontramos células epiteliais cúbicas denominadas de células justaglomerulares. Essas células desempenham um importante papel no SRA, e estão em íntimo contato com as células que formam a mácula densa no túbulo convoluto distal dos néfrons. Davis, descreve em 1973 o mecanismo da liberação da renina. De modo que determinados estímulos, como alterações do fluxo sanguíneo renal, alterações de pressão hidrostática nos capilares glomerulares e no ritmo da filtração glomerular, fazem com que as células justaglomerulares secretem na circulação sanguínea e na linfa renal a renina, uma importante enzima que age sobre o angiotensinogênio (alfa-2-globulina) plasmático formando um decapeptídeo denominado de angiotensina I (Ang I). A Ang I é então convertida em uma forma ativa, o octapeptídeo conhecido como angiotensina II, através da enzima conversora de angiotensina (ECA) presente no plasma e na superfície endotelial, principalmente endotélio pulmonar. Ao contrário de humanos e ratos, camundongos podem carrear um ou dois genes para renina, no entanto, a linhagem C57BL/6 possui um único gene para renina (Field & Gross, 1985).

A Ang-II é um potente vasoconstritor que também estimula a secreção de aldosterona pelo córtex da supra-renal, o que eleva pressão arterial. A Ang-II possui também vários efeitos tróficos proliferativos. E um dos produtos metabólicos da Ang-II é a angiotensina 1-7 (Ang-1-7), que funciona como um inibidor da Ang-II, pois possui efeitos que se opõe aos da Ang-II. Por exemplo, a Ang-1-7 aumenta a sensibilidade do barorreflexo, diminui a ação simpática, possui ação anti-proliferativa celular e é vasodilatadora; enquanto, enquanto que a Ang-II diminui a sensibilidade do barorreflexo, estimula o sistema simpático, tem efeitos proliferativos e é vasoconstritora. (Santos *et alii*, 1988; Dzau *et alii*, 1991; Ferrario, 1998). O sistema renina-angiotensina pode ser um elemento chave na resposta inflamatória. A Ang-II é reconhecida como um fator de crescimento que regula a proliferação celular e o processo de fibrose. De modo que a Ang-II pode iniciar a inflamação pelo aumento indireto da permeabilidade vascular e recrutar células inflamatórias (Suzuki *et alii*, 2003).

1.5 Remodelamento Arterial

Thoma, em 1893, descreve que os vasos sanguíneos alargam-se para acomodar o aumento do fluxo para um órgão, como por exemplo, durante o crescimento natural ou hipertrofia ventricular esquerda (Langille, 1996; Ward *et alii*, 2000). Um grande interesse nesse fenômeno foi despertado, estimulado por observações nas quais os vasos alargam-se radialmente para compensar um progressivo crescimento das placas ateroscleróticas, postergando assim, a limitação do fluxo causada pela estenose (Armstrong *et alii*, 1985; Glagov *et alii*, 1987). Os tecidos vasculares respondem às mudanças nas forças mecânicas impostas a eles com mudanças no tônus vasomotor em curto prazo, e com remodelamento estrutural quando as variações persistem (Cowan *et alii*, 1998). O fluxo e a pressão sanguínea são responsáveis respectivamente pelo estresse tangencial (de cisalhamento ou *shear stress*) e o estresse circunferencial (ou radial) (Chien, 2003).

O termo “remodelamento arterial” foi previamente usado para descrever qualquer mudança na estrutura de parede vascular. Entretanto, mais recentemente, esse termo tem sido usado especificamente para se referir a mudança no tamanho do vaso quando comparado com a artéria controle de referência (Glagov *et alii*, 1987; Ward *et alii*, 2000; Hollestelle *et alii*, 2004). Esse fenômeno foi descrito por Glagov *et alii* em 1987, que relatou uma correlação positiva entre a lâmina elástica externa e a área de lesões ateromatosas em artérias coronárias humanas. Nas placas ateroscleróticas que causam uma estenose do lúmen menor do que 40% há um aumento no tamanho do vaso para compensar o crescimento da placa, resultando em um aumento da área do lúmen (Glagov *et alii*, 1987).

O tamanho do vaso é determinado pela área de secção transversal do vaso (AST_v), sendo esta a área contida dentro dos limites da lâmina elástica externa, que pode ser mensurada de diferentes maneiras. O aumento do tamanho vascular é referido como remodelamento positivo e a diminuição como remodelamento negativo, havendo diferentes sinônimos para o mesmo tipo de remodelamento (tabela 1; figura 3). Quando o remodelamento positivo está presente, mas é insuficiente para prevenir a estenose luminal, o termo inadequado remodelamento positivo é utilizado. Mas há uma série de outras terminologias utilizadas na literatura para se referir ao mesmo tipo de remodelamento ou a determinadas características peculiares de um determinado

remodelamento. O aneurisma é definido como dilatações locais maiores do que 50% em relação ao seu diâmetro normal (Daugherty *et ali*, 2002).

Terminologia do Remodelamento Arterial

Sinônimos para Mudanças no Tamanho do Vaso	
Aumento	Diminuição
Remodelamento para fora Alargamento compensatório Remodelamento positivo Remodelamento expansivo (Excêntrico) Remodelamento Glagoviano	Remodelamento para dentro Encolhimento (paradoxal) Remodelamento negativo Remodelamento constritivo (Concêntrico) Remodelamento Antiglagoviano

Tabela 1: A tabela mostra os diferentes sinônimos para o aumento ou diminuição no tamanho do vaso.

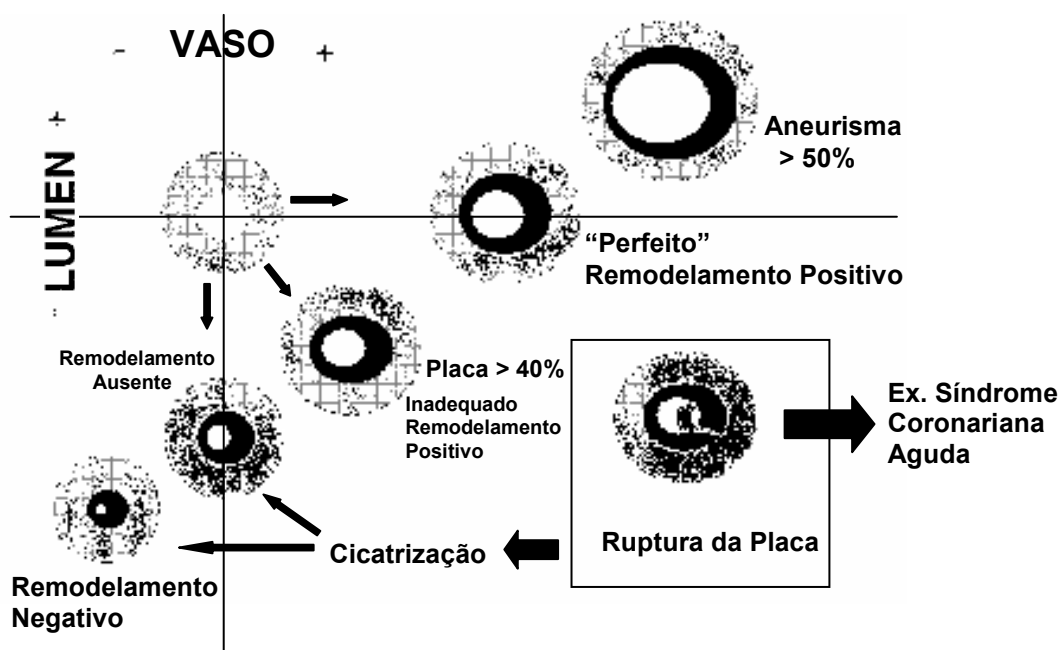


Figura 3: Relação entre o tamanho do vaso (AST_v) e o lúmen (AST_l) com desenvolvimento de placa atromatosa, determinando o remodelamento vascular. Partindo-se do vaso normal no cruzamento das retas. Com a formação da placa atromatosa, pode ocorrer o remodelamento positivo com preservação do tamanho do lúmen. O aneurisma (supercompensação) é determinado quando o vaso tem um aumento

superior a 50% do seu tamanho original. O vaso não consegue compensar a formação de placa > 40% da área do lúmen. A ruptura da placa seguida do processo de cicatrização pode levar ao remodelamento negativo. Modificado de: Ward *et alii*, 2000.

Além do mais, o remodelamento pode resultar em acréscimo, nenhuma mudança, ou um decréscimo na quantidade total do material vascular. Essas alterações formam uma subclassificação para o remodelamento vascular, que incluem os termos hipertrófico, eutrófico e hipotrófico, respectivamente (figura 4). Esses termos são utilizados geralmente em trabalhos que envolvem as artérias de resistência, tendo como base mudanças no diâmetro do lúmen vascular e na relação parede:luz (*wall:lumen ratio*) ou mais precisamente a razão média:lúmen (Mulvany *et alii*, 1996; 1999). O diâmetro interno e a espessura da parede dos vasos são adequados ao fluxo de sangue de cada setor da circulação. Tanto o diâmetro interno quanto a espessura da parede dos vasos diminuem em direção à periferia, e a razão parede:luz (p:l) não varia muito. Essa razão aumenta nas pequenas artérias e arteríolas, mas decresce nos capilares e é muito menor nas veias e artérias pulmonares do que na circulação sistêmica de diâmetro comparável (Shepherd & Vanhoutte, 1980; Franchini, 1999). São consideradas como artérias de resistência aquelas que possuem a área de secção transversa <400 μm , quando vaso relaxado, e as arteríolas <100 μm (Intengan & Schiffrin, 2000). O remodelamento nos vasos de resistência difere do remodelamento encontrado nas grandes artérias de indivíduos hipertensos. Isso é provável porque o requerimento funcional das grandes artérias não deve incluir o estreitamento do lúmen, para realização de sua função primária de transportar o sangue. Assim, um aumento da razão p:l das grandes artérias, com a manutenção do lúmen normal, necessariamente implica no aumento da quantidade de tecido da parede arterial (Schiffrin & Hayoz, 1997). No remodelamento *eutrófico* há redução no tamanho do vaso AST_v e da área de secção transversal do lúmen (AST_L), sem alteração da área de secção transversa da camada média, resultando no aumento da razão média-lúmen. Esse tipo de remodelamento predomina nas artérias de resistência em modelos no qual o SRA pode desempenhar um importante papel, como nos ratos espontaneamente hipertensos (*SHR – spontaneously hypertensive rats*) e na hipertensão 2R1C em ratos (Mulvany *et alii*, 1977; Li *et alii*, 1996), em humanos o remodelamento eutrófico é encontrado em

pacientes com hipertensão essencial moderada (Schiffrin *et alii*, 1993; Rosei *et alii*, 1995). Enquanto que o remodelamento *hipertrófico* apresenta redução AST_L , por aumento da espessura da camada média que o invade, com aumento também da razão média-lúmen. O remodelamento hipertrófico é predominante nos modelos de ratos com hipertensão severa no qual o sistema da endotelina é ativado, como o modelo de hipertensão deoxicorticosterona (DOCA)-sal, 1R1C, e Dahl sal-sensíveis (Intengan & Schiffrin, 2000). O remodelamento negativo hipotrófico é encontrado nas arteríolas aferentes do rim dos ratos SHR e quando há redução do fluxo nas artérias mesentéricas de rato, onde há redução do diâmetro do lúmen acompanhado do decréscimo da área de secção transversal da camada média. Já o remodelamento positivo nas artérias de resistência ocorre quando se realiza tratamento anti-hipertensivo com inibidor da ECA e nas situações com aumento de fluxo (Mulvany *et alii*, 1999).

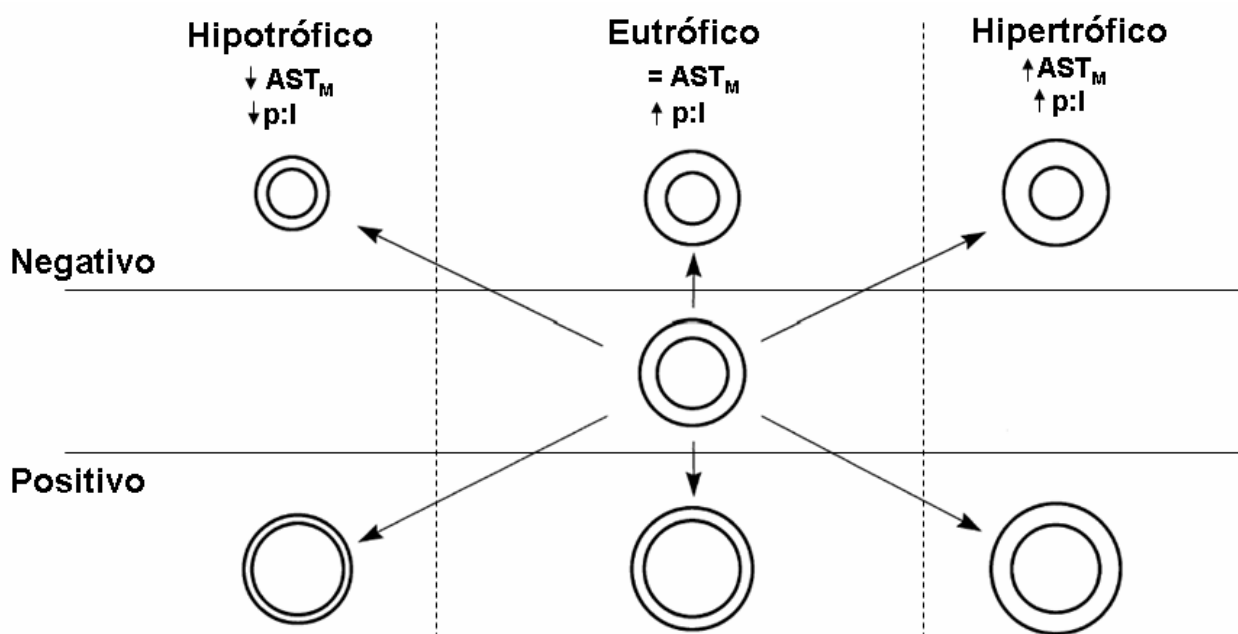


Figura 4: A figura mostra as diferentes maneiras que o remodelamento pode modificar a área de secção transversal da camada média dos vasos (AST_M) e a razão $p:l$. No centro está representado um vaso normal. O remodelamento pode ser positivo ou negativo, de acordo com o diâmetro do lúmen. E ainda subdividido em hipotrófico (com diminuição da AST_M) e da razão $p:l$, eutrófico (sem alterações na AST_M , vasos da coluna central) e hipertrófico (com aumento da AST_M), ambos com aumento da razão $p:l$. Modificado de Mulvany, 1999.

Há uma maior frequência de remodelamento positivo na aterosclerose, mas algumas variações do remodelamento em resposta a aterosclerose dependem do leito vascular envolvido. Por exemplo, as artérias ilíacas e femorais possuem uma propensão a desenvolver o inadequado remodelamento positivo ou remodelamento negativo, enquanto que nas artérias renais, carótidas e coronárias há uma maior propensão ao desenvolvimento do remodelamento positivo (Pasterkamp *et alii*, 1997). Também é mais freqüente o inadequado remodelamento positivo ou remodelamento negativo no diabético tratado com insulina do que no diabético não tratado com insulina (Kornowski *et alii*, 1998), e mais comum em fumantes do que não-fumantes, e menos freqüente na hipercolesterolemia (Tauth *et alii*, 1997). Estudos pós-morte e através de ultra-sonografia, têm demonstrado que aproximadamente 15% dos segmentos de coronárias epicárdicas humanas apresentam remodelamento negativo (Mintz *et alii*, 1997; Gussenhoven *et alii*, 1997; Taylor *et alii*, 1999). Apesar de o remodelamento sofrer influência do leito vascular, há frequentemente uma marcada variabilidade no tipo de remodelamento desenvolvido ao longo do mesmo vaso (Pasterkamp *et alii*, 1996; Mintz *et alii*, 1997).

1.6 Camundongos – Modelos Animais

Há diversos modelos animais para aterosclerose. Sendo que a primeira evidência da aterosclerose experimental surgiu em 1908, quando Ignatowski descreve espessamento da íntima com formação de grandes células claras na aorta de coelhos submetidos à dieta rica em proteína animal (como carne, leite e ovos) (Jawieñ *et alii*, 2004). Inúmeros estudos foram realizados com animais de grande porte, como primatas não-humanos, suínos e coelhos (Gerrity, 1981; Faggiotto & Ross, 1984; Rosenfeld *et alii*, 1987). No entanto, são de difícil manutenção e alto custo. Outras espécies, como cães e ratos, não são bons modelos de aterosclerose, pois não desenvolvem lesão espontânea e requerem pesadas modificações na dieta para produção de lesão vascular. Apesar dos coelhos não desenvolverem lesões espontâneas, eles foram

muito utilizados, pois são bastante responsivos há mudanças dietéticas e desenvolvem lesão em pouco tempo (Drobnik *et alii*, 2000).

Desde 1992, o camundongo tem se tornado um excelente modelo para pesquisa experimental em aterosclerose. O camundongo apresenta vantagens, por até o momento ser o único modelo com possibilidade de manipulação gênica completa e eficaz. Tanto os transgênicos com inserção de genes exógenos no genoma do camundongo, que também pode ser feita em outras espécies, quanto à remoção de genes ou realocação de genes endógenos. Os camundongos são altamente resistentes à aterosclerose, provavelmente pelos seus altos níveis de HDL, a exceção são os camundongos C57BL/6 quando exposto a dieta com alto conteúdo de colesterol (Paigen *et alii*, 1990; Nishima *et alii*, 1993). Em 1992 surgiu a primeira linha de modelos animais modificados geneticamente, derivado da linhagem C57BL/6, chamado de camundongo deficiente para apolipoproteína E (apoE^{-/-}), pelo fato do gene para produção da apolipoproteína E (apoE) ter sido inativado (*knockout*). O surgimento deste modelo foi quase simultâneo, gerado por dois grupos de pesquisa, o de Piedrahita *et alii* e Plump *et alii*, em 1992. A apoE é uma glicoproteína com aproximadamente 34 kD que é sintetizada no fígado, e participa de forma crucial no metabolismo dos lipídios corporais, além de ser também sintetizada no cérebro e em outros tecidos tanto de humanos quanto de animais (Jawieñ *et alii*, 2004). Uma das mais importantes funções da apoE é servir como um ligante de alta afinidade para o receptor da apoB-apoE(LDL) e para o receptor do quilomícrom remanescente, seguindo desse modo uma específica captação das partículas que contêm a apoE pelo fígado (Zhang *et alii*, 1992). A apoE também é implicada no metabolismo HDL e no transporte reverso de colesterol (Grimsditch *et alii*, 1999). O camundongo apoE^{-/-} tem uma severa alteração do perfil das lipoproteínas, que mostra um elevado conteúdo de VLDL, que causa extrema susceptibilidade à aterosclerose (Hofker *et alii*, 1998). A apoE humana é polimórfica, consistindo de três principais isoproteínas (apoE-2, apoE-3, apoE-4), sendo apoE-3 a mais comum. Estudos também demonstram que alterações na produção da apoE estão envolvidos na doença de Alzheimer (Corden *et alii*, 1993).

Em síntese, um bom modelo animal para aterosclerose deve ter alguns critérios: a natureza das lesões deve ser similar à encontrada no ser humano; o perfil das

lipoproteínas plasmáticas e seu metabolismo devem ser semelhantes ao metabolismo encontrado no ser humano; o tempo necessário para formação das lesões, e o tempo para geração dos animais para estudos; a possibilidade de desempenhar manipulações e imagens *in vivo*; e a possibilidade do modelo de levar avanços na abordagem genética. O camundongo apresenta muitos desses critérios, como o tempo de geração curto em 9 semanas, sendo 3 semanas de gestação e cerca de 6 semanas para o animal atingir a maturidade sexual. Mas uma desvantagem é o seu pequeno tamanho, o que dificulta manipulações cirúrgicas e imagens *in vivo*. O perfil lipídico também é muito diferente do apresentado pelos humanos, que carrega cerca de 75% do seu colesterol plasmático na forma de LDL. Já os camundongos, carregam mais do seu colesterol na forma de HDL, que desempenha um papel de proteção contra a aterosclerose no ser humano (Jawieñ, *et alii*, 2004).

Embora haja limitações para estudos em humanos, um grande avanço na compreensão da aterosclerose vem sendo conseguido através dos modelos de animais transgênicos que permitem novas perspectivas de estudo para o entendimento das mesmas. Como principal exemplo, o camundongo apoE^{-/-}, um modelo para estudos de hipercolesterolemia, caracterizado pelo desenvolvimento de lesões ateroscleróticas similares às encontradas no ser humano (Plump *et alii*, 1992; Piedrahita *et alii*, 1992). Sendo este, o primeiro trabalho a analisar o impacto da coexistência de aterosclerose com a hipertensão renovascular no remodelamento vascular ocorrido na aorta de camundongos apoE^{-/-}.

2- OBJETIVOS



2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações morfológicas e morfométricas no arco aórtico, nos sítios das terminações barorreceptoras, em camundongos apoE^{-/-} com hipertensão renovascular (2R1C).

2.2 Objetivos Específicos

- Observar se o estágio inicial da aterosclerose é capaz de modificar os níveis de pressão arterial; se os níveis pressóricos da hipertensão renovascular são diferentes quando combinamos à aterosclerose;
- Verificar se há remodelamento vascular neste estágio de aterosclerose; verificar se há, e qual o tipo de remodelamento vascular encontrado na hipertensão 2R1C, e se este difere quando associamos à aterosclerose;
- Quantificar a área da luz vascular nos animais ateroscleróticos, hipertensos 2R1C e hipertensos 2R1C-ateroscleróticos;
- Analisar se há modificação da área de parede na aorta dos animais com hipertensão 2R1C; se a hipertensão 2R1C associada com aterosclerose tem efeito somatório sobre a modificação da área de parede vascular;
- Comprovar o remodelamento e suas características através da relação parede:luz (p:l) e do índice de remodelamento (RR);
- Analisar se a hipertensão renovascular por si só leva ao aumento da deposição lipídica na aorta nos animais C57; ou se a associação entre hipertensão renovascular 2R1C e aterosclerose acelera a formação de placas ateromatosas;

- Analisar os parâmetros funcionais de tensão e estresse de parede e suas alterações em função da hipertensão renovascular e aterosclerose;
- Encontrar achados histológicos típicos que possam envolver o remodelamento vascular ou uma resposta provocada pela angiotensina II.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

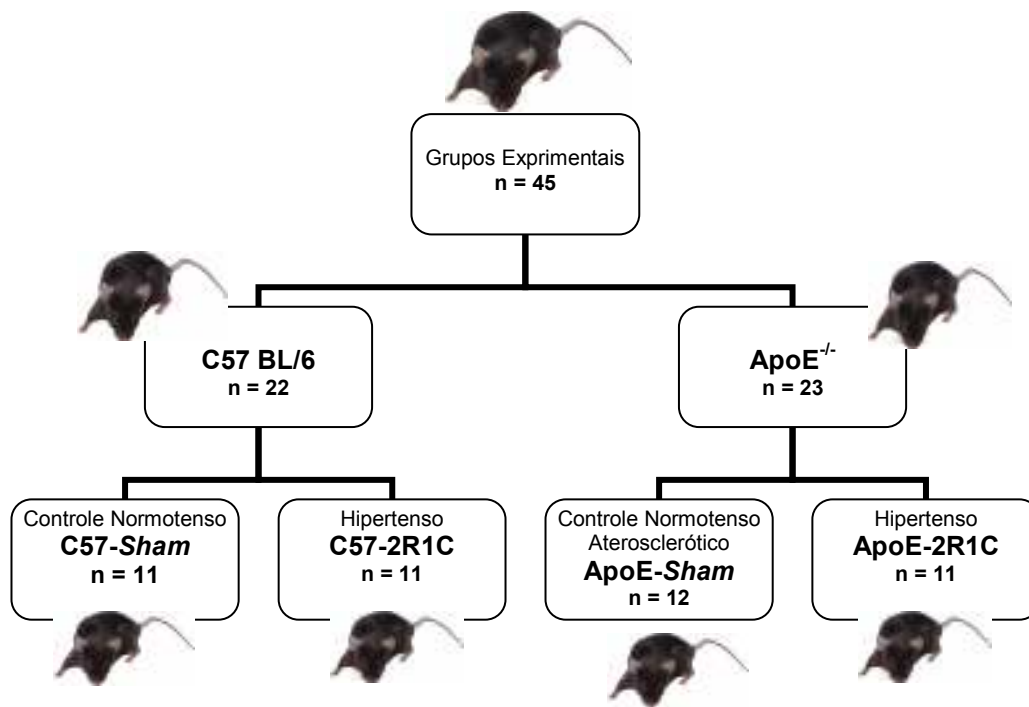


3 Materiais e Métodos

3.1 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos isogênicos da raça C57BL/6 e transgênicos *knockout* para apolipoproteína E (apoE^{-/-}), machos adultos jovens com idade variando entre 12-14 semanas (90 dias em média) e pesando em média 23 g. Os animais eram provenientes de uma colônia de criação de responsabilidade do nosso próprio laboratório, sendo criados e mantidos no biotério de Transgenes e Controle Cardiovascular, pertencente ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas no Centro Biomédico da UFES. Os animais recebiam água e ração (Nuvilab[®]) *ad libitum* e tinham controlado o ciclo de 12 horas claro/escuro, bem como, a temperatura (22±2°C) e a umidade (70%) do local onde permaneciam. A utilização e o manuseio experimental dos animais foram de acordo com as normas estabelecidas pelas entidades científicas.

Para os experimentos, os animais foram divididos em quatro grupos experimentais (Organograma). Sendo controles C57-Sham (n = 11) e apoE- Sham (n = 12), chamados de *sham* por sofrerem uma cirurgia fictícia; e hipertensos renovasculares 2 rins, 1 clipe (2R1C), C57-2R1C (n = 11) e apoE-2R1C (n = 11).



Organograma: O organograma dos grupos experimentais mostra a subdivisão dos grupos controles (*Sham*) e hipertensos (2R1C) nas respectivas linhagens de camundongos.

3.2 Produção da Hipertensão Renovascular (2 Rins-1 Clipe)

Os animais, com aproximadamente 23 g, foram anestesiados com uma mistura de ketamina (91 mg/Kg) e xilazina (9,1 mg/Kg) *i.p.*, colocados em posição decúbito dorsal e com auxílio de uma lupa cirúrgica (Opto Eletrônica S/A Sn-2002, São Carlos, SP) o rim esquerdo foi exposto por meio de uma pequena incisão lateral. Após um completo isolamento da artéria renal esquerda, um clipe de aço inox de dimensões 3x2x1 mm (Exidel SA, Suíça – figura 5), desenvolvido especificamente para camundongos, com uma abertura de 0,12 mm, foi colocado na artéria renal próximo à aorta abdominal (Wiesel *et alii*, 1997). Em seguida, o rim foi gentilmente acomodado na cavidade retroperitoneal, a incisão abdominal suturada. Os animais receberam uma

dose do antibiótico penicilina (100 UI), permitindo-se então que os mesmos se recuperassem da anestesia.

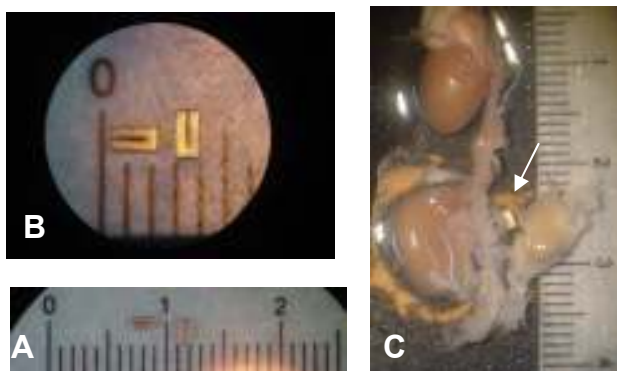


Figura 5: A figura A mostra cliques de aço inox em uma escala para distância em centímetros; a figura B destaca os cliques vistos em maior aumento de forma que é possível determinar suas dimensões; na figura C, a seta branca indica o clipe implantado na artéria renal esquerda, com seu respectivo rim isquêmico.

Para os animais controles, foram realizados os mesmos procedimentos cirúrgicos acima, exceto por não colocarmos o clipe na artéria renal, o que denominamos de cirurgia fictícia (*sham*). Durante toda a cirurgia a temperatura corporal era controlada por uma manta térmica regulada mantendo-a em 37 °C.

Esses animais eram mantidos durante 4 semanas em gaiolas individuais e recebiam água e ração *ad libitum*, tinham controlado o ciclo de 12 horas claro/escuro, a temperatura (22±2 °C) e a umidade (70%) do local onde permaneciam.

3.3 Instrumentação para Medidas Hemodinâmicas

Por aquecimento, cateteres de 4 cm de comprimento (Micro-Renathane, Braintree Science Inc , USA) tiveram redução do seu diâmetro para aproximadamente 0,22 a 0,25 mm. Esses foram preenchidos com solução de NaCl a 0,9% heparinizada (100 UI) e ocluídos com pinos de metal. Os animais foram anestesiados (ketamina 91

mg/Kg e xilazina 9,1 mg/Kg *i.p.*); um cateter foi inserido na artéria carótida direita para registros de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC); outro cateter também foi inserido na veia jugular esquerda para a administração de drogas em um outro estudo realizado em nosso laboratório. Os cateteres foram exteriorizados pela nuca dos animais com auxílio de um trocater. Posteriormente suturadas as incisões, estes animais receberam uma dose do antibiótico penicilina (100 UI). Todos os procedimentos cirúrgicos ocorreram com o auxílio de uma lupa cirúrgica e de uma manta térmica, tendo a cirurgia à duração de aproximadamente 1 hora e sempre realizada no mesmo horário para todos os animais. As medidas hemodinâmicas foram realizadas após um período mínimo de 24 horas após a cirurgia, para que os animais pudessem se recuperar dos procedimentos.

Através de um transdutor de pressão e de um sistema de aquisição de dados (BIOPAC Systems, Santa Barbara, CA, USA), realizaram-se as medidas hemodinâmicas: PAP, PAM e FC.

3.4 Histoquímica

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (100 mg/kg, ip), e posteriormente realizou-se uma incisão torácica de forma que o coração estivesse com livre acesso para realização da perfusão no animal. Para execução da perfusão fez-se uma incisão no átrio direito e em seqüência infundiu-se 50 ml de salina tampão fosfato (PBS: 0,1 M; pH 7,4) no ventrículo esquerdo, seguido de 50 ml de formaldeído (4%), ambos com pressão controlada igual à PAM do animal. Uma solução simples para fazer a perfusão do animal com pressão controlada por força da gravidade, por meio da pressão hidrostática determinada pela altura da coluna líquida ($1,36 \text{ cm H}_2\text{O} = 1 \text{ mmHg}$), com uso do frasco de Mariotti associado a um equipo (figura 6). A perfusão sob pressão controlada e igual à PAM permite manutenção mais adequada do formato das artérias, evitando também possíveis rupturas e degradação das placas ateromatosas. Enquanto que o frasco de Mariotti permite que o fluxo seja constante, e este foi mantido em aproximadamente em 20 ml/min. Ao término da perfusão foram retirados dos animais: o coração, a árvore aórtica e rins que foram estocados isoladamente em

recipientes plásticos contendo solução fixadora de PBS (0,1 M, pH 7,4) com 10% de formaldeído (4%), até o momento da preparação histológica.



Figura 6: Sistema de perfusão sob pressão controlada de acordo com a variação da altura da coluna hidrostática (1,36 cm H₂O = 1 mmHg). No alto vemos em maior detalhe o frasco de Mariotti.

A identificação de lipídios requer a exclusão de solventes de gordura comumente usados na inclusão em parafina para as colorações de hematoxilina e eosina rotineiras. A fim de identificar a gordura, foi necessário preparar secções teciduais congeladas de tecidos frescos. Então as secções foram coradas com *Oil Red-O*, conferindo uma cor vermelho-alaranjada aos lipídios presentes.

Após a retirada do excesso de tecido conjuntivo perivascular do arco aórtico, com auxílio de pinças ponto-reta (INOX, nº 2 e 5) e de um estereomicroscópio (ausJENA, Alemanha), fez-se com um bisturi a secção transversa do vaso imediatamente antes do início do tronco braquiocefálico direito e imediatamente após a carótida comum esquerda, de forma que a análise histológica se detivesse à região

compreendida entre estas ramificações da aorta, um dos principais sítios das terminações barorreceptoras (figura 7-A). O arco aórtico foi então emblocado em gelatina incolor (Dr. Oetker, Brasil) a 24% e posteriormente congelados. O bloco de gelatina contendo o segmento da aorta foi posicionado para que se obtivessem cortes transversos com 8 μm de espessura em um criostato (Jung CM 1800 – Leica, figura 7-B) a -16°C , de modo que o início dos cortes se desse do lado do tronco braquiocefálico direito. Os cortes teciduais foram feitos em quadruplicata, e posicionados em lâminas de vidro preparadas adequadamente para adesão do tecido. A maior parte dos cortes foi destinada para coloração com *Oil Red-O*, uma outra parte para coloração com hematoxilina-eosina (HE), outra para *Verhoeff* que cora fibras elásticas.

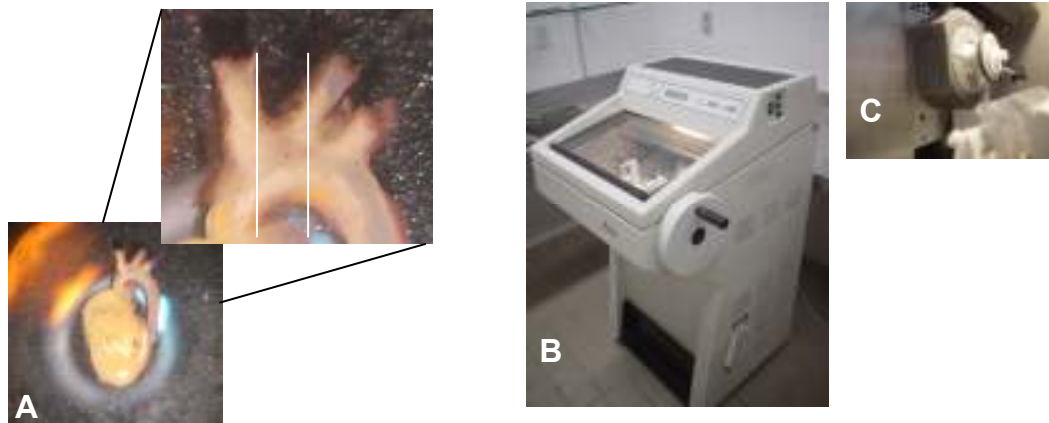


Figura 7: A figura A mostra o coração e a aorta após a retirada do tecido conjuntivo excedente, e em maior aumento, o arco aórtico, no qual as barras brancas indicam a região selecionada para a realização dos cortes. Em B, vemos o criostato Jung CM 1800 – Leica, pertencente ao Departamento de Patologia do Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo. C mostra o bloco de gelatina posicionado pronto para a obtenção de cortes transversos da aorta.

As lâminas histológicas foram lavadas com água quente ($\approx 45^{\circ}\text{C}$) e detergente por cerca de 30 minutos, seguindo de diversas lavagens somente com água quente e finalmente recobertas por uma solução de gelatinização (500 mL de água destilada, 5 g

de gelatina incolor e 0,5 g de sulfato de crômio potássio/ $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2$) para que ocorresse adesão dos cortes na mesma. As lâminas permaneceram nessa solução a temperatura de 50 °C por 2 minutos e posteriormente foram secadas em uma estufa a temperatura de 45 °C por um período de no mínimo 24 horas.

Os cortes teciduais foram corados com *Oil Red-O* (*Sigma-Aldrich*) para detecção de lipídios neutros. A solução de estoque foi preparada contendo 300 mg de *Oil Red-O* em 100 ml de 2-propanol ou isopropanol (Reagentes Analíticos, Dinâmica), e a solução para corar contendo 24 ml de *Oil Red-O* do estoque e 16 ml de água destilada misturados por 10 minutos, centrifugados e filtrados. As lâminas contendo os cortes foram posicionadas a uma altura de cerca de 2 mm da superfície de um recipiente fechado, para evitar a evaporação do solvente, de forma a se criar então uma interface líquida (solução de *Oil Red-O*) entre o vidro da lâmina e do recipiente. Este posicionamento permite que precipitados cristalinos formados se depositem no fundo do recipiente, e não na lâmina, sendo esta formação de precipitados do corante um grande inconveniente dessa coloração. Também, para minimizar esse problema a solução de *Oil Red-O* para coloração foi centrifugada por um período de 2,5 minutos a 4000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415D). Os cortes ficaram em contato com o corante por 10 minutos, e posteriormente também foram lavados em água corrente por mais cerca de 10 minutos.

A coloração com hematoxilina-eosina (HE) também foi realizada, de modo que os tecidos são corados em azul-arroxeados as estruturas basófilas e em róseo-avermelhado as estruturas acidófilas. Sendo que os cortes teciduais foram expostos primariamente a eosina por 10 minutos, em seguida lavados por mais 10 minutos; e novamente corados com hematoxilina por 5 minutos, seguido da lavagem em água corrente por cerca de 10 minutos. O método de *Verhoeff* foi empregado para visualização das estruturas elásticas vasculares, corando em azul intenso escuro a preto as fibras e lâminas elásticas, e quando empregado a floxina (0,5%), as demais estruturas aparecem em vermelho. Os cortes ficaram expostos por 15 minutos ao *Verhoeff* e foram mergulhadas em solução de FeCl_3 a 2% por 10 segundos e então lavadas em água corrente por mais 15 minutos.

Ao término da impregnação por corantes dos cortes, realizou-se a montagem para preservação dos cortes, de forma que uma solução de montagem específica, constituída de glicerol em PBS e azida sódica 0,1% (*mounting medium*, Sigma[®]), banhava os cortes e uma lamínula de vidro (24 x 60 mm, nº 1, Herka[®], Alemanha) cobria a lâmina. A borda entre a lamínula e a lâmina que continha os cortes foi coberta com esmalte incolor para evitar a evaporação da solução de montagem.

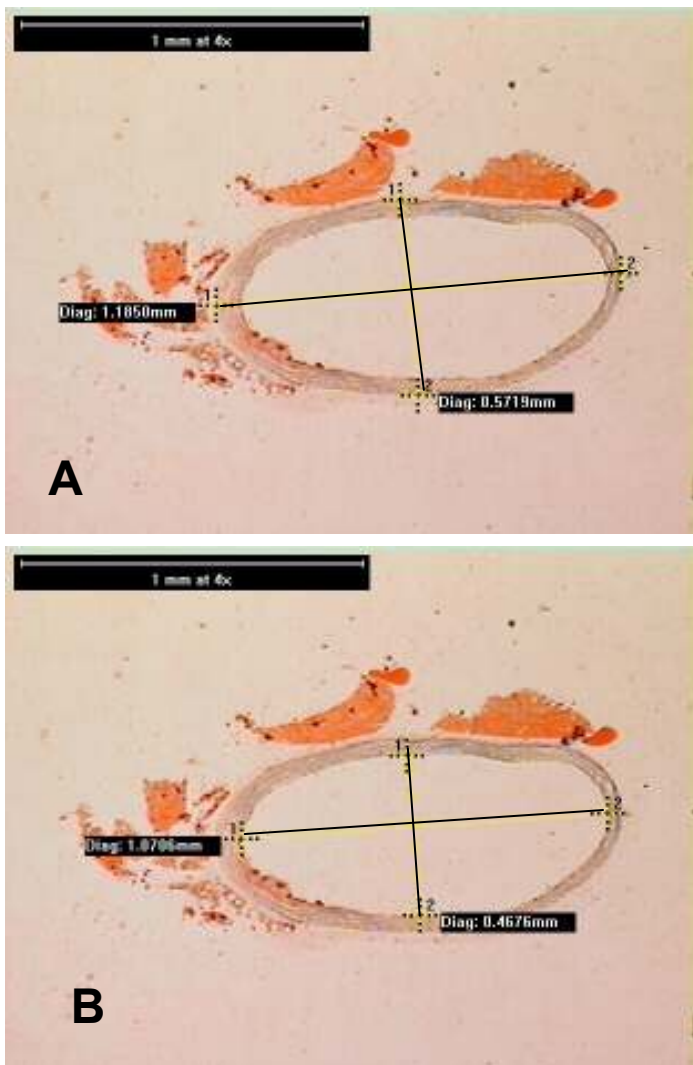
3.5 Análise Morfométrica

Com uso de um microscópio trinocular (Olympus AX70, figura 8) acoplado a uma câmara digital (VK-C150, Hitachi, Japão) fez-se a captura de imagens das lâminas, e estas foram analisadas em programas de imagem específicos (Leica EWS 2100 e Image J). Esses procedimentos foram efetuados no Departamento de Morfologia do Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo. Para a captura das imagens foram utilizadas objetivas de 4x e 40x, de modo que a ampliação final real na tela do monitor (13") foi igual a 126x e 1260x respectivamente. Todas as imagens obtidas foram de 640x480 *pixels*, e foram analisados 10 cortes de cada animal.



Figura 8: Microscópio trinocular da marca Olympus[®], modelo AX70, pertencente ao Departamento de Morfologia do Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo.

Para as medições das imagens capturadas com a objetiva de 4x, utilizou-se o programa Leica EWS 2100. Sendo analisadas 10 cortes transversos por animal nesse aumento, o que fez um total de 440 imagens. Através das ferramentas oferecidas pelo programa Leica EWS 2100 fez-se a medida de 4 diâmetros. Devido à forma elíptica do vaso, e assim existirem diferentes diâmetros, foi necessário calcular a média dos diâmetros para que se obtivesse a área da secção transversal do vaso e da luz vascular, para que indiretamente fosse realizada a medida da área de parede do vaso. Foram utilizados 2 diâmetros para o cálculo da AST_v (figura 9-A), sendo estes o de maior e menor diâmetro da elipse, que vão do limite da lâmina elástica externa (divisão entre as camadas adventícia e média) de um lado ao lado contra-lateral do vaso. Em seguida após a obtenção da média dos diâmetros, fez-se a divisão do diâmetro por 2 para obtenção do raio (r) do vaso, e assim pudesse ser calculada a área do círculo com a fórmula: $A = \pi \cdot r^2$. Outros autores simplificam em um só cálculo esse procedimento, através da fórmula: $\pi \cdot \left\{ \frac{(D + d)}{2} \right\}^2$ (Schiffirin & Hayoz, 1997; Rocha, 2003), sendo D o diâmetro maior e d o diâmetro menor da elipse. O mesmo procedimento foi realizado para o cálculo da área da luz, porém os diâmetros limitaram-se de um bordo ao outro oposto do endotélio vascular (figura 9-B). As duas áreas foram calculadas isoladamente, obtendo-se uma área total que contém a área de parede somada com a área da luz (AST_v), e a área da luz vascular (AST_L). A área de parede, contendo as camadas média e íntima, foi determinada pela diferença entre essas duas áreas (AST_p).



$$\bar{X}_D = \frac{D + d}{2}$$

$$r = \frac{\bar{X}_D}{2}$$

$$A = \pi \cdot r^2$$

Onde:

\bar{X}_D = média dos diâmetros

D = maior diâmetro

d = menor diâmetro

π = PI = 3,14

r = raio

Figura 9: As fotomicrografias mostram as ferramentas do programa Leica ESW, para a determinação do diâmetro vascular. Em A observam-se os dois diâmetros externos, com seus respectivos comprimentos, para a determinação da área de secção transversa. E em B vemos os dois diâmetros para a determinação da área do lúmen vascular.

Para comprovar o padrão de remodelamento vascular, e eliminar a interferência de outros parâmetros ponderais, faz-se necessário a realização de relações para obtenção de índices. Não foi necessária a correção pelo peso corporal através da relação da AST arterial pelo peso corporal, uma vez em que não houve diferença estatística entre o peso nos diferentes grupos. Porém, foi determinada a relação parede-luz (p:l). Para o cálculo da razão p:l, realizou-se a divisão entre a espessura da parede pelo diâmetro do lúmen. A espessura da parede foi calculada pela diferença

entre a média dos diâmetros utilizados para o cálculo da AST_v (até a lâmina elástica externa) pela média dos diâmetros utilizados para o cálculo da AST_L ($XDex - XDin$). De modo que a razão $p:l$ foi encontrada pela seguinte fórmula:

$$p:l = \frac{XDex \text{ (mm)} - XDin \text{ (mm)}}{XDin \text{ (mm)}}$$

Também se calculou a razão de remodelamento ou índice de remodelamento (RR), através da razão entre a AST_v dos animais controles (*sham*) pela AST_v dos respectivos animais 2R1C. Sendo considerado remodelamento positivo quando o $RR > 1,05$; a ausência de remodelamento quando o RR entre 0,95 e 1,05; e o remodelamento negativo, quando o $RR < 0,95$ (Pasterkamp *et alii*, 1995a; Schoenhagen *et alii*, 2000; Yang *et alii*, 2003). Passando esses valores do RR para percentual temos: ausência de remodelamento quando o RR está entre 95 e 105; $RR > 105$ indica remodelamento positivo e o $RR < 95$ indica remodelamento negativo.

Utilizando-se o programa Image J foi quantificada diretamente a área de deposição de lipídios na parede vascular, incluindo as camadas média e íntima, os resultados foram expressos em μm^2 . Devido à idade jovem dos animais, as lesões foram pouco evidentes na maioria dos casos e de difícil quantificação para aumentos menores sendo, portanto esta medida com a objetiva de 40x importante para o fornecimento de dados mais precisos quanto ao início da formação e área real das lesões. Nesse aumento foram selecionados 6 campos de cada corte (figura 10), sendo sempre selecionados os campos com maior deposição de lipídios. Perfazendo um total de 60 imagens por animal, visto que foram analisados 10 cortes, e 2640 imagens no total para este estudo utilizando-se a objetiva de 40x.

Achados histológicos típicos que possam envolver o remodelamento vascular também foram documentados.

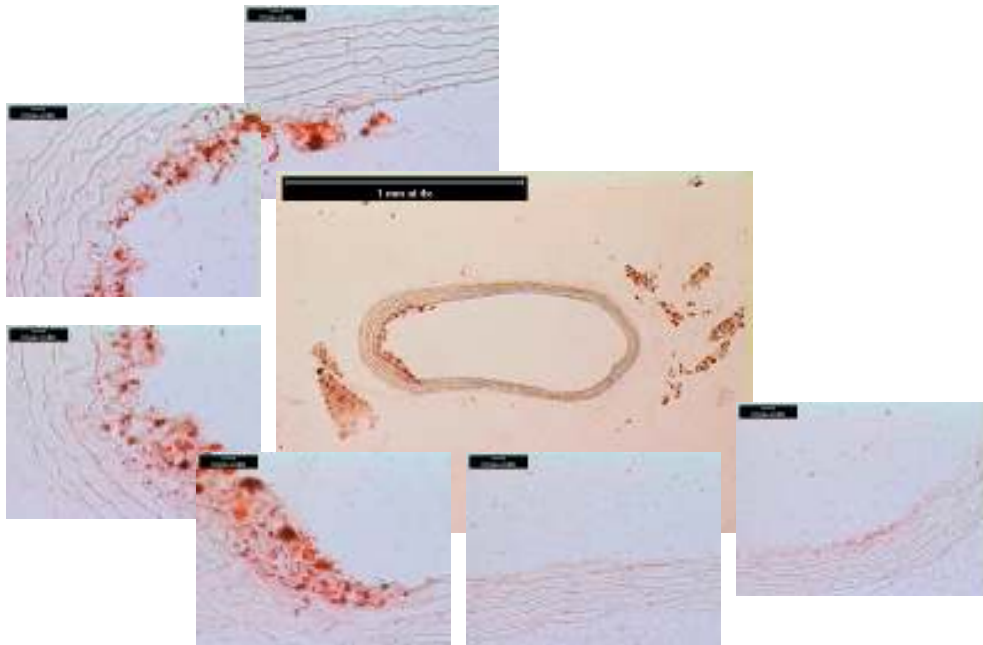


Figura 10: A figura central mostra um corte transversal da aorta de um camundongo apoE-Sham com a objetiva de 4x. As outras seis imagens, realizada com a objetiva de 40x, mostram os pontos de maior deposição de lipídios na parede vascular. A barra com a objetiva de 4x corresponde a 1 mm, enquanto que a barra nas outras seis imagens obtidas com a objetiva de 40x correspondem a 10 μm .

3.6 Medidas de tensão e estresse de parede

Posteriormente foram determinados parâmetros funcionais, como a tensão de parede e estresse parede, para verificar os efeitos do envolvimento entre aterosclerose e angiotensina II, proveniente da hipertensão 2R1C, na modulação desses parâmetros. A tensão de parede (T), que é a força exercida pela parede vascular para resistir à deformação promovida por uma determinada pressão, está relacionada diretamente com o diâmetro vascular (Brekke, 2002). Neste estudo, a tensão de parede foi determinada simplificada pela lei de Laplace:

$$T = P \times r$$

Onde,

T = tensão de parede;

P = PAM (mm Hg) na qual o vaso foi fixado;

r = raio do vaso (mm), encontrado através da divisão por dois da média dos diâmetros do lúmen.

A tensão de parede é calculada pela multiplicação da pressão transmural pelo raio, onde a pressão transmural é a diferença entre a pressão arterial pela pressão tecidual. Porém, a pressão transmural foi considerada como sendo a PAM do animal, uma vez que a PAM foi a pressão para realização da perfusão e fixação do vaso. Visto que para a realização da perfusão o animal se encontrava com uma grande incisão no tórax, e este exposto à pressão ambiental no nível do mar, que é o marco zero para comparação das pressões corporais, a pressão tecidual foi considerada como zero.

O estresse de parede (σ) é definido como a força exercida sobre o material dividido pela área sobre a qual a força é exercida (Schifrin & Hayoz, 1997; Brekke, 2002). Neste estudo considerou-se o estresse de parede como sendo a força que a estrutura de uma artéria, mais especificamente a área de secção transversa da parede vascular (AST_p – que engloba as camadas média-íntima), exerce sobre a parede do vaso em resposta a uma determinada tensão. Dessa forma, o estresse de parede leva em conta espessura da parede e é definido como:

$$\sigma = \frac{T}{h}$$

Onde,

σ = estresse de parede;

T = tensão de parede;

h = espessura da parede, ou a AST_p .

3.7 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm EPM. As médias dos valores foram analisadas estatisticamente utilizando-se análise de variância (ANOVA) de uma via, completamente randomizadas, seguida do teste *post hoc* de Fisher. O teste *t* de

Student foi utilizado para comparação quando desejada entre 2 amostras, sejam elas pareadas (teste *t* pareado) ou independentes. As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

3.8 Protocolo Experimental

Cortes de um segmento específico da aorta de animais com a mesma faixa de peso e idade, foram analisados histologicamente. Corantes específicos foram utilizados com diferentes finalidades. A análise deste estudo visou responder as seguintes questões:

1- Quais são as alterações morfométricas e morfológicas encontradas no arco aórtico no camundongo apoE (aterosclerótico)?

Para isso, foram comparados os animais C57 com os animais apoE^{-/-}. Visto que a linhagem apoE^{-/-} é derivada dos animais isogênicos C57. Baseado na literatura, através da impregnação com *Oil-Red-O*, buscou-se a detecção de lesões ateroscleróticas em formação; e através da análise morfométrica, um possível remodelamento vascular na idade estudada, uma vez que sabidamente a aterosclerose leva ao remodelamento vascular.

2- Quais são as alterações morfométricas e morfológicas encontradas no arco aórtico do camundongo com hipertensão 2R1C?

Tendo em vista os efeitos proliferativos e hipertensivos da Ang-II, buscou-se confrontar os dados encontrados na literatura, para o remodelamento positivo encontrado na aorta de camundongos C57-2R1C. Para isso, compararam-se os animais C57-Sham com os animais C57-2R1C.

3- Qual a influência da associação entre a aterosclerose e hipertensão renovascular 2R1C na morfologia e no remodelamento vascular do arco aórtico?

Dados epidemiológicos mostram que a hipertensão arterial sistêmica é um dos principais fatores de risco para a aterosclerose. Visto a ausência de dados na literatura com relação ao remodelamento vascular associando essas doenças, fez-se necessário este estudo através da comparação entre os modelos experimentais apoE-sham e apoE-2R1C.

4- RESULTADOS



4. Resultados

4.1. Valores Basais de Pressão Arterial Média e de Frequência Cardíaca em Camundongos com Hipertensão Experimental Renovascular 2R1C

Conforme o esperado, a figura 11 mostra que a técnica para a produção da hipertensão renovascular 2R1C em camundongos causou uma elevação significativa da PAM basal em aproximadamente 24 mm Hg, tanto nos animais C57-2R1C ($128 \pm 2,6$ mm Hg) quanto nos animais apoE-2R1C ($126 \pm 2,6$ mm Hg), quando comparados com os valores encontrados nos seus respectivos controles *sham* ($103 \pm 2,1$ e $104 \pm 2,1$ mm Hg). Não há diferenças estatísticas da PAM basal quando comparamos os grupos C57BL/6 e apoE^{-/-}, evidenciando que a aterosclerose na idade estudada (12-14 semanas) não agravou a hipertensão renovascular 2R1C nos camundongos apoE^{-/-}.

Os valores basais de frequência cardíaca seguem o mesmo padrão da PAM, visto que a hipertensão renovascular 2R1C causou taquicardia, tanto no grupo C57-2R1C (633 ± 26 bpm) quanto no grupo apoE-2R1C (576 ± 27 bpm) quando comparado com os respectivos animais *sham* (C57 = 499 ± 19 bpm; apoE^{-/-} = 500 ± 22). Não havendo diferenças entre os grupos C57BL/6 e apoE^{-/-}.

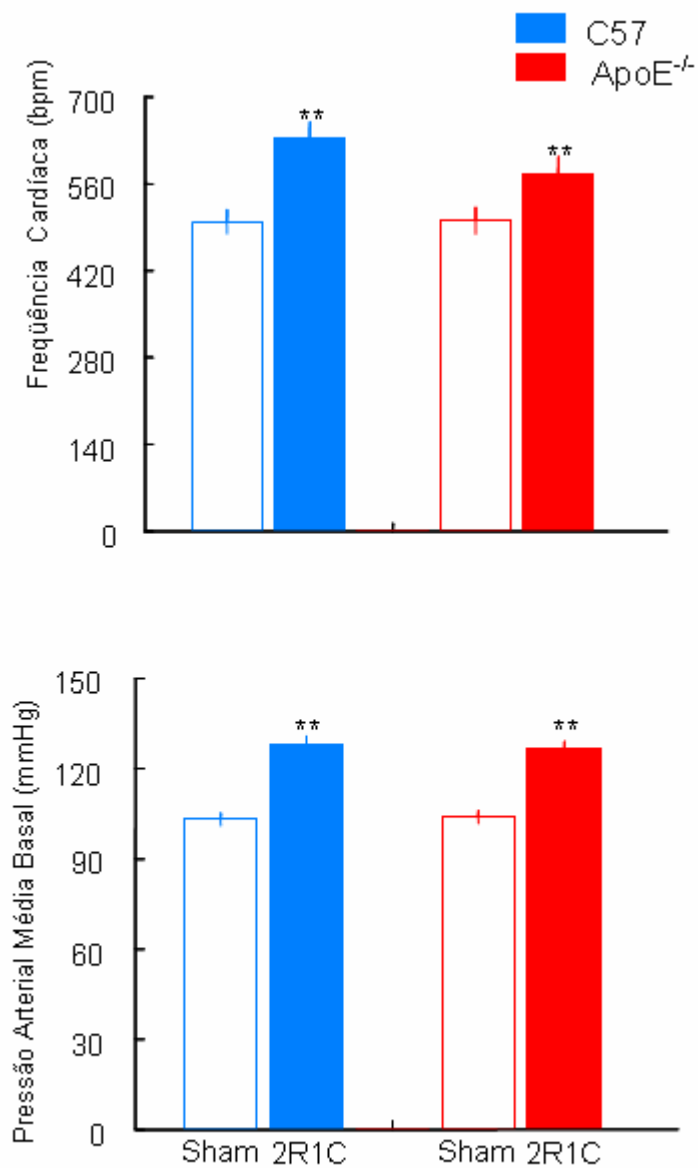


Figura 11: Valores basais de PAM (mm Hg) e de FC (bpm) de camundongos C57BL/6 (n=11) e apoE^{-/-} (n=12) normotensos (*sham*) e hipertensos (C57-2R1C, n=11; apoE-2R1C, n=12) após 28 dias de estenose da artéria renal. Os valores indicam média \pm EPM. ** p<0,01.

4.2 Área de Secção Transversal Vascular (ASTv)

No gráfico mostrado da figura 12, podemos observar mudanças ocorridas na área de secção transversal dos vasos (área contida nos limites da lâmina elástica externa), de modo que há aumento da área do arco aórtico nos animais com hipertensão renovascular C57-2R1C quando comparados com seu respectivo controle C57-*Sham*. Porém, não houve uma diferença estatística quando comparado o animal apoE-2R1C com seu controle apoE-*Sham*. Os valores da AST_v não foram diferentes entre o grupo C57-2R1C ($0,75 \pm 0,05 \text{ mm}^2$) quando comparado com o grupo de camundongos ateroscleróticos apoE-2R1C ($0,73 \pm 0,03 \text{ mm}^2$). Também não houve diferenças estatísticas entre os grupos controles normotensos, com valores: C57-*Sham* = $0,65 \pm 0,02 \text{ mm}^2$; apoE-*Sham* = $0,68 \pm 0,04 \text{ mm}^2$.

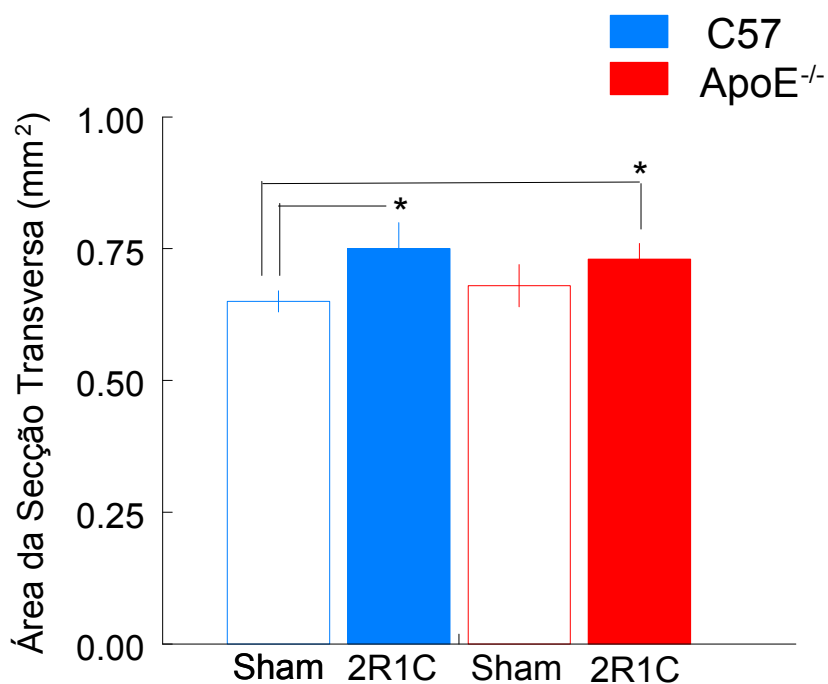


Figura 12: Área de secção transversal do arco aórtico, dos animais C57-*Sham* (n = 11) e apoE-*Sham* (n = 12), e dos animais hipertensos C57-2R1C (n = 11) e apoE-2R1C (n = 11). Os valores indicam média ± EPM. * p<0,05.

Na figura abaixo (figura 13) podemos observar cortes típicos da aorta, ilustrando a diferença na área vascular transversa, seguindo o padrão exposto no gráfico de barras. Na figura 14, estão traçados os dois diâmetros no limite da lâmina elástica externa, respectivo a cada corte, para determinação da AST_v .

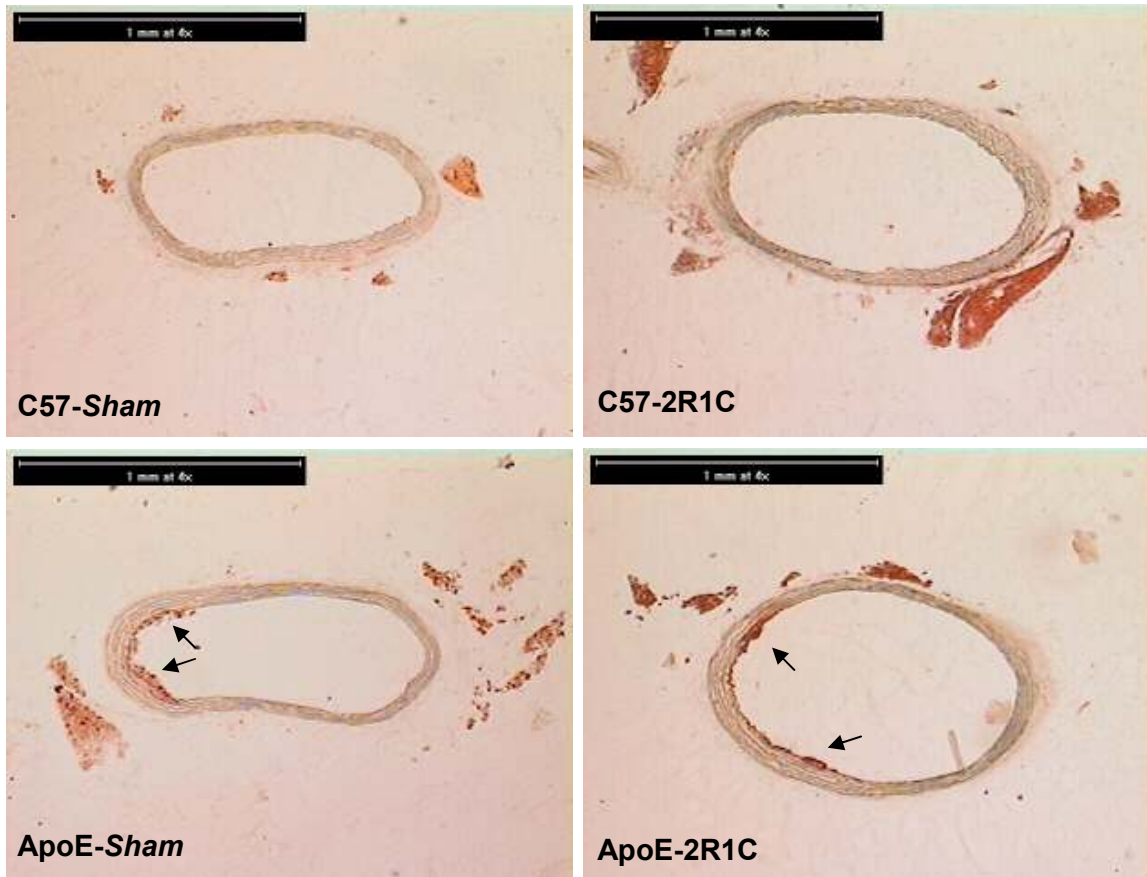


Figura 13: Cortes transversais típicos da aorta dos camundongos C57BL/6 e apoE^{-/-} normotensos e hipertensos, corados com *Oil-Red-O*. As setas apontam para lesões ateroscleróticas. A barra branca, contida no retângulo preto, possui 1 mm na fotografia realizada com a objetiva de 4x.

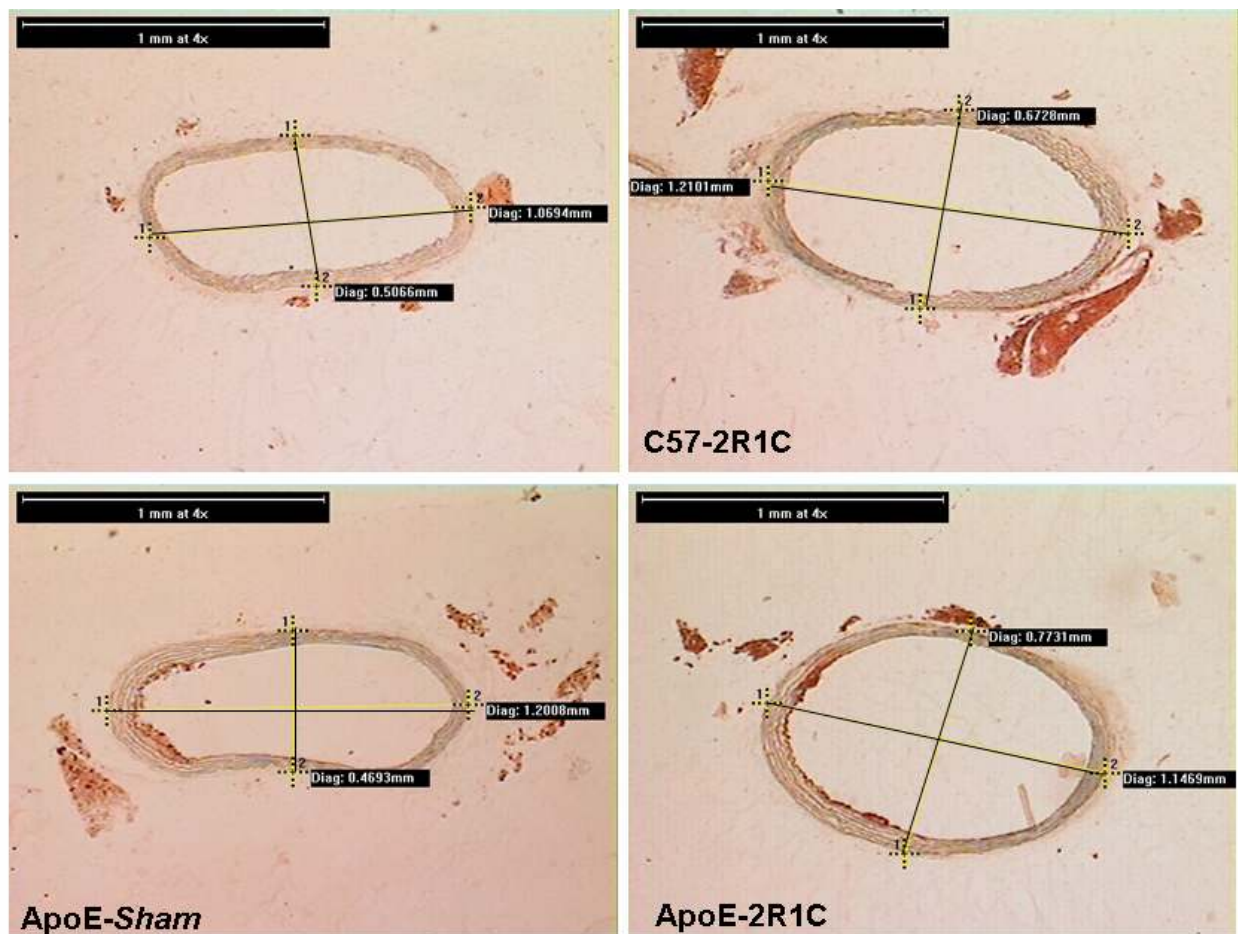


Figura 14: Cortes transversais típicos da aorta dos camundongos C57BL/6 e apoE^{-/-} normotensos e hipertensos, corados com *Oil-Red-O*. Os traços representam os diâmetros com seus respectivos valores, obtidos através das ferramentas do programa Leica EWS 2100. A barra branca, contida no retângulo preto, possui 1 mm na fotografia realizada com a objetiva de 4x.

4.3 Área de Secção Transversal da Luz Vascular (AST_L)

A área de seção transversal da luz do arco aórtico somente foi significativamente diferente entre os animais C57-*Sham* ($0,50 \pm 0,02 \text{ mm}^2$) e C57-2R1C ($0,57 \pm 0,04 \text{ mm}^2$). Os valores encontrados nos subgrupos apoE-*Sham* e apoE-2R1C foram respectivamente $0,51 \pm 0,03 \text{ mm}^2$ e $0,54 \pm 0,02 \text{ mm}^2$ (figura 15).

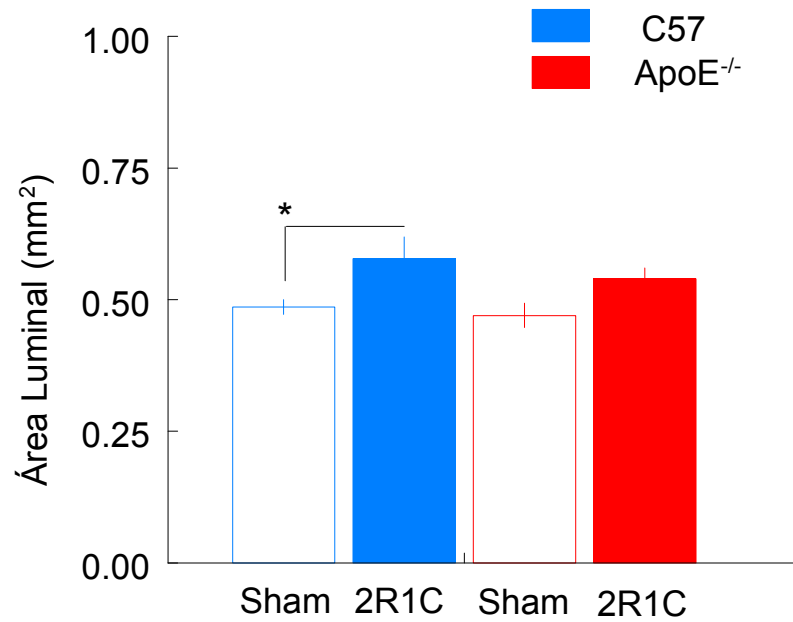


Figura 15: No gráfico da área de secção transversal do lúmen do arco aórtico, em mm², dos animais C57-*Sham* (n = 11) e apoE-*Sham* (n = 12), e dos animais hipertensos C57-2R1C (n = 11) e apoE-2R1C (n = 11). Os valores indicam média \pm EPM. * p<0,05.

A figura 16 mostra os cortes típicos da aorta, com os diâmetros que se limitaram de um bordo ao outro oposto do endotélio vascular. Para que posteriormente se realizasse o cálculo da AST_L.

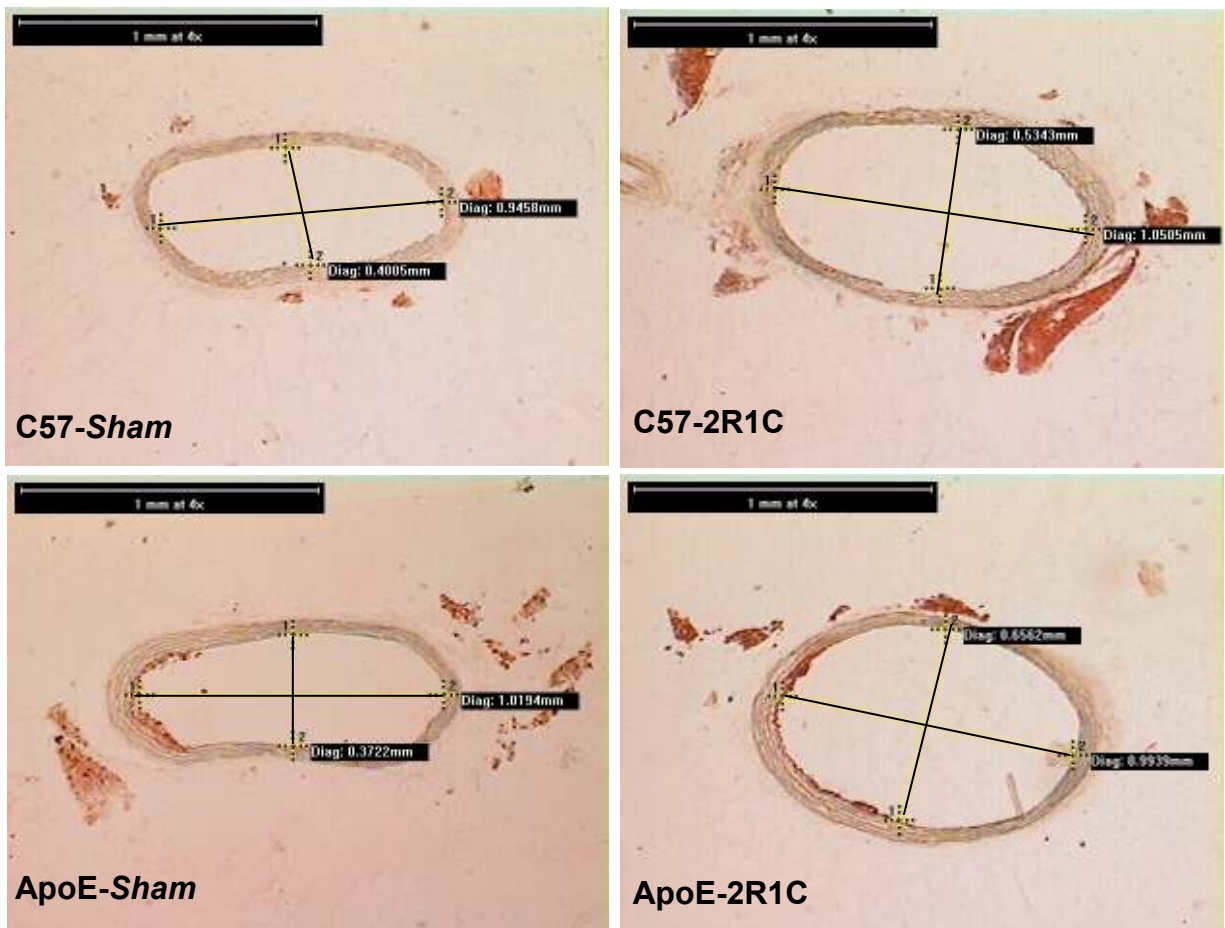


Figura 16: Os mesmos cortes da figura 14, porém os traços representam os diâmetros utilizados para o cálculo da AST_L , obtidos através das ferramentas do programa Leica EWS 2100. Objetiva de 4x.

4.4 Área de Secção Transversal da Parede Vascular (AST_p)

O gráfico de barras, da figura 17, ilustra as diferenças de AST_p encontradas entre os diferentes grupos. Quando comparado o grupo *C57-Sham* ($0,15 \pm 0,005 \text{ mm}^2$) com o grupo *C57-2R1C* ($0,18 \pm 0,01 \text{ mm}^2$) observa-se uma elevada significância ($p < 0,01$), de forma que a hipertensão gerada pela ativação do sistema renina-angiotensina aumentou a AST_p dos animais. A presença da aterosclerose implicou no aumento da espessura da parede vascular, havendo diferença estatística entre os grupos controles (*C57-Sham* = $0,15 \pm 0,005 \text{ mm}^2$ vs *apoE-Sham* = $0,17 \pm 0,01 \text{ mm}^2$; $p < 0,05$). Quando comparado os animais ateroscleróticos, observamos um efeito aditivo

da hipertensão 2R1C sobre a aterosclerose do controle normotenso (apoE-*Sham* = $0,17 \pm 0,01 \text{ mm}^2$, apoE-2R1C = $0,19 \pm 0,01 \text{ mm}^2$; $p < 0,05$). Não foi observado diferença entre os valores da AST_p entre os grupos hipertensos renovasculares.

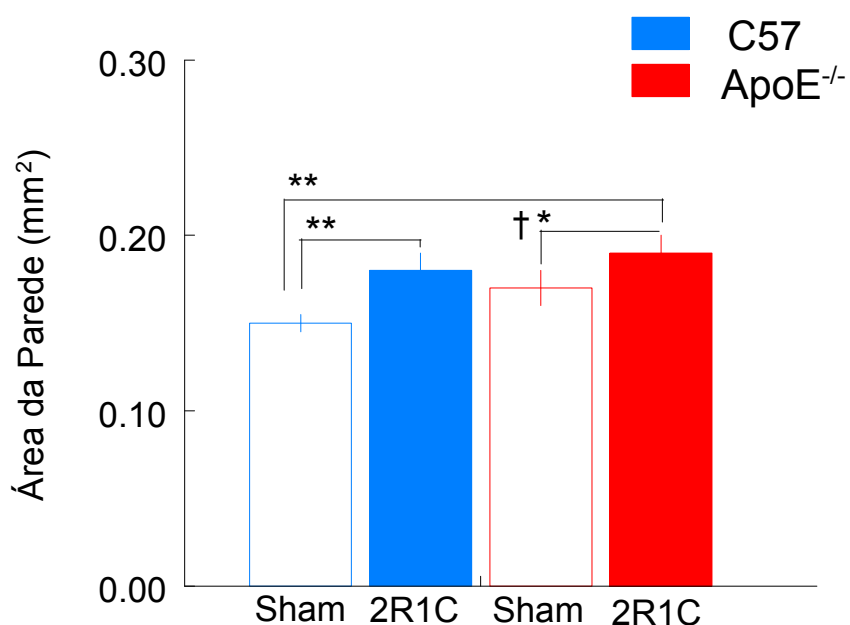


Figura 17: No gráfico observa-se a área de secção transversal da parede vascular dos diferentes grupos animais C57-*Sham* (n = 11) e apoE-*Sham* (n = 12), e dos animais hipertensos C57-2R1C (n = 11) e apoE-2R1C (n = 11). Os valores indicam média \pm erro padrão da média. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; † $p < 0,05$ vs C57-*Sham*.

4.5 Relação *Parede:Luz* (p:l)

A relação p:l está representada na tabela abaixo. De modo que a relação tende a estar aumentada nos grupos C57-2R1C, apoE-*Sham* e apoE-2R1C quando comparados com o controle C57.

Tabela 2 - Razão parede:luz (p:l)

Grupos (n)	p:l
C57-Sham (11)	0,14±0,01
C57-2R1C (11)	0,18±0,03
apoE-Sham (12)	0,17±0,01
apoE-2R1C (11)	0,16±0,01

Dados expressos em média ± EPM

4.6 Razão ou Índice de Remodelamento (RR)

O índice de remodelamento tem como referência a AST_v do animal C57-*Sham*. Por isso, seu valor é considerado como 100±5%, sendo este o padrão da normalidade. Lembrando-se que é considerado como remodelamento positivo quando o RR > 105; a ausência de remodelamento quando o RR entre 95 e 105; e o remodelamento negativo, quando o RR < 95. A média dos animais C57-2R1C mostra um aumento de 9,97% em relação ao controle normotenso, o que confirma o padrão de remodelamento positivo desses animais. Quatro animais (ver tabela em anexo) do grupo apoE-*Sham* mostraram um RR de padrão positivo. O grupo apoE-2R1C mostra um aumento de 7,17% em relação ao controle normotenso C57. Tomando-se como referência o grupo apoE-*Sham*, o RR do grupo apoE-2R1C mostra um aumento de apenas 2,75% (3ª coluna da tabela 3).

Tabela 3- Índice de Remodelamento Vascular (RR)

Grupos	R:R	R:R
C57-Sham (11)	-	-
C57-2R1C (11)	114,97±7,91	-
apoE-Sham (12)	101,68±5,16	-
apoE-2R1C (11)	112,17±3,92	107,75±3,76

Dados expressos em média ± EPM

4.7 Área Transversal de Deposição de Lipídios na Parede Vascular (AST_{Lip})

As barras representadas na figura 18 demonstram a área dos lipídios corados pelo *Oil-Red-O*, dada em μm^2 . Os animais da linhagem C57BL/6 apresentam uma mínima área de lipídios corados, enquanto que os animais da linhagem apoE^{-/-} apresentam extensiva área marcada pelo corante. Não houve diferença estatística entre os grupos C57BL/6 (C57-*Sham* = $844,6 \pm 315,3 \mu\text{m}^2$; C57-2R1C = $1497,1 \pm 380,7 \mu\text{m}^2$), ou entre os grupos normotenso e hipertenso aterosclerótico (apoE-*Sham* = $67732,6 \pm 13462,4 \mu\text{m}^2$; apoE-2R1C = $81274,4 \pm 14751,2 \mu\text{m}^2$).

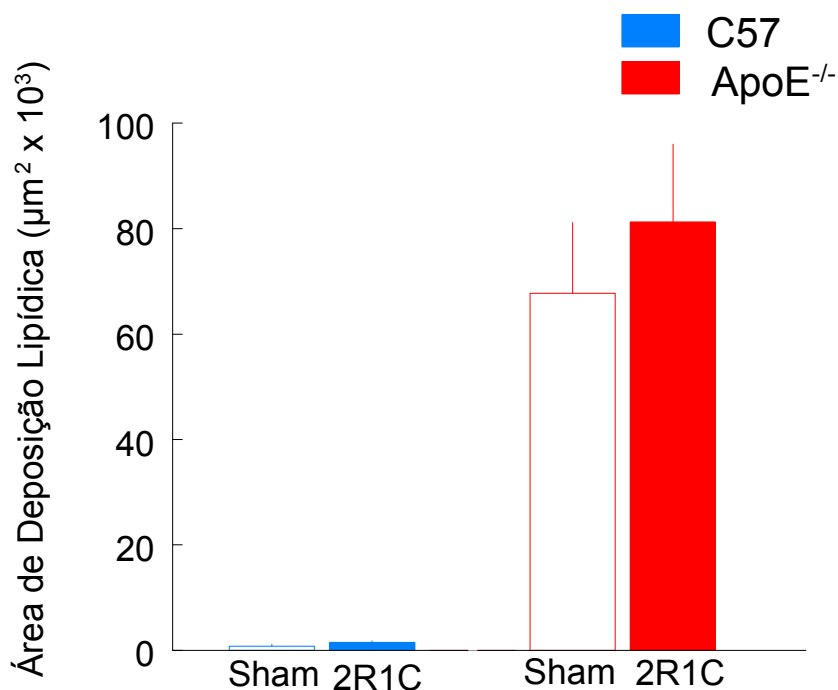


Figura 18: No gráfico observa-se a área transversal de deposição de lipídios na parede vascular dos diferentes grupos animais C57-*Sham* (n = 9) e apoE-*Sham* (n = 9), e dos animais

hipertensos C57-2R1C (n = 10) e apoE-2R1C (n = 9). Os valores indicam média \pm erro padrão da média.

4.8 Tensão de Parede (T)

A tensão de parede é a resistência da parede vascular à deformação em resposta a uma determinada pressão, e é influenciada pelo grau de estresse ao nível dos microfilamentos da parede vascular, sendo dada em unidade de força por área de parede. A análise deste parâmetro possibilitou o estudo da influência do sistema renina-angiotensina (HAS) sobre a função vascular, bem como as influências da aterosclerose em seus estágios iniciais. Neste estudo, os cálculos para medida da tensão e estresse de parede não refletem as flutuações durante o ciclo cardíaco, uma vez que para realização dos cálculos utilizou-se a PAM. A tabela 4 mostra os valores médios da tensão de parede nos deferentes grupos experimentais. E mostra que os animais hipertensos possuem aumento da tensão de parede; em menor proporção também se observa certo aumento da tensão nos animais ateroscleróticos normotensos.

Tabela 4 - Tensão de Parede (T)

Grupos	T (mm Hg/mm)
C57-Sham (11)	206 \pm 5
C57-2R1C (11)	309 \pm 11**
apoE-Sham (12)	264 \pm 9
apoE-2R1C (11)	310 \pm 6**

Dados expressos em média \pm EPM; **p < 0,01 vs respectivo controle (ANOVA)

4.9 Estresse de Parede (σ)

O estresse de parede é a força exercida pela parede vascular por unidade de área, que tem como objetivo manter o grau de tensão, principalmente ao nível da

camada média vascular, em resposta as alterações de pressão arterial. O estresse neste nível normaliza a tensão de parede. Com o objetivo de verificar se o aumento da tensão, promovida pela hipertensão 2R1C, manteve relação direta com o aumento da área de secção transversa da parede vascular, foi determinado o estresse de parede da aorta. A tabela 5 apresenta os valores do σ dos animais apoE^{-/-} e C57BL/6.

Tabela 5 - Estresse de Parede (σ)

Grupos	σ (mm Hg/mm²)
C57-Sham (11)	1733±69
C57-2R1C (11)	1762±129
apoE-Sham (12)	1585±90
apoE-2R1C (11)	1674±94

Dados expressos em média ±
EPM

4.10 Achados Morfológicos

4.10.1 C57-Sham

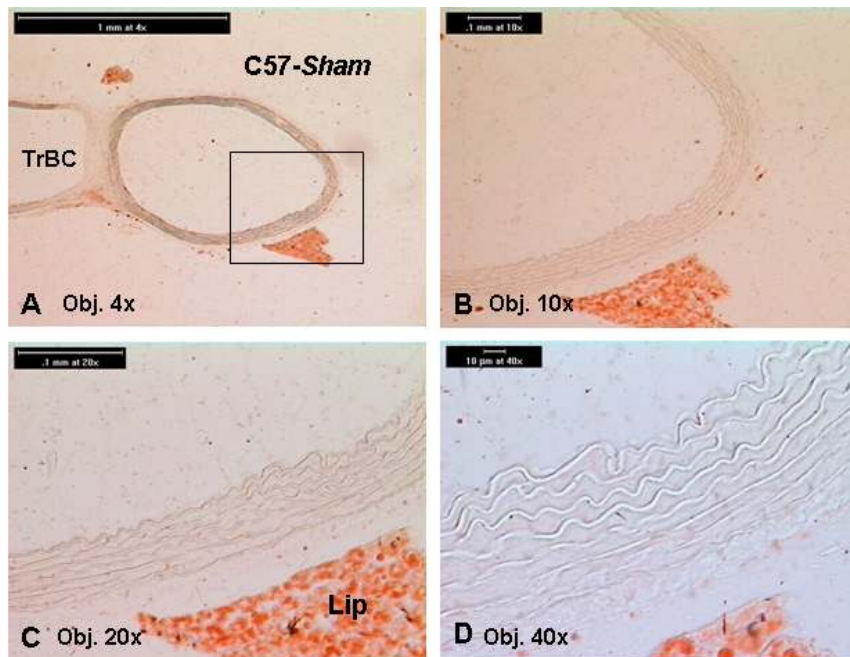


Figura 19: Animal C57-Sham (animal número 40) a partir da caixa (*box*). Na figura A é possível visualizar o tronco braquiocefálico direito (TrBC); e em C é possível visualizar melhor o lipídio perivascular (Lip). Note a integridade da estrutura vascular (figura D) sem deposição de lipídios ou outras alterações. Coloração *Oil-Red-O*.

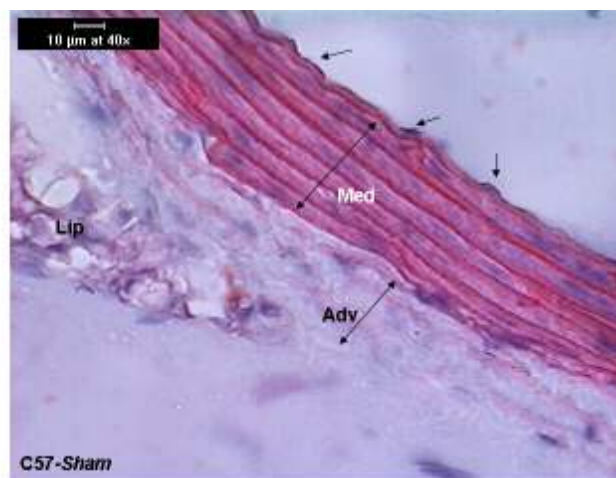


Figura 20: Segmento da aorta de C57-Sham (animal número 40). As 3 setas com apenas uma cabeça apontam para o núcleo de células endoteliais, da estreita camada íntima; Med representa a camada muscular média da artéria, Adv a camada adventícia e Lip o lipídio perivascular. Coloração HE, objetiva 40x.

4.10.2 C57-2R1C

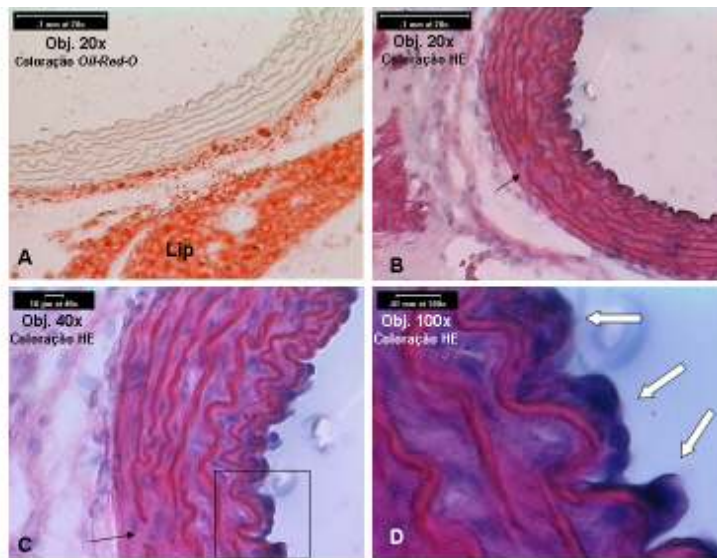


Figura 21: Segmento da aorta de C57-2R1C (animal número 50). Na imagem A pode ser observada a grande quantidade de lipídio perivascular (Lip), e a ausência de deposição lipídica nas camadas íntima e média. Na figura B e C a seta de cor preta indica uma descontinuidade da lâmina elástica. A caixa em C demarca a região amplificada na figura D, onde as setas brancas apontam para células endoteliais hipertróficas e com pequeno grau de hiperplasia quando comparado com C57-*Sham*.

4.10.3 ApoE-*Sham*

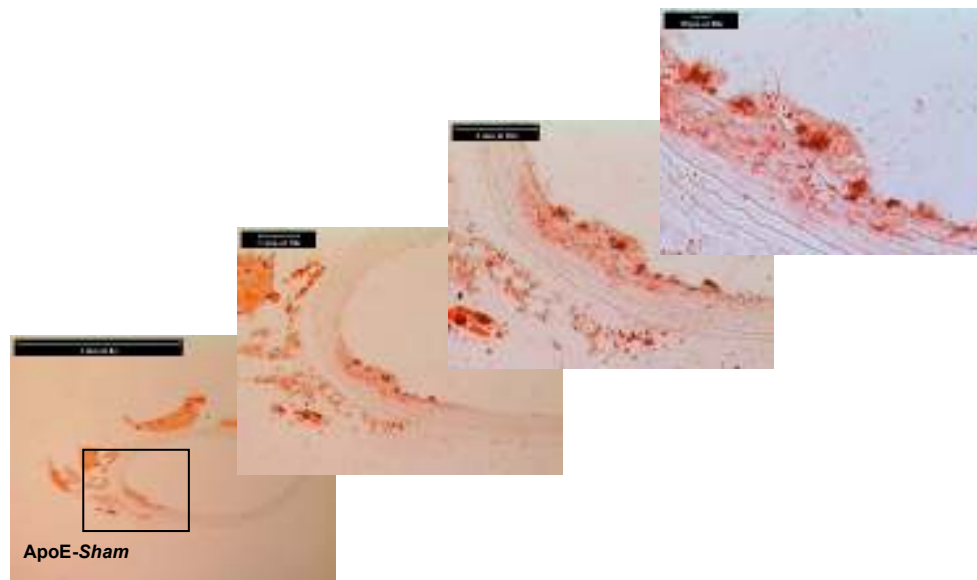


Figura 22: Seqüência de ampliação de uma lesão aterosclerótica de um animal apoE-*Sham* (animal número 37) a partir da caixa (*box*). As imagens seguem a seqüência das objetivas de 4x, 10x, 20x e 40x. Coloração *Oil-Red-O*.

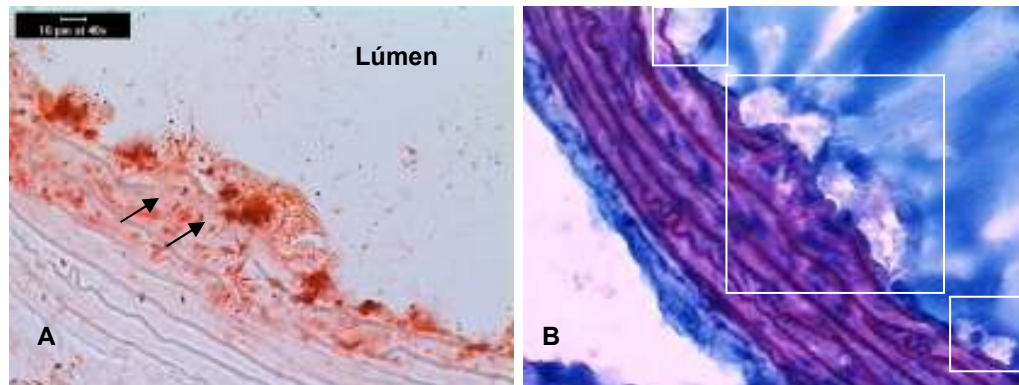


Figura 23: Fotomicrografia de cortes da aorta do mesmo animal apoE-*Sham* (animal número 37) com objetivas de 40x. Em A artéria foi corada com *Oil-Red-O*. As setas indicam ruptura da lâmina elástica interna, a impregnação dos lipídios pelo corante é vista na cor vermelho-alaranjado. Na figura B de um corte seqüencial da aorta corado com HE, pode ser visto nas caixas brancas células claras, devido ao elevado conteúdo de lipídio não corado (macrófagos/células espumosas), aderidas ao endotélio. Também é possível visualizar as várias e sinuosas lâminas elásticas que constituem a artéria de grande calibre.



Figura 24: Fotomicrografia do arco aórtico de animal apoE-*Sham* (animal número 37) corado com Verhoeff-floxina. As setas brancas indicam à ruptura de duas lâminas elásticas na região subjacente a lesão aterosclerótica. Objetiva de 100x com imersão em óleo.

4.10.4 ApoE-2R1C

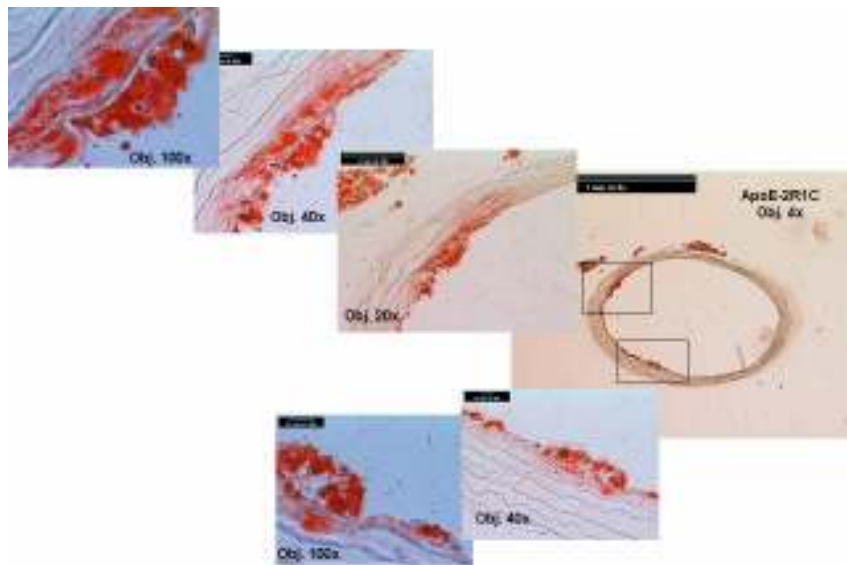


Figura 25: Seqüência de ampliação de duas lesões ateroscleróticas de um animal apoE-2R1C (animal número 58) a partir das caixas (*box*). As imagens foram realizadas com objetivas de 4x, 20x, 40x e 100x. As setas indicam ruptura da lâmina elástica interna. Coloração *Oil-Red-O*.

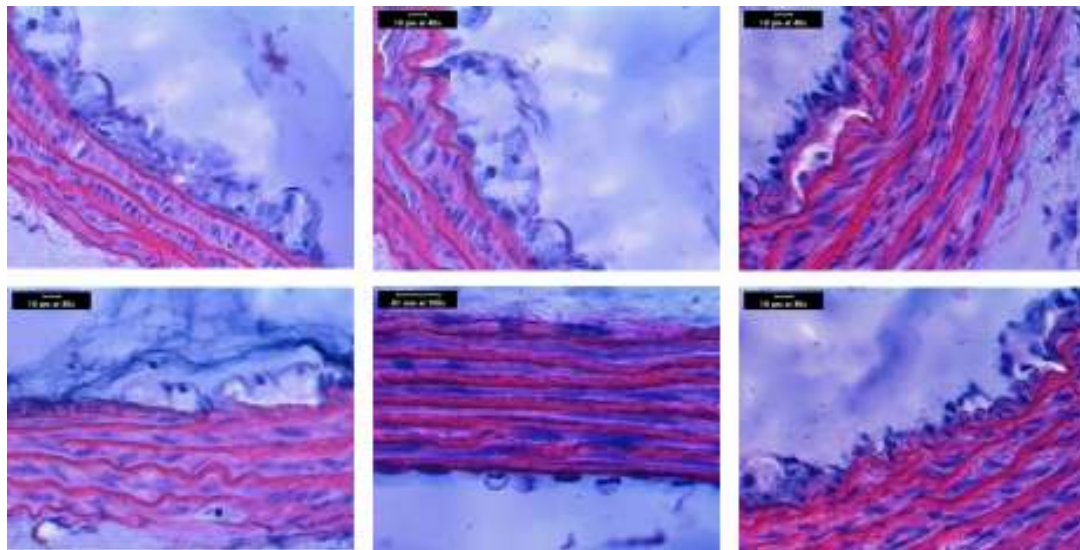


Figura 26: Setores da aorta de um animal apoE-2R1C (animal número 58), nos locais das lesões ateroscleróticas, coradas com HE. As imagens foram realizadas com objetiva 40x.

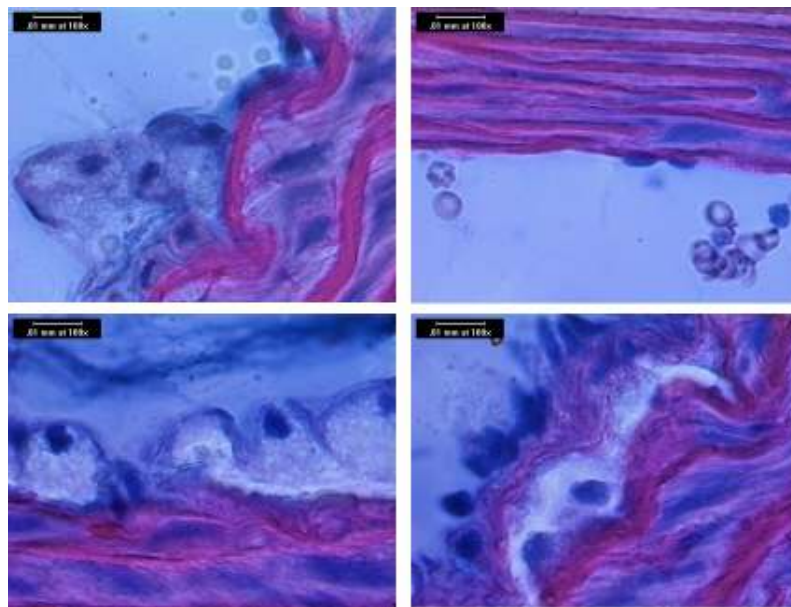
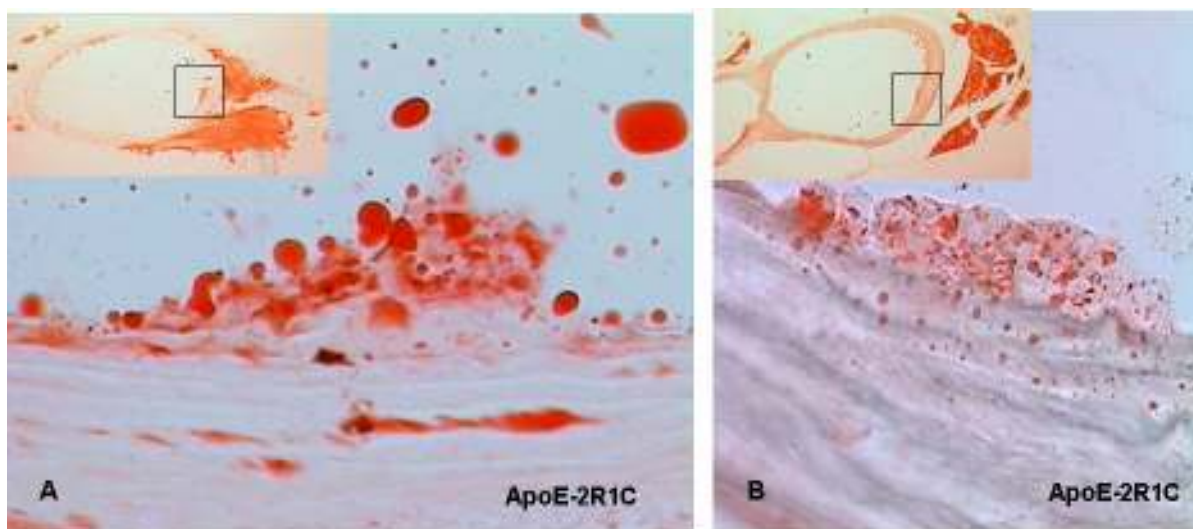


Figura 27: Imagens em maior aumento (objetiva de 100x) setores da figura anterior (figura 26) de animal apoE-2R1C (animal número 58). Coloração HE. É possível ver com maior detalhe as células inflamatórias envolvidas na formação da placa ateromatosa.



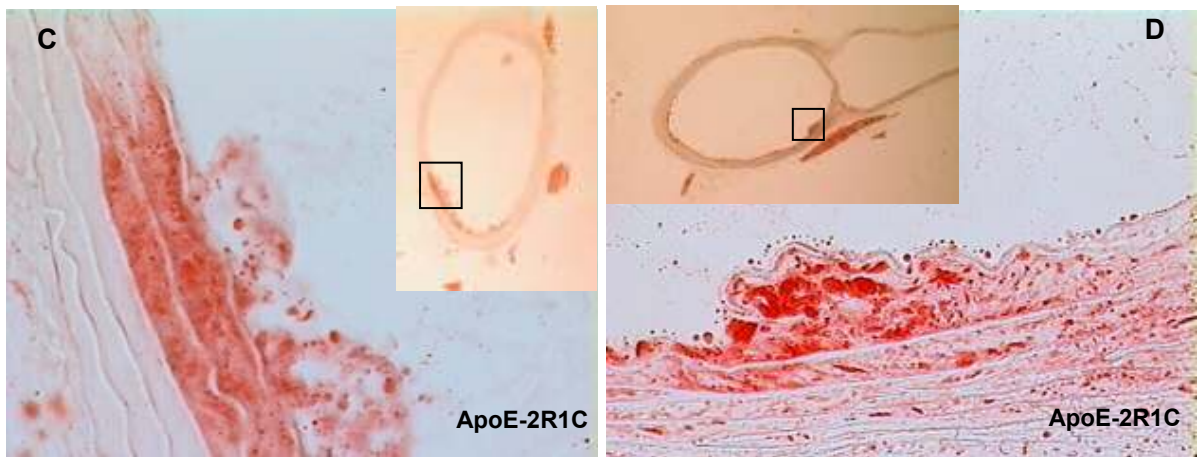


Figura 28: Imagens do arco aórtico de camundongos apoE-2R1C. Em A (animal 5) e em B (animal 20) é possível ver em maior detalhe as lesões ateroscleróticas coradas em vermelho-alaranjado. Em C (animal 43) e em D (animal 53) mostra a infiltração de lipídios na camada média (célula muscular lisa espumosa). Coloração *Oil-Red-O*.

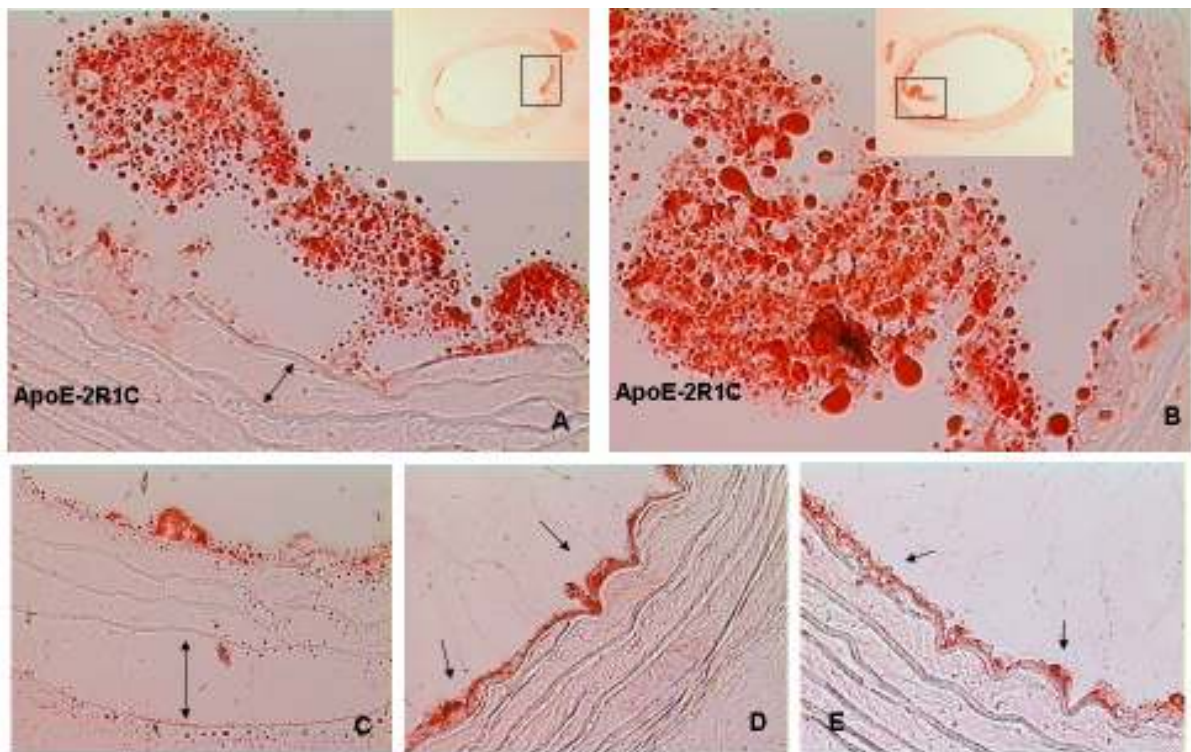


Figura 29: Imagens do arco aórtico de camundongo apoE-2R1C (animal 58). As figuras A e B mostram uma grande placa ateromatosa que se desprende para luz vascular. As setas com duas pontas nas figuras A e C apontam para regiões de grande hipertrofia da

camada média. Em D e E é possível visualizar o início das lesões ateroscleróticas, apontadas pelas setas. Coloração *Oil-Red-O*.

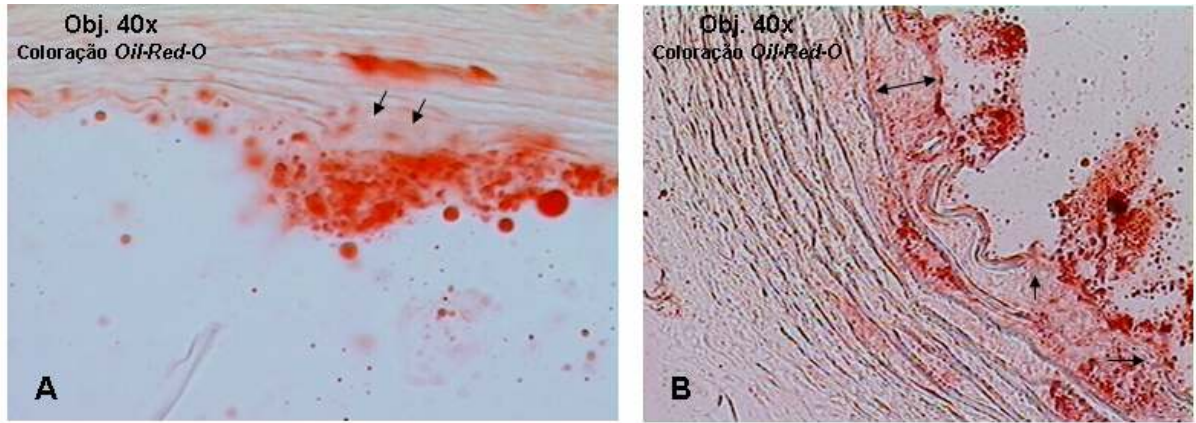


Figura 30: Imagens do arco aórtico de camundongo apoE-2R1C (animal 5- fig A, 53- fig B). Na figura A, as setas indicam descontinuidade da lâmina elástica interna. Em B, as setas de uma ponta indicam os pontos de brusca interrupção da lâmina elástica. A seta de duas pontas mostra a hipertrofia muscular na área da lesão.

5- DISCUSSÃO



6- CONCLUSÃO



Discussão

Diversos estudos clínicos e epidemiológicos têm identificado a HAS como sendo um independente e potente fator de risco para a doença aterosclerótica (Lithell, 1994; Alexander, 1995; Emberson *et alii*, 2003; Balaguer, 2004). Apesar do grande progresso no entendimento da aterosclerose, ainda não estão totalmente compreendidos os mecanismos que envolvem a associação entre hipertensão e aterosclerose. Com os avanços na produção de transgênicos e inativação gênica, o camundongo tem se tornado o mais importante modelo animal para pesquisa cardiovascular (Robbins, 1993; Dzau *et alii*, 1995; Jawieñ, *et alii*, 2004). Permitindo assim, a ampliação das possibilidades para melhor compreensão dessas doenças.

Este estudo foi o primeiro a analisar o remodelamento vascular no arco aórtico de camundongos apoE^{-/-} com hipertensão renovascular 2R1C. Outros trabalhos também mostram o remodelamento vascular (Seo *et alii*, 1997; Bonthu *et alii*, 1997; Moghadasian *et alii*, 1999; Lutgens *et alii*, 2001; Bentzon *et alii*, 2003) e os efeitos da Ang II na formação da placa aterosclerótica ou parede vascular de camundongos apoE^{-/-} (Weiss *et alii*, 2000; Saraffi *et alii*, 2003; Mazzolai *et alii*, 2004). O tipo de remodelamento está intimamente envolvido com o leito vascular (Pasterkamp *et alii*, 1997; Ward *et alii*, 2000) e com mudanças nos diversos fatores que interferem na homeostasia vascular, como o fluxo sanguíneo e a pressão arterial. Em condições patológicas, como hipertensão, aterosclerose, hiperlipidemia, hiper-homocisteinemia, e diabetes, onde a geração de espécies reativas derivadas do oxigênio está aumentada, as respostas do SRA podem ser acentuadas. Esses eventos redox-susceptíveis podem contribuir para os processos celulares que estão envolvidos disfunção vascular e remodelamento estrutural (Touyz, 2000; 2004; Griendling *et alii*, 2000; Wilcox, 2002). O entendimento dos mecanismos que direcionam as respostas do remodelamento vascular pode levar a busca de novas estratégias de tratamento e prevenção dos distúrbios vasculares.

O estabelecimento e a manutenção da hipertensão 2R1C dependem principalmente da ativação contínua do sistema renina-angiotensina, cujo principal hormônio biologicamente ativo é a Ang II, a qual tem importante ação vasoconstritora.

Atuando diretamente nos receptores AT₁ dos vasos pré-capilares, a Ang II eleva a pressão arterial através do aumento da resistência arterial periférica (Heeneman *et alii*, 1997). Em camundongos, este tipo de hipertensão renovascular (2R1C), também é dependente do sistema renina-angiotensina, cujo principal promotor da elevação de pressão arterial é o alto nível plasmático de Ang II (Wiesel *et alii*, 1997). Wiesel *et alii*, demonstra que quatro semanas após a clipagem os camundongos 2R1C apresentam elevação da pressão sangüínea de aproximadamente 20 mm Hg maior do que a pressão do grupo controle. Em camundongos 2R1C, com abertura do clipe de 0,12-mm, é observado um significativo aumento da pressão sangüínea duas semanas após a cirurgia, sem aumento adicional após quatro semanas. Clipes com a abertura de 0,11 mm induzem um alto percentual de infarto renal, e clipes com de 0,13-mm de abertura não produzem hipertensão (Wiesel *et alii*, 1997). Neste presente trabalho, como esperado, a implantação do clipe de aço, calibrado a 0,12 mm, na artéria renal esquerda, após 28 dias levou a HAS nos animais. A aterosclerose não agravou os níveis de hipertensão. Isso provavelmente por se tratar de estágios iniciais da aterosclerose, não havendo ainda um aumento considerável da rigidez vascular provocada pela aterosclerose em seus estágios avançados (Wang *et alii*, 2000), no qual ocorre perda de fibras elásticas, calcificação, etc. Até mesmo a formação de placas ateromatosas nas artérias renais, o que poderia causar obstrução do fluxo das artérias renais e ativação do SRA, o que elevaria a pressão dos animais ateroscleróticos controles. Através da infusão por microbombas osmóticas (*minipumps*) implantados subcutaneamente, na dose de 7 mg/kg/d, Weiss *et alii* (2001) descrevem uma elevação de pressão nos animais C57BL/6 e apoE^{-/-} maior do que 50 mm Hg em 4 semanas. Isso provavelmente por ser uma dosagem de Ang II muito acima da produzida pela hipertensão 2R1C. Sendo, portanto, o modelo de clipagem (2R1C) mais próximo da realidade fisiopatológica de uma hipertensão arterial.

Os valores de FC basal seguiram o mesmo padrão da pressão arterial, visto que a hipertensão renovascular 2R1C causou taquicardia em ambos os grupos C57BL/6 e apoE^{-/-} quando comparados com os respectivos grupos controles. O aumento da freqüência cardíaca nesse modelo provavelmente ocorre pelos efeitos da Ang II em diferentes áreas do sistema nervoso central determinando aumento do tono simpático

cardíaco. A potenciação do efeito simpático também ocorre ao nível vascular e da medula adrenal. No terminal simpático a Ang II estimula a síntese de norepinefrina, potencia sua liberação pelo estímulo neural e bloqueia a recaptção neuronal, esses efeitos aumentam a resposta simpática (Shepherd & Vanhoutte, 1980; Heeneman *et alii*, 1997).

O remodelamento vascular é uma resposta homeostática normal para mudanças no fluxo e tração radial, numa tentativa de restaurar o *shear stress* e tensão de parede respectivamente (Langille, 1996; Krams *et alii*, 1998; Tuttle *et alii*, 2001). O tipo de remodelamento, positivo ou negativo, é um importante determinante do lúmen vascular, tanto na hipertensão quanto na aterosclerose. Na hipertensão o remodelamento arterial parece ocorrer primariamente para a normalização do estresse de parede. A pressão elevada causa aumento na tensão de parede que se reflete principalmente nas células musculares lisas e a matriz extracelular da parede vascular. O padrão de remodelamento vascular é altamente dependente do tamanho e função do leito arterial estudado (Pasterkamp *et alii*, 1997; Ward *et alii*, 2000). Em parte isso pode ser refletido sobre a principal influência do fluxo sangüíneo na estrutura arterial (Langille, 1996). O fluxo sangüíneo afeta as artérias por via da força friccional experimentada pela parede vascular (estresse tangencial ou *shear stress*). As células endoteliais são as células mais influenciadas pelo *shear stress*. Em resposta ao *shear stress* o endotélio libera grande variedade de fatores vasoativos que afetam o tônus e o crescimento das células da parede vascular.

Na hipertensão, a maior parte dos estudos envolvendo o remodelamento vascular se concentra nas pequenas artérias de resistência (Baumbach & Heistad, 1989; Schiffrin *et alii*, 1993; Mulvany *et alii*, 1999), visto que a resistência vascular periférica é um dos principais determinantes da pressão arterial. Porém, sabe-se que na presença de HAS os grandes vasos, como a aorta, apresentam o aumento do diâmetro (Bevan *et alii*, 1979; Limas *et alii*, 1983; Safar *et alii*, 1984; Mayet *et alii*, 2003).

Neste estudo como esperado a elevação da pressão arterial, no modelo 2R1C, levou ao remodelamento positivo do arco aórtico dos camundongos C57BL/6 quando comparado com a artéria de referência do grupo controle C57-*Sham*. O remodelamento positivo foi determinado pela posição da lâmina elástica externa. Mas não houve

apenas um aumento da área de secção transversal do vaso (AST_v), como também ocorreu o aumento significativo da área do lúmen vascular (AST_L) no arco aórtico do grupo C57-2R1C. Os autores que estudam o remodelamento em artérias de resistência consideram o diâmetro do lúmen como sendo um dos parâmetros para determinação do padrão de remodelamento; enquadrando assim, este como sendo também um remodelamento positivo. O remodelamento positivo pode ser também comprovado pelo índice de remodelamento médio (RR) que foi igual 114,97, correspondendo ao percentual de 9,97% maior do que a artéria controle. Este padrão de remodelamento positivo na aorta do modelo C57BL/6 submetido à hipertensão Goldblatt 2R1C, já havia sido documentado através do aumento do da área de secção transversal do vaso (Wiesel *et alii*, 1997), o que comprova de certa maneira, os achados e a veracidade deste trabalho.

Desde o trabalho de Glagov *et alii* (1987), em coronárias humanas, sabe-se que na presença de placas ateroscleróticas há uma maior tendência ao surgimento do remodelamento positivo, para compensar a redução do fluxo sanguíneo. De modo que nas placas ateroscleróticas que causam uma estenose do lúmen menor do que 40% há um aumento no tamanho do vaso para compensar o crescimento da placa, resultando em um aumento da área do lúmen (Glagov *et alii*, 1987). Visto então, que o remodelamento arterial tem sido identificado como o determinante primário do tamanho da luz vascular, e não o tamanho da placa aterosclerótica (Pasterkamp *et alii*, 1995b; 1997). O remodelamento positivo na presença de aterosclerose também é encontrado em modelos animais, como ratos, em primatas não-humanos, porcos, etc. (Baumbach & Heistad, 1989; Clarkson *et alii*, 1994; de Smet *et alii*, 1998). O remodelamento positivo parece ocorrer para impedir a disfunção endotelial e o crescimento da placa (Ward *et alii*, 2000).

Pouco se sabe sobre a interação entre aterosclerose e HAS no remodelamento vascular. Em virtude disso e de outros fatores, buscou-se a interação entre essas duas doenças no modelo apoE-2R1C. Os dados encontrados neste trabalho mostram que não houve diferenças estatísticas, para o remodelamento vascular do arco aórtico, quando comparadas as AST_v e a AST_L dos grupos ateroscleróticos apoE-Sham e apoE-2R1C. Uma vez que houve uma grande variabilidade no grupo apoE-Sham. De

forma que alguns animais do grupo apoE-*Sham* já apresentavam um pequeno grau de remodelamento positivo. Também não houve diferença estatística quando se comparou os grupos controles apoE-*Sham* com C57-*Sham*. Mas se comparado o grupo apoE-2R1C com o controle C57-*Sham*, observa-se uma diferença significativa. Indicando um remodelamento positivo em relação ao grupo C57-*Sham*. Os resultados mostram que a hipertensão 2R1C acelera o processo de remodelamento positivo nos animais apoE^{-/-}, mesmo não havendo diferenças estatísticas quando se comparam a AST dos grupos apoE^{-/-} normotenso com o hipertenso, porém isso se torna claro quando se compara o grupo apoE-2R1C com o grupo C57-*Sham*. Uma vez que o camundongo apoE^{-/-} é derivado da linhagem C57BL/6, pode-se considerar o animal C57BL/6 como sendo o controle do animal aterosclerótico apoE^{-/-}. Essa comparação também é realizada em outros trabalhos (Jormsjö *et alii*, 2002; Bentzon *et alii*, 2003). Portanto, se os animais C57BL/6 normotensos forem considerados controles, podemos classificar o remodelamento dos animais apoE-2R1C como sendo um perfeito remodelamento positivo, com aumento da AST_v e manutenção da AST_L.

Um dos trabalhos envolvendo os fatores de risco cardiovascular e o remodelamento da artéria coronária, conclui que os fatores de risco como hipertensão e hipercolesterolemia prejudicam o remodelamento positivo e mesmo predisõem as artérias epicárdicas ao remodelamento negativo nos estágios iniciais da aterosclerose (Britten *et alii*, 2003). O tratamento clínico para redução dos níveis de colesterol é relacionado com a melhora da área do lúmen coronariano e da função endotelial, que é resultado do aumento da área do vaso e não da redução da área de placa, sendo este um reflexo do remodelamento vascular (Hamasaki *et alii*, 2000).

Outros estudos em camundongos apoE^{-/-} também descrevem a ocorrência do remodelamento positivo (Seo *et alii*, 1997; Bonthu *et alii*, 1997; Moghadasian *et alii*, 1999; Lutgens *et alii*, 2001; Choudhury *et alii*, 2002; Bentzon *et alii*, 2003). *Toll-like receptor 4* (Tlr4) é um receptor para lipopolissacarídeos (LPS) que está envolvido no remodelamento positivo com ou sem formação da neoíntima, sugerindo um importante papel do Tlr4 em todos os tipos de remodelamento arterial positivo. Provavelmente através da *upregulation* desses receptores e de seus ligantes (Hollestelle *et alii*, 2004).

Estudos com ratos mostram que o receptor AT₁ para Ang II desempenha um papel crucial no remodelamento, através de alterações da matriz tecidual (Otsuka *et alii*, 1998). Trabalhos mostram que a infusão de Ang II em camundongos apoE^{-/-} provoca o aumento da formação de aneurisma, principalmente na aorta abdominal (Daugherty *et alii*, 2000; Weiss *et alii*, 2001; Daugherty & Cassis, 2002). Bem como o aumento da infiltração de macrófagos na camada média, que é associado à degradação de elastina. Sendo que as lesões ateroscleróticas só se formam em torno de 56 dias após a formação do aneurisma devido às mudanças do fluxo sanguíneo (Saraffi *et alii*, 2003).

O remodelamento positivo está associado com o fenótipo de placa instável, portanto predispondo ao surgimento de eventos súbitos (Ward *et alii*, 2000; Pasterkamp & Smits, 2002). O aumento da degradação de moléculas de matriz celular pode levar ao aumento da infiltração de células musculares lisas e acelerar o processo aterosclerótico. Há evidências de que as metaloproteinases (MMPs) e proteases serinas são importantes mediadores da degradação da matriz extracelular. As proteases cisteína e aspártica também vêm sendo implicadas no processo de remodelamento vascular, devido as suas atividades elastolítica, colagenolítica e gelatinolítica. Macrófagos e células musculares lisas produzem um grande número de proteases, como as serinas, cisteínas, aspártica, MMPs (Leake *et alii*, 1983; Carmeliet *et alii*, 1997). A expressão de MMPs e serinas foi demonstrada na parede arterial de camundongos apoE^{-/-} (Jeng *et alii*, 1999). Em camundongos apoE^{-/-} o aumento da expressão de catepsinas (principalmente a S) na lesão aterosclerótica, sugere que estas proteases podem participar no remodelamento da matriz extracelular associado com o processo aterosclerótico e um maior risco de ruptura da placa (Jormsjö *et alii*, 2002). Muitas MMPs, incluindo MMP-2, MMP-3 e MMP-9, têm sido encontradas em excesso em placas na região de remodelamento positivo comparadas com placas em regiões de remodelamento negativo (Pasterkamp *et alii*, 2000; Schoenhagen *et alii*, 2002). Sabe-se que a Ang II estimula a liberação de MMP-2 (Wang *et alii*, 2003; Arenas *et alii*, 2004). O excesso de MMPs pode enfraquecer a capa fibrótica levando a sua ruptura, o que explica a associação entre remodelamento positivo e síndromes coronarianas agudas por diversos investigadores (Yamagishi *et alii*, 2000; Bezerra *et alii*, 2001). O camundongo apoE^{-/-} pode fornecer valiosos estudos envolvendo as

relações entre macrófagos, expressão de MMPs e remodelamento positivo. Porém a ruptura da placa na raiz da aorta raramente é observada neste modelo (Zhou *et alii*, 2001; Bentzon *et alii*, 2001). Mazzolai *et alii* (2004), mostra também no modelo apoE⁻ 2R1C o aumento da vulnerabilidade das placas ateroscleróticas. Com aumento da infiltração de macrófagos na parede vascular e redução da quantidade de músculo liso nas áreas de placa. Enquanto que no modelo 1R1C as placas exibem um fenótipo estável.

O remodelamento positivo em resposta ao aumento de fluxo é amplamente dependente da produção de NO pelo endotélio em resposta ao shear stress (Tronc *et alii*, 1996) e a MMPs (MMP-2 e MMP-9) (Abbuzzese *et alii*, 1998). O NO aparenta desempenhar um papel central nesse processo, pois pode causar a indução de MMPs (Sasaki *et alii*, 1998), inibir a proliferação e promover a apoptose das células musculares lisas (Cooke *et alii*, 1997). Em contraste, em estados de baixo fluxo, acentuada produção de fatores de crescimento mitogênicos e fibrogênicos, como o PDGF e TGF- β , provavelmente medeiam o remodelamento negativo pelo aumento da proliferação de músculo liso e deposição de colágeno, enquanto a indução de MMPs ajuda a reorganizar a estrutura vascular (Mondy *et alii*, 1997; Bassiouny *et alii*, 1998). Em curto tempo a Ang II estimula a liberação de NO, modulando assim sua ação vasoconstritora; em longo prazo, enquanto o NO reduz a expressão de AT₁ no vaso, a Ang II influencia a expressão de todas as três isoformas de NO sintase (Millatt *et alii*, 1999) que podem participar dos processos de sinalização e regulação do remodelamento vascular. O balanço entre Ang II e NO é fundamental para homeostasia vascular, visto seus diversos efeitos antagônicos (Millatt *et alii*, 1999).

Algumas especificidades das lesões em resposta ao remodelamento podem ser atribuídas à quantidade de cálcio presente (Lerman *et alii*, 1998) e a alterada hemodinâmica local. Células do músculo liso vascular da aorta de ratos expostas a LDL e Ang II respondem com aumento do mRNA para o receptor AT₁ da Ang II, levando a proliferação celular e liberação de cálcio (Nickenig *et alii*, 1997).

A área da parede vascular (AST_p), envolvendo as camadas íntima e média, mostra resultados interessantes. O grupo de animais C57BL/6 com hipertensão renovascular 2R1C, teve uma grande significância estatística ($p < 0,01$) quando

comparado com o grupo controle C57-*Sham*. Mostrando que a hipertensão 2R1C elevou a área de parede da aorta desses animais. O controle apoE^{-/-} em relação ao controle C57BL/6 apresentou um aumento da área de parede ($p < 0,05$), devido ao processo aterosclerótico. Quando o animal apoE^{-/-} é submetido a hipertensão 2R1C há um maior aumento da área de parede, o que mostra o efeito somatório da aterosclerose com a hipertensão dependente da Ang II. Se compararmos os grupos apoE-2R1C com o grupo C57-2R1C, não observamos diferenças estatísticas, mostrando assim, que a hipertensão Goldblatt 2R1C por si só leva ao aumento da área de parede vascular. A hipertensão sustentada leva a mudanças estruturais da parede arterial. Essas alterações incluem o aumento da degradação e síntese de colágeno e destruição e reconstrução das fibras de elastina (Zarins *et alii*, 1986; Poiani *et alii*, 1990; Bishop & Lindahl, 1999), que eventualmente levam ao remodelamento da parede arterial e modificações em suas propriedades (Chrysant, 1998). Sabe-se também, que a Ang II estimula a produção de fibras colágenas, bem como a proliferação do músculo liso vascular (Dzau *et alii*, 1991; Griendling *et alii*, 1993), o que provavelmente levou ao aumento da AST_p dos animais submetidos a hipertensão renovascular. Em coelhos hipercolesterolêmicos submetidos à coarctação da aorta para produção de hipertensão arterial acima da região da coarctação, há um aumento do colágeno tipo I e III em resposta a hipertensão. Enquanto que o aumento de tropoelastina está associado à formação de células espumosas nas lesões ateroscleróticas (Xu *et alii*, 2000). Sabe-se também, que a Ang II, independentemente do nível de pressão arterial, promove a proliferação das células musculares lisas vasculares (Su *et alii*, 1998).

Neste trabalho, a relação p:l foi calculada pela divisão entre a espessura da parede pelo diâmetro do lúmen, alguns trabalhos fazem a relação p:l entre a área da parede vascular dividida pela área da luz vascular. Através dessa relação é possível observar as características do remodelamento vascular, tendo-se como base a razão entre o diâmetro da luz vascular e a espessura da parede vascular. Tendo-se a p:l do grupo C57-*Sham* como base para as comparações entre os outros grupos, observa-se que os demais grupos tiveram uma tendência ao aumento desta relação. Mesmo com o aumento da luz vascular do grupo hipertenso (C57-2R1C), a relação p:l tende a se manter elevada, mostrando então, o aumento da área de parede (média-intima) desses

animais. Segundo os autores que consideram a mudança no diâmetro do lúmen para ocorrência do remodelamento, se houvesse aumento dessa relação associado à mudança no diâmetro do lúmen vascular, poderíamos subclassificar o remodelamento em positivo hipertrófico.

Os camundongos apresentam em média cerca de 2 anos de vida, enquanto o homem possui cerca de 75 anos. Camundongos homozigotos apoE^{-/-} jovens, com 5-6 semanas de idade, têm adesão de monócitos nas células endoteliais da aorta. O que pode ser detectado facilmente através da microscopia eletrônica, que também demonstra a migração transendotelial dos monócitos sanguíneos. A maior parte dos camundongos apoE^{-/-} apresentam lesões do tipo estrias gordurosas entre 6-10 semanas de idade, compostas principalmente de células espumosas com migração de células musculares lisas (Plump *et alii*, 1992; Tangirala *et alii*, 1995). As lesões do tipo estria gordurosa evoluem rapidamente para as lesões avançadas, que em sua maioria são formadas por um *core* necrótico rodeado por células musculares lisas que sintetizam matriz extracelular, incluindo colágeno e elastina. De modo que algumas das lesões complexas podem formar uma capa fibrótica já por volta de 15 semanas. Por volta de 32 semanas o camundongo pode apresentar infiltração da média com formação de aneurisma na aorta. E por volta de 40 semanas, as lesões podem desenvolver grandes depósitos calcificados (Reddick *et alii*, 1994; Hofker *et alii*, 1998). Devido ao seu tamanho diminuto, pesando 30g quando adulto, a análise das lesões ateroscleróticas em camundongos requer certas habilidades. Paigen *et alii* foram pioneiros na quantificação das placas ateroscleróticas em camundongos, em 1987 descrevem várias metodologias para a quantificação das lesões ateroscleróticas. A maior parte dos trabalhos mensura a área de lesão aterosclerótica através de secção transversal da raiz da aorta, tendo como referência a base cardíaca para o correto posicionamento da aorta para realização do corte transversal. Neste trabalho a quantificação microscópica das lesões ateroscleróticas se focou no arco aórtico, mais precisamente entre o tronco braquiocefálico direito e a carótida comum esquerda, para uma possível correlação com outros trabalhos que envolvam as terminações barorreceptoras localizadas nesta região. Visto que os animais apoE^{-/-} utilizados neste estudo se encontravam com idade variando entre 12-14 semanas, onde as lesões do

tipo estria gordurosa estão evoluindo para lesões avançadas, foi necessário uma avaliação mais precisa com maior aumento (objetiva de 40x) para a detecção de mínimas áreas de lesões ateroscleróticas.

Há décadas, através da associação entre hipertensão arterial e hiperlipidemia em diversos modelos animais, sabe-se que a hipertensão acelera ou agrava a formação de placas ateroscleróticas (Hollander, 1976a; *et alii*, 1976b; McGill *et alii*, 1985). Estudos mais recentes também comprovam os efeitos da hipertensão acelerando a deposição de lipídios na parede arterial (Heistad *et alii*, 1991; Roux *et alii*, 1992; Chobanian, 1992). Em camundongos apoE^{-/-}, a infusão de Ang II (Weiss *et alii*, 2001) ou a produção do modelo 2R1C acelera o desenvolvimento de aterosclerose (Mazzolai *et alii*, 2004). Além de que a ativação de receptores AT₁ para Ang II, promove aumento da oxidação da LDL, captação de Ox-LDL e formação de células espumosas (Keidar & Attias, 1997a; Ross, 1999; Morawietz *et alii*, 1999). Tanto a Ang I quanto a Ang II estão presente em monócitos humanos, sendo que a Ang II encontra-se em maior quantidade nestas células (Kitazono *et alii*, 1995). No presente estudo o desenvolvimento da hipertensão 2R1C nos camundongo apoE^{-/-} não promoveu o aumento significativo das lesões ateroscleróticas em relação ao grupo controle apoE-*Sham*. Os animais apoE^{-/-} apresentaram grande variabilidade na área de deposição lipídica, o que pode ter prejudicado a análise estatística, de forma a não apresentar uma significância considerável entre os grupos, visto que o erro padrão da média dos diferentes grupos se sobrepuseram. Uma outra provável explicação para o resultado conflitante com a literatura, pode ser dada pelo fato dos animais apresentarem lesões ateroscleróticas jovens. De modo que o tempo de exposição e os níveis de Ang II circulantes não foram suficientes para o agravamento das lesões. No trabalho Weiss *et alii* (2001), provavelmente as doses de infusão de Ang II foram muito superiores aos níveis plasmáticos de Ang II promovidos pela hipertensão 2R1C. Cassis *et alii*, também demonstra em 2004, a existência de diferenças no metabolismo da Ang II entre ratos e camundongos. As diferenças dos peptídeos circulantes, da regulação do receptor para Ang II, e reatividade vascular contribuem para a diminuição da resposta a infusão de Ang II em camundongos quando comparado com ratos. Assim, doses maiores de Ang II podem ser requeridas para eliciar os efeitos da Ang II em camundongos. No outro

estudo que envolve o modelo apoE^{-/-} 2R1C (Mazzolai *et alii*, 2004), e a conseqüente formação de Ang II circulante, o aumento da área das placas ateroscleróticas pode ter ocorrido devido aos maiores níveis de PAM (140± 2 mm Hg) em relação ao presente trabalho (126,4 ± 2,6 mm Hg). De maneira que a pressão arterial mais elevada favoreça a deposição de lipídios na parede vascular. A força radial desenvolvida pela pressão arterial é um fator preponderante para a aterogênese. Por exemplo, a formação de placas ateromatosas não ocorre em leito pulmonar cuja pressão arterial é baixa, contudo na presença de hipertensão pulmonar são observadas lesões semelhantes àquelas da circulação sistêmica (Favarato & Luz, 2003). Outro exemplo é o modelo de coarctação de aorta, no qual as placas só se formam nos vasos acima do ponto de estenose onde a pressão sanguínea é mais elevada, e o uso de agentes anti-hipertensivos reduz a progressão das placas (Hollander *et alii*, 1976b; Roux *et alii*, 1992). Xu *et alii*, também mostra que a hipertensão é capaz de sustentar a progressão da placa aterosclerótica apesar da redução da hipercolesterolemia (Xu *et alii*, 1991). Outro ponto de inter-relacionamento entre hipertensão e aterosclerose é que a Ang II também estimula a produção de endotelina, que leva ao aumento de pressão e predispõe à aterogênese, aumentando a tendência ao vasoespasma (Heistad *et alii*, 1995; Favarato & Luz, 2003).

A Ang II age por meio de seus receptores de membrana AT₁ e AT₂ que possuem funções antagônicas (Timmermans *et alii*, 1993). O receptor AT₂ causa vasodilatação e inibição do crescimento do músculo liso vascular (Carey *et alii*, 2000). A maioria das ações da Ang-II ocorre via receptores AT₁ que possuem uma ampla distribuição, como nas células musculares lisas, miocárdio, pulmões cérebro, rins, fígado e glândulas adrenais (Timmermans *et alii*, 1993). A ativação dos receptores AT₁ pode, dependendo do tipo celular, levar a contração celular, hipertrofia, proliferação ou apoptose (Griendling *et alii*, 1993). Apesar dos efeitos da Ang 1-7 e do receptor AT₂ na contraposição dos efeitos da Ang II, o NO (óxido nítrico) liberado pelo endotélio ainda é considerado como o principal opositor aos efeitos da Ang II (Millatt *et alii*, 1999). A estimulação pela Ang-II resulta na produção de espécies reativas de oxigênio na parede arterial que levam ao aumento da expressão de genes proinflamatórios e diminuição da biodisponibilidade do NO (Griendling *et alii*, 1997). Por via da Ang II, assim como por

outros estímulos aterogênicos, ocorre o aumento na produção de radicais livres derivados do oxigênio pela ativação da NADH/NADPH oxidase, que é o principal componente dessa via metabólica em células endoteliais, musculares lisas e fibroblastos da adventícia (Griendling *et alii*, 1994; Laursen *et alii*, 1997). A angiotensina II também aumenta a expressão de MCP-1 em aorta de modelos de hipertensão e em cultura de células musculares lisas vasculares (Capers *et alii*, 1997; Chen *et alii*, 1998). Além de aumentar a expressão de moléculas de adesão como ICMA-1 e VCAM-1, através do estresse oxidativo (Chien *et alii*, 1998). Esses efeitos da Ang II estão diretamente relacionados à disfunção endotelial. Estudos com animais experimentais com inibição da ECA ou bloqueio do receptor AT₁, resultam no decréscimo do desenvolvimento das lesões ateroscleróticas (Kowala *et alii*, 1994; Keidar *et alii*, 1997b; Makaritsis *et alii*, 1998).

Um enfraquecimento da lesão aterosclerótica levando ao evento crítico, como a ruptura da placa, pode resultar de um maior conteúdo de lipídios, processo inflamatório, apoptose e aumento da degradação de matriz na lesão já formada (Ross, 1999). A Ang II altera o metabolismo de lipídios, proliferação das células musculares lisas, coagulação, e se comporta como um fator de crescimento (Nishimura *et alii*, 1997; Su *et alii*, 1998). A ativação do receptor AT₁ aumenta a deposição de lipídios, inicia o processo inflamatório por produção de interleucina 6 (IL-6) (Schieffer *et alii*, 2000; Keidar *et alii*, 2001), estimula a apoptose da célula muscular lisa (Mallat & Tedgui, 2000) e aumenta a atividade de metaloproteinases de matriz extracelular.

As forças exercidas na parede vascular são fundamentais para a manutenção do nível de pressão, de modo que as artérias estão sempre em estado de distensão radial e estiramento longitudinal. Para um mesmo vaso, o aumento do calibre aumenta sua rigidez, isto está relacionado ao arranjo das fibras de colágeno e elastina nas paredes dos vasos. Em pequenos estiramentos, muitas fibras colágenas estão em repouso, e toda tensão na parede dos vasos tem origem nas fibras de elastina. Com o aumento do estiramento, as fibras colágenas passam a contribuir progressivamente mais para a tensão na parede dos vasos. Portanto o comportamento elástico do vaso é determinado não apenas pelas propriedades elásticas dos materiais que o constituem, mas também pelas formas e dimensões do mesmo (Franchini, 1999). Nos vasos, a lei de Laplace

(1749-1827) indica que a tensão na parede, necessária para equilibrar a pressão sanguínea que tende a distender um vaso, diminui com o raio deste. Desta forma, a pressão necessária para distender o vaso é inversamente proporcional ao tamanho da luz arterial, isto é, quanto maior a luz, menor a pressão necessária para promover sua distensão (Franchini, 1999; Brekke *et alii*, 2002). A maioria dos vasos tem tensão compressiva, sendo a aorta uma exceção. A lei de Laplace também explica como os níveis locais de pressão intravascular determinam os níveis regionais de espessura e raio dos vasos. De alguma maneira, a pressão local serve para ajustar a extensão e a direção do crescimento celular local, para manter a tensão nas paredes vasculares em níveis toleráveis (Franchini, 1999). Particularmente, acredito que a lei de Laplace só deva ser aplicada até um determinado ponto, visto que o aumento da distensão das fibras da parede vascular não segue um padrão linear, de forma que a rigidez da parede aumenta com a distensão do vaso e isto requer pressões maiores para uma maior distensão. Assim como ocorre com o diâmetro alveolar e a distribuição de surfactante na parede alveolar, de modo que a aplicação da lei de Laplace deve ser usada com cautela nos tecidos biológicos, pois estes são dinâmicos e respondem de forma variada aos diferentes estímulos. Apesar do aumento de pressão arterial ser diretamente proporcional à tensão de parede, o mesmo não ocorre com o raio. Pois, nas grandes artérias o aumento de pressão leva ao aumento do diâmetro vascular (raio), o que segundo a lei de Laplace, deveria ocorrer inversamente.

As respostas vasculares são específicas para o tipo de carga mecânica imposta na parede arterial. Por exemplo, o aumento da tensão de estiramento da parede provoca aguda vasoconstrição que forma a autoregulação miogênica do fluxo sanguíneo periférico e o crônico espessamento da parede arterial que é associado com a hipertensão. Em contraste, o aumento do *shear stress* induz aguda vasodilatação e cronicamente o remodelamento com alargamento do diâmetro arterial. Essas envolvem a comunicação intercelular, mediada por junções comunicantes, conexinas, e outros receptores de membrana (Cowan *et alii*, 1998). A elevação de pressão sanguínea aumenta o estresse de parede em uma distribuição não uniforme (Thubrikar *et alii*, 1990; Thubrikar & Robicsek, 1995). Tem sido proposto que o aumento do estresse de parede seja um estímulo proinflamatório (Taylor, 1998), como evidenciado pela

associação entre tensão mecânica e espécies reativas de oxigênio (Howard *et alii*, 1997; Hishikawa *et alii*, 1997) e a expressão de produtos de genes inflamatórios (Wung *et alii*, 1997; Capers *et alii*, 1997). De fato, o estresse de parede tem se mostrado como um estímulo relevante para o desenvolvimento da aterosclerose (Thubrikar *et alii*, 1988). Na hipertensão a parede das grandes artérias fica menos distensível, devido ao aumento da rigidez arterial e diminuição da complacência arterial promovidas pela hipertensão (Safar *et alii*, 1984; 1998; Lichtenstein *et alii*, 1998). Tanto a aterosclerose quanto a hipertensão são associadas com o aumento da rigidez arterial. A infusão de Ang II em camundongos apoE^{-/-}, mostra o aumento da rigidez da aorta, que foi associado ao aumento do conteúdo de colágeno, diminuição do conteúdo de elastina e ruptura da lâmina elástica interna (Tham *et alii*, 2002). Os vasos sanguíneos não obedecem à lei de Hooke, de forma que eles possuem uma distensão elástica não-linear. Na hipertensão a hipertrofia da parede arterial parece ocorrer primariamente para a normalização do estresse de parede (Cadilhac & Giudicelli, 1986; Intengan *et alii*, 1999). A pressão elevada (tração radial) causa aumento na tensão de parede que se reflete principalmente nas células musculares lisas e a matriz extracelular da parede vascular (Langille, 1996; Ward *et alii*, 2000).

Neste presente estudo a tensão de parede, como esperado, estava mais elevada nos animais hipertensos. Sem haver diferenças entre os grupos apoE-2R1C e C57-2R1C. E no grupo aterosclerótico controle, houve uma elevação da tensão em relação ao controle C57BL/6, mas não significativa estatisticamente. O aumento da tensão de parede nos animais hipertensos é esperado, sendo originada pelo aumento da força radial promovida pela pressão arterial na parede vascular. A tensão de parede é correlacionada positivamente com o diâmetro arterial (Glagov *et alii*, 1988; Thubrikar & Robicsek, 1995; Vorp *et alii*, 1998). O estresse de parede estatisticamente foi igual entre os diferentes grupos, o que provavelmente se deve ao aumento da área de parede ocorrido na aorta dos animais hipertensos. Apesar de ser observado certa diminuição do estresse de parede nos animais ateroscleróticos.

Diversos e diferentes achados morfológicos tem sido atribuídos ao remodelamento vascular. Tais como a interrupção ou destruição da lâmina elástica (elastolise) abaixo da região da placa aterosclerótica em humanos e em modelos

animais (Prescott *et alii*, 1999; Bentzon *et alii*, 2003; Saraff *et alii*, 2003), além da atrofia da camada média (Crawford & Levene, 1953; Bentzon *et alii*, 2003) estão envolvidos com o remodelamento positivo. A grande destruição da média está associada com a formação de aneurisma (Saraff *et alii*, 2003). O espessamento da camada íntima é observado tanto na hipertensão quanto na aterosclerose (Neves *et alii*, 1998). Neste estudo as lesões ateroscleróticas formadas se encontravam no estágio de estria gordurosa ou evoluindo para lesões avançadas. Também foram identificados pontos de adesão de monócitos, formando células espumosas na superfície do endotélio. Alguns animais C57-2R1C, apoE-*Sham* e apoE-2R1C apresentaram nítida hipertrofia da camada média. Nos animais o efeito da hipertensão e da Ang II pode ter exacerbado esse efeito. Nas regiões abaixo da placa aterosclerótica de animais apoE^{-/-} normotenso e hipertenso foi observado aumento da primeira camada de células lisas, como também em outras regiões. Também abaixo da placa nos animais apoE^{-/-} de ambos os grupos observou-se a destruição da lâmina elástica, o que parece ter claro envolvimento com o remodelamento positivo (Masuda *et alii*, 1999). Em alguns animais hipertensos foi observado um pequeno aumento da camada íntima, o que pode ser o início de proliferação da íntima em resposta ao aumento do *shear stress* provocado pela hipertensão. No trabalho de Mazzolai *et alii* (2004), em camundongos apoE^{-/-} submetidos a hipertensão 2R1C, foi observado o aumento da infiltração de macrófagos, fragmentação da lâmina elástica, ausência de capa fibrótica, e também foi observado atrofia da média pela ausência de α -actina que se relacionou com inflamação da adventícia.

Complicações tanto nos casos de remodelamento negativo, como de reestenose após angioplastia, quanto dos eventos de ruptura da placa ateromatosa que geralmente estão relacionados ao remodelamento positivo, podem ser prevenidos adequadamente através da compreensão dos mecanismos que levam ao remodelamento (Ward *et alii*, 2000). O SRA desempenha um importante papel na aterogênese, assim como na HAS, onde seus efeitos são bem estabelecidos. Isso pode ser evidenciado claramente pelo bloqueio do receptor AT₁ ou pela inibição da atividade da ECA (Kowala *et alii*, 1994; Keidar *et alii*, 1997b; Makaritsis *et alii*, 1998). A geração local de Ang II também pode desempenhar um importante papel no desenvolvimento da aterogênese (Arakawa &

Urata, 2000). O HOPE *trial* sugere que a Ang II pode estar envolvida no desenvolvimento de aterosclerose em indivíduos hipertensos sem altos níveis de renina (Yusuf *et alii*, 2000). O que também pode ser atribuído aos efeitos mecânicos da hipertensão acelerando a deposição de lipídios na parede vascular (Chien *et alii*, 2003). As limitações para estudos em humanos, apesar dos avanços nas técnicas de avaliação vascular *in vivo* como o ultra-som intravascular, podem ser superadas pelos modelos de estudo animais. O modelo apoE^{-/-} submetido a hipertensão 2R1C se mostrou eficiente para a produção de HAS, e pode trazer grandes avanços na compreensão dos mecanismos que envolvem o SRA, hipertensão arterial e aterosclerose.

6- CONCLUSÃO



Conclusão

Na idade jovem estudada a aterosclerose não alterou os níveis de hipertensão arterial. Nossos dados também indicam que a hipertensão renovascular (2R1C) por si só leva ao remodelamento positivo (alargamento compensatório) do arco aórtico, com aumento da área de secção transversal do vaso e do lúmen vascular. A aterosclerose não causou o remodelamento vascular neste estágio inicial de lesão. Porém quando associamos a aterosclerose com a hipertensão renovascular observamos o processo de remodelamento positivo quando comparamos com o animal C57 normotenso. Com aumento da área vascular e manutenção da área do lúmen, o que é considerado um padrão de perfeito remodelamento positivo. Isso pode ser claramente comprovado pelo índice de remodelamento que se mostrou elevado no grupo apoE^{-/-} hipertenso. Mas esse remodelamento não foi estatisticamente diferente do animal aterosclerótico normotenso, provavelmente por alguns destes animais apresentarem o processo inicial de remodelamento.

Apenas a aterosclerose isolada (apoE-*Sham*) já apresenta um aumento da área de parede vascular, comparando-se com o controle C57. O grupo aterosclerótico hipertenso mostrou uma significativa diferença quando comparado com o grupo controle aterosclerótico, mostrando que a hipertensão dependente de Ang II aumenta a área de parede na aterosclerose.

A hipertensão 2R1C, nos níveis de pressão arterial atingidos, não foi capaz de aumentar a área das lesões ateroscleróticas.

Como esperado, a hipertensão promoveu o aumento da tensão de parede vascular. De igual maneira entre os animais não ateroscleróticos e ateroscleróticos. O

estresse de parede foi equivalente entre todos os grupos, inclusive nos animais hipertensos. O que é explicado pelo aumento da área de parede do arco aórtico.

“Quod me nutrit me destruit”

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



Abbruzzese TA, Guzman RJ, Martin RL, Yee C, Zarins CK, Dalman RL (1998). Matrix metalloproteinase inhibition limits arterial enlargements in a rodent arteriovenous fistula model. *Surgery*, 124: 328-334.

Alexander RW (1995). Hypertension and pathogenesis of atherosclerosis: oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response. *Hypertension*, 25: 155-161.

Angell-James JE (1974). Arterial baroreceptor activity in rabbits with experimental atherosclerosis. *Circulation Research*, 34: 27-29.

Arakawa K, Urata H (2000). Hypothesis regarding the pathophysiological role of alternative pathways of angiotensin II formation in atherosclerosis. *Hypertension*, 36(4): 638-641.

Arenas IA, Xu Y, Lopez-Jaramillo P, Davidge ST (2004). Angiotensin II-induced MMP-2 release from endothelial cells is mediated by TNF-alpha. *Am J Physiol Cell Physiol*, 286(4): C779-784.

Armstrong ML, Heistad DD, Marcus ML, Megan MB, Piegors DJ (1985). Structural and hemodynamic response of peripheral arteries of macaque monkeys to atherogenic diet. *Arteriosclerosis*, 5: 336-546.

Baeuerle PA, Baltimore D (1996). NF-kB: ten years after. *Cell*, 87: 13-20.

Balaguer VI (2004). Longitudinal studies in the prevention of cardiovascular diseases. *Rev Esp Salud Publica*, 78(2):149-66.

Bassiouny HS, Song RH, Hong XF, Singh A, Kocharyan H, Glagov S (1998). Flow regulation of 72-kD collagenase IV (MMP-2) after experimental arterial injury. *Circulation*, 98: 157-163.

Baumbach GL, Heistad DD (1989). Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension. *Hypertension*, 13: 968–972.

Bennet T, Hosking DJ, Hampton JR (1976). Baroreflex sensitivity and responses in subjects with *diabetes mellitus*. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 39(2):178-183.

Bentzon JF, Skovenborg E, Hansen C, Moller J, de Gaulejac NS, Proch J, Falk E (2001). Red wine does not reduce mature atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 103: 1681-1687.

Bentzon JF, Pasterkamp G, Falk E (2003). Expansive remodeling is a response of the plaque-related vessel wall in aortic roots of apoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23: 257-262.

Bevan RD, Eggena P, Hume WR, Lais LT, Van Marthens E, Bevan JA (1979). An 8 month longitudinal study of changes in elastic and muscular arteries and veins of the rabbit with sustained hypertension after abdominal aorta constriction. *Clin Sci*, 57 (Suppl 5): 7s-9s.

Bezerra HG, Higuchi ML, Gutierrez PS, Palomino SA, Silvestre JM, Libby P, Ramires JA (2001). Atheromas that cause fatal thrombosis are usually large and frequently accompanied by vessel enlargement. *Cardiovasc Pathol*, 10: 189-196.

Bishop JE, Lindahl G (1999). Regulation of cardiovascular collagen synthesis by mechanical load. *Cardiovasc Res*, 42: 27-44.

Bonthu S, Heistad DD, Chappell DA, Lamping KG, Faraci FM (1997). Atherosclerosis, vascular remodeling, and impairment of endotheliumdependent relaxation in genetically altered hyperlipidemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17:2333-2340.

Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF (1998). Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*, 394(6696): 894-897.

Bourdillon MC, Poston RN, Covacha C, Chignier E, Bricca G, McGregor JL (2000). ICAM-1 deficiency reduces atherosclerotic lesions in double-knockout mice (ApoE^{-/-}/ICAM-1^{-/-}) fed a fat or a chow diet. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, 20: 2630–2635.

Braunwald E (1997). Shattuck lecture-cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities. *N Engl J Med*, 337:1360-1369.

Brekke JF, Gokina N, Osol G (2002). Vascular smooth muscle cell stress as a determinant of cerebral artery myogenic tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283: H2210–H2216.

Britten MB, Zeiher AM, Schachinger V (2003). Effects of cardiovascular risk factors on coronary artery remodeling in patients with mild atherosclerosis. *Coron Artery Dis*, 14(6): 415-422.

Butler PJ, Tsou TC, Li JY, Usami S, Chien S (2002). Rate sensitivity of shear-induced changes in the lateral diffusion of endothelial cell membrane lipids: A role for membrane perturbation in shear-induced MAPK activation. *Faseb J*, 16: 216-218.

Byyny RL (1995). Hypertension in the elderly. In: Laragh JH, Brenner BM. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. New York: Raven Press, cap. 14, p. 227-250.

Cabral AM, Vasquez EC, Mauad H. Hipertensão Experimental: Aspectos Fisiopatológicos e Técnicas de Produção. Em: Hipertensão Arterial. Sarvier, 1997, pp 61-71.

Cadilhac M, Giudicelli JF (1986). Myocardial and vascular effects of perindopril, a new converting enzyme inhibitor, during hypertension development in spontaneously hypertensive rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 284: 114-126.

Carmeliet P, Moons L, Lijnen R, Baes M, Lemaitre V, Tipping P, Drew A, Eeckhout Y, Shapiro S, Lupu F, Collen D (1997). Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation. *Nat Genet*, 17: 439-444.

Camejo G (1982). The interaction of lipids and lipoproteins with the intercellular matrix of arterial tissue: its possible role in atherogenesis. *Adv Lipid Res*, 19: 1-53.

Capers Q 4th, Alexander RW, Lou P, De Leon H, Wilcox JN, Ishizaka N, Howard AB, Taylor WR (1997). Monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic tissues of hypertensive rats. *Hypertension*, 30(6):1397-1402.

Carey RM, Wang ZQ, Siragy HM (2000). Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension*, 35(1 Pt 2):155-163.

Carretero OA, Romero JC. Production and characteristics of experimental hypertension in animals. In: Genest G, Koiw E, Kuchel O, eds. *Hypertension. Physiopathology and Treatment*. New York, McGraw-Hill Book Co., 1977, pp 485-507.

Carvalho Filho ET, Azul LGS, Curiati JAE (1983). Hipertensão arterial no idoso. *Arq Bras Cardiol*, 41(3):211-219.

Cassis LA, Huang J, Gong MC, Daugherty A (2004). Role of metabolism and receptor responsiveness in the attenuated responses to Angiotensin II in mice compared to rats. *Regulatory Peptides*, 117: 107-116.

Chapleau MW; Cunningham JT; Sullivan MJ; Wachtel RE; Abboud FM (1995).

Structural versus functional modulation of the arterial baroreflex. Hypertension, 26:341-347.

Chen BP, Li YS, Zhao Y, Chen KD, Li S, Lao J, Yuan S, Shyy JY, Chien S (2001). DNA microarray analysis of gene expression in endothelial cells in response to 24-h shear stress. *Physiol Genomics, 7: 55-63.*

Chen XL, Tummala PE, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM (1998). Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res, 83(9): 952-959.*

Chien S, Lin SJ, Weinbaum S, Lee MM, Jan KM (1988). The role of arterial endothelial cell mitosis in macromolecular permeability. *Adv Exp Med Biol, 242: 59-73.*

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

Chien S (2003). Review: Molecular and mechanical bases of focal lipid accumulation in arterial wall. *Prog Biophys Mol Biol, 83: 131-151.*

Chobanian AV (1992). Vascular effects of systemic hypertension. *Am J Cardiol, 69(13): 3E-7E.*

Choudhury RP, Aguinaldo JG, Rong JX, Kulak JL, Kulak AR, Reis ED, Fallon JT, Fuster V, Fisher EA, Fayad ZA (2002). Atherosclerotic lesions in genetically modified mice quantified in vivo by non-invasive high-resolution magnetic resonance microscopy. *Atherosclerosis, 162: 315-321.*

Chrysant SG (1998). Vascular remodeling: the role of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Am Heart J, 135(pt 2): S21-S30.*

Clarkson TB, Prichard RW, Morgan TM, Petrick GS, Klein KP (1994). Remodeling of coronary arteries in human and nonhuman primates. *JAMA, 271: 289-294.*

Crawford T, Levene CI (1953). Medial thinning in atheroma. *J Pathol Bacteriol*, 66:19-23.

Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T (1995). Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *Faseb J*, 9: 899-909.

Collins RG, Velji R, Guevara NV, Hicks MJ, Chan L, Beaudet AL (2000). P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med*, 191:189-194.

Cooke JP, Dzau VJ (1997). Derangements of the nitric oxide synthase pathway, L-arginine, and cardiovascular diseases. *Circulation*, 96: 379-382.

Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, 261: 921-923.

Cornhill JF, Herderick EE, Stary HC (1990). Topography of human aortic sudanophilic lesions. *Monogr. Atheroscler.* 15: 13-19.

Cotran RS, Kumar V, Collins T (2000). Robbins: patologia estrutural e funcional. Editora: Guanabara Koogan. Rio de Janeiro; 6ª Ed.: 441-485.

Cox RH, Ragshaw RJ, Detweiler DK (1980). Alterations in carotid sinus reflex control of arterial hemodynamics associated with experimental hyperlipemia in racing greyhound. *Circ Res*, 46:237-244.

Cowan DB, Lye SJ, Langille BL (1998). Regulation of vascular connexin43 gene expression by mechanical loads. *Circ Res*, 82(7):786-793

Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz CJ, Fogelman AM (1990). Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87:5134-5138.

Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW, Milstone DS (2001). A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J. Clin. Invest*, 107: 1255–1262.

Dart AM, Lacombe F, Yeoh JK, Cameron JD, Jennigs GL, Laufer E, Esmore DS (1991). Aortic distensibility in patients with isolated hypercholesterolemia, coronary heart disease or cardiac transplant. *Lancet*, 338:207-273.

Daugherty A, Manning MW, Cassis LA (2000). Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. *J Clin Invest*, 105(11): 1605-1612.

Daugherty A, Cassis LA (2002). Mechanisms of abdominal aortic aneurysm formation. *Curr Atheroscler Rep*, 4: 222–227.

Davis JO (1973). The control of renin release. *Am J Méd*, 55(3): 333-350.

Davies PF (1995). Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev*, 75(3): 519-560.

Dong ZM, Chapman SM, Brown AA, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD (1998). The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J. Clin. Invest*, 102: 145–152.

Dos Santos JE, Dressler WW, Viteri F (1994). Fatores de risco para doença coronária e sua relação com variáveis dietéticas e sociais. *Arq Bras Cardiol*, 63: 371-375.

Drobnik J, Dabrowski R, Szczepanowska A, Giernat L, Lorenc J (2000). Response of aorta connective tissue matrix to injury caused by vasopressin - induced hypertension or hypercholesterolemia. *J Physiol Pharmacol*, 51: 521-533.

Dzau VJ, Gibbons GH, Pratt RE (1991). Molecular mechanisms of vascular renin-angiotensin system in myointimal hyperplasia. *Hypertension*, 18(4 Suppl): II100-105.

Dzau VJ, Gibbons GH, Kobilka BK, Lawn RM, Pratt RE (1995). Genetic models of human vascular disease. *Circulation*, 91: 521-531.

Emberson JR, Whincup PH, Morris RW, Walker M (2003). Reassessing the contribution of serum total cholesterol, blood pressure, and cigarette smoking to the aetiology of coronary heart disease: impact of regression dilution bias. *Eur Heart J*, 24:1719-1726.

Faggiotto A, Ross R (1984). Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque. *Arteriosclerosis*, 4: 341-356.

Favarato D, Luz PL (2003). Hipertensão e aterosclerose. *Hipertensão*, 6:131-134.

Fazan Jr R, Silva VD, Salgado HC (2001). Modelos de hipertensão arterial. *Rev Bras Hipertns*, 8:19-29.

Febbraio M, Podrez EA, Smith JD, Hajjar DP, Hazen SL, Hoff HF, Sharma K, Silverstein RL (2000). Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest*, 105:1049-1056.

Ferns GA, Raines EW, Sprugel KH, Motani AS, Reidy MA, Ross R (1991). Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. *Science*, 253: 1129-1132.

Ferrario CM, Blumle C, Nadzam GR, McCubbin JW (1971). An externally adjustable renal artery clamp. *J Appl Physiol*, 31:635.

Ferrario CM (1998). Angiotension-(1-7) and antihypertensive mechanisms. *J Nephrol*, 11(6): 278-283.

Field LJ, Gross KW (1985). Ren-1 and Ren-2 loci are expressed in mouse kidney. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82: 6196-6200.

Franchini KG. Circulação arterial e hemodinâmica: física dos vasos sanguíneos e da circulação. Em: Fisiologia. Aires M de M, 2ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1999.

Frostegard J, Ulfgren AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, Hansson GK (1999). Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis*, 145: 33-43.

Fruebis J, Gonzalez V, Silvestre M, Palinski W (1997). Effect of probucol treatment on gene expression of VCAM-1, MCP-1, and M-CSF in the aortic wall of LDL receptor-deficient rabbits during early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17: 1289-1302.

Gerrity RG, Richardson M, Somer JB, Bell FP, Schwartz CJ (1977). Endothelial cell morphology in areas of in vivo Evans blue uptake in the aorta of young pigs. II. Ultrastructure of the intima in areas of differing permeability to proteins. *Am J Pathol*, 89: 313-334.

Gerrity RG (1981). The role of the monocyte in atherogenesis. I. Transition of blood - borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *Am J Pathol*, 103: 181-190.

Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ (1987). Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*, 316(22): 1371-1375.

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

Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW (1934). Studies on experimental hypertension. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med*, 59:347-349.

Goldstein JL, Brown MS (1992). Lipoprotein receptors and the control of plasma LDL cholesterol levels. *Eur Heart J*, 13: 34-36.

Grendale HC, Estess P, Picker LJ, Siegelman MH (1996). CD44 and its ligand hyaluronate mediate rolling under physiologic flow: a novel lymphocyte-endothelial cell primary adhesion pathway. *J Exp Med*, 183:1119-1130.

Griendling KK, Murphy TJ, Alexander RW (1993). Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation*, 87(6): 1816-1828.

Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW (1994). Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation Research*, 74(6):1141-1148.

Griendling KK, Alexander RW (1997). Oxidative stress and cardiovascular disease. *Circulation*, 96(10): 3264-3275.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M (2000). NADPH oxidase. Role in cardiovascular biology and disease. *Circulation Research*, 86: 494-501.

Grimsditch DC, Penfold S, Latcham J, Vidgeon-Hart M, Groot PH, Benson GM (1999). C3H apoE(-/-) mice have less atherosclerosis than C57BL apoE(-/-) mice despite having a more atherogenic serum lipid profile. *Atherosclerosis*, 151(2): 389-397.

Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ (1998). Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell*, 2(2): 275-81.

Guimarães CG (2003). Hipertensão como maior fator de risco. *Hipertensão*, 6:142-143.

Gussenhoven EJ, Geselschap JH, van Lankeren W, Posthuma DJ, van der Lugt A (1997). Remodeling of atherosclerotic coronary arteries assessed with intravascular ultrasound in vitro. *Am J Cardiol*, 79: 699 -702.

Haidekker MA, L'Heureux N, Frangos JA (2000). Fluid shear stress increases membrane fluidity in endothelial cells: a study with DCVJ fluorescence. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 278: 1401-1406.

Hamasaki S, Higano ST, Suwaidi JA, Nishimura RA, Miyauchi K, Holmes DR Jr, Lerman A (2000). Cholesterol-lowering treatment is associated with improvement in coronary vascular remodeling and endothelial function in patients with normal or mildly diseased coronary arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20(3): 737-743.

Hartley CJ, Reddy AK, Madala s, McNulty BM, Ronald R, Sullivan ME, Miller MH, Taffet GE, Michael LH, Entman ML, Wang YX (2000). Hemodynamic changes in apolipoprotein E-knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 279: 2326-2334.

Heeneman S, Smits JF, Leenders PJ, Schiffers PM, Daemen MJ (1997). Effects of angiotensin II on cardiac function and peripheral vascular structure during compensated heart failure in the rat. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17(10): 1985-1994.

Heistad DD, Lopez JA, Baumbach GL (1991). Hemodynamic determinants of vascular changes in hypertension and atherosclerosis. *Hypertension*, 17(4 Suppl): III7-11.

Heistad DD, Baumbach GL, Faraci FM, Armstrong ML (1995). Sick vessel syndrome: vascular changes in hypertension and atherosclerosis. *J Hum Hypertens*, 9(6): 449-453.

Higuchi ML, Reis MM, Sambiase NV, Palomino SAP, Castelli JB, Gutierrez PS, Aiello VD, Ramires JAF (2003). Co-infecção por *Mycoplasma pneumoniae* e *Chlamydia pneumoniae* em placas rotas associadas o infarto agudo do miocárdio. *Arq Bras Cardiol*, 81:1-11.

Hishikawa K, Oemar BS, Yang Z, Luscher TF (1997). Pulsatile stretch stimulates superoxide production and activates nuclear factor-kappa B in human coronary smooth muscle. *Circ Res*, 81(5): 797-803.

Hobbs HH, Russell DW, Brown MS, Goldstein JL (1990). The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. *Annu Rev Genet*, 24: 133-70.

Hofker MH, van Vlijmen BJ, Havekes LM (1998). Transgenic mouse models to study the role of APOE in hyperlipidemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 137(1): 1-11.

Hollander W (1976a). Role of hypertension in atherosclerosis and cardiovascular disease. *Am J Cardiol*, 38(6): 786-800.

Hollander W, Madoff I, Paddock J, Kirkpatrick B (1976b). Aggravation of atherosclerosis by hypertension in a subhuman primate model with coarctation of the aorta. *Circ Res*, 38(6 Suppl 2): 63-72.

Hollestelle SCG, de Vries MR, van Keulen JK, Schoneveld AH, Vink A, Strijder CF, van Middelaar BJ, Pasterkamp G, Quax PHA, de Kleijn DPV (2004). Toll-like receptor 4 is involved in outward arterial remodeling. *Circulation*. 109: 393-398.

Hosomi H, Katsuda S, Watanabe Y (1986). Effect of atherosclerosis on the responsiveness of the rapidly acting arterial pressure control system in WHHL rabbits. *Cardiovascular Research*, 22: 679-685.

Howard AB, Alexander RW, Nerem RM, Griendling KK, Taylor WR (1997). Cyclic strain induces an oxidative stress in endothelial cells. *Am J Physiol*, 272(2 Pt 1): C421-427.

Intengan HD, Thibault G, Li JS, Schiffrin EL (1999). Resistance artery mechanics, structure, and extracellular components in spontaneously hypertensive rats. Effects of angiotensin receptor antagonism and converting enzyme inhibition. *Circulation*, 100: 2267 – 2275.

Intengan HD, Schiffrin EL (2000). Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension. *Hypertension*, 36: 312-318.

Isnard RN, Pannier BM, Laurent S, London GM, Diebold B, Safar ME (1989). Pulsatile diameter and elastic modulus of the aortic arch in essential hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, 13(2): 399-405.

Jalali S, del Pozo MA, Chen K, Miao H, Li Y, Schwartz MA, Shyy JY, Chien S (2001). Integrin-mediated mechanotransduction requires its dynamic interaction with specific extracellular matrix (ECM) ligands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 1042-1046.

Jawieñ J, Nastalek P, Korbut R (2004). Mouse models of experimental atherosclerosis. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 55(3): 503-517.

Jeng AY, Chou M, Sawyer WK, Caplan SL, Von Linden-Reed J, Jeune M, Prescott MF (1999). Enhanced expression of matrix metalloproteinase-3, -12, and -13 mRNAs in the aortas of apolipoprotein E-deficient mice with advanced atherosclerosis. *Ann NY Acad Sci*, 878: 555-558.

Jonasson L, Holm J, Skalli O, Gabbiani G, Hansson GK (1985): Expression of class II transplantation antigen on vascular smooth muscle cells in human atherosclerosis. *Journal of Clinical Investigation*, 76:125-131.

Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK (1986). Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis*, 6:131-138.

Jormsjö S, Wuttge DM, Sirsjö A, Whatling C, Hamsten A, Stemme S, Eriksson P (2002). Differential expression of cysteine and aspartic proteases during progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *American Journal of Pathology*, 161(3): 939-945.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 9ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1999.

Kaplan NM (1997). Systemic hypertension: mechanisms and diagnosis. In Braunwald E. *Heart Disease*, 5ª Ed.:807.

Keidar S, Attias J (1997a). Angiotensin II injection into mice increases the uptake of oxidized LDL by their macrophages via a proteoglycan-mediated pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 239(1): 63-67

Keidar S, Attias J, Smith J, Breslow JL, Hayek T (1997b). The angiotensin-II receptor antagonist, losartan, inhibits LDL lipid peroxidation and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 236(3): 622-625.

Keidar S, Heinrich R, Kaplan M, Hayek T, Aviram M (2001). Angiotensin II administration to atherosclerotic mice increases macrophage uptake of oxidized ldl: a possible role for interleukin-6. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21: 1464-1469.

Kitagawa K, Matsumoto M, Sasaki T, Hashimoto H, Kuwabara K, Ohtsuki T, Hori M (2001). Involvement of ICAM-1 in the progression of atherosclerosis in apoE-knockout mice. *Atherosclerosis* 160: 305–310.

Kornowski R, Mintz GS, Lansky AJ, Hong MK, Kent KM, Pichard AD, Satler LF, Popma JJ, Bucher TA, Leon MB (1998). Paradoxical decreases in atherosclerotic plaque mass in insulin-treated diabetic patients. *Am J Cardiol*, 81(11): 1298-1304.

Kowala MC, Grove RI, Aberg G (1994). Inhibitors of angiotensin converting enzyme decrease early atherosclerosis in hyperlipidemic hamsters. Fosinopril reduces plasma cholesterol and captopril inhibits macrophage-foam cell accumulation independently of blood pressure and plasma lipids. *Atherosclerosis*, 108(1): 61-72.

Krams R, Wentzel JJ, Oomen JA, Schuurbiens JC, Andhyiswara I, Kloet J, Post M, de Smet B, Borst C, Slager CJ, Serruys PW (1998). Shear stress in atherosclerosis, and vascular remodelling. *Semin Interv Cardiol*, 3(1): 39-44.

Kuchan MJ, Jo H, Frangos JA, (1994). Role of G proteins in shear stress mediated nitric oxide production by endothelial cells. *Am J Physiol*, 267: 753-758.

Langille BL (1996). Arterial remodeling: relation to hemodynamics. *Can J Physiol Pharmacol*, 74: 834-841.

Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG (1997). Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation*, 95(3): 588-593.

Leake DS, Hornebeck W, Brechemier D, Robert L, Peters TJ (1983). Properties and subcellular localization of elastase-like activities of arterial smooth muscle cells in culture. *Biochim Biophys Acta*, 761: 41-47

Leenen FHH, Myers MG. Pressor mechanisms in renovascular hypertensive rats. In: Dejong W, ed. *Experimental and Genetic Models of Hypertension*. Elsevier 1984, pp 24.

Ledingham JH (1971). Mechanism of renal hypertension. *Proc Royal Soc Med*, 64:409-418.

Lerman A, Cannan CR, Higano SH, Nishimura RA, Holmes DR Jr (1998). Coronary vascular remodeling in association with endothelial dysfunction. *Am J Cardiol*, 81: 1105-1109.

Levy BI, Michel JB, Salzmann JL, Devissaguet M, Safar ME (1991). Remodeling of heart and arteries by chronic converting enzyme inhibition in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*, 4(3):240-245.

Lewandowski J (2003). Renovascular hypertension: is it only the top of the iceberg? *Pol Merkuriusz Lek*, 15(88): 371-375.

Lewington S, Clarke R, Quilzibash N, Peto R, Collins R (2002). Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet*, 360:1903-1913.

Li Z, Mao HZ, Abboud FM, Chapleau MW (1996). Oxygen derived free radicals contribute to baroreceptor dysfunction in atherosclerotic rabbits. *Circulation Research*, 79:802-811.

Li JS, Knafo L, Turgeon A, Garcia R, Schiffrin EL (1996). Effect of endothelin antagonism on blood pressure and vascular structure in renovascular hypertensive rats. *American Journal Physiology*. 40: 88-93.

Lichtenstein O, Safar ME, Mathieu E, Poitevin P, Levy BI (1998). Static and Dynamic Mechanical Properties of the Carotid Artery From Normotensive and Hypertensive Rats. *Hypertension*, 32: 346-350.

Limas C, Westrum B, Limas CJ (1983). Effect of antihypertensive therapy on the vascular changes of spontaneously hypertensive rats. *Am J Pathol*, 111(3): 380-393.

Lin SJ, Jan KM, Weinbaum S, Chien S (1989). Transendothelial transport of low density lipoprotein in association with cell mitosis in rat aorta. *Arteriosclerosis*, 9: 230-236.

Lindner V, Reidy MA (1991). Proliferation of smooth muscle cells after vascular injury is inhibited by an antibody against basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Aca Sci*. 88: 3739–3743.

Lithell H (1994). Pathogenesis and prevalence of atherosclerosis in hypertensive patients. *Am J Hypertension*, 7: 2S-6S.

- Liu Y, Chen BP, Lu M, Zhu Y, Stemerman MB, Chien S, Shyy JY (2002). Shear stress activation of SREBP1 in endothelial cells is mediated by integrins. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol*, 22: 76-81.
- Lutgens E, de Muinck ED, Heeneman S, Daemen MJ (2001). Compensatory enlargement and stenosis develop in apoE(-/-) and apoE*3-Leiden transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21: 1359-1365.
- Makaritsis KP, Gavras H, Du Y, Chobanian AV, Brecher P (1998). Alpha1-adrenergic plus angiotensin receptor blockade reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Hypertension*, 32(6):1044-8.
- Mallat Z, Tedgui A (2000). Apoptosis in the vasculature: mechanisms and functional importance. *Br J Pharmacol*, 130(5): 947-962.
- Malinauskas RA, Herrmann RA, Truskey GA (1995). The distribution of intimal white blood cells in the normal rabbit aorta. *Atherosclerosis*, 115: 147-163.
- Mansur AP, Gomes EPSG, Favarato D, Raineri A, Martins JR, Raimers JAF (1997). Tratamento medicamentoso da doença arterial coronária estável e centros de atendimento primário e terciário. *Arq Bras Cardiol*, 69: 165-168.
- Masuda H, Zhuang YJ, Singh TM, Kawamura K, Murakami M, Zarins CK, Glagov S (1999). Adaptive remodeling of internal elastic lamina and endothelial lining during flow-induced arterial enlargement. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19(10): 2298-2307.
- Mayet J, Hughes A (2003). Cardiac and vascular pathophysiology in hypertension. *Heart*, 89: 1104-1109.

Meyer M, Schreck R, Baeuerle PA (1993). H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF- κ B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant response factor. *EMBO J*, 12: 2005-2015.

Maziere C, Auclair M, Djavaheri MM, Packer L, Maziere JC (1996). Oxidized low density lipoprotein induces activation of the transcription factor NF kappa B in fibroblasts, endothelial and smooth muscle cells. *Biochemistry & Molecular Biology International*, 39:1201-1207.

Mazzolai L, Duchosal MA, Korber M, Bouzourene K, Aubert JF, Hao H, Vallet V, Brunner HR, Nussberger J, Gabbiani G, Hayoz D (2004). Endogenous angiotensin II induces atherosclerotic plaque vulnerability and elicits a Th1 response in apoE^{-/-} mice. *Hypertension*, 44: 277-282.

McGill HC Jr, Carey KD, McMahan CA, Marinez YN, Cooper TE, Mott GE, Schwartz CJ (1985). Effects of two forms of hypertension on atherosclerosis in the hyperlipidemic baboon. *Arteriosclerosis*, 5(5): 481-493.

McVeigh GE (1996). Arterial compliance in hypertension and *diabetes mellitus*. *American Journal of Nephrology*, 16(3): 217-222.

Millatt LJ, Abdel-Rahman EM, Siragy HM (1999). Angiotensin II and nitric oxide: a question of balance. *Regul Pept*, 81(1-3): 1-10.

Mintz GS, Kent KM, Pichard AD, Satler LF, Popma JJ, Leon MB (1997). Contribution of inadequate arterial remodeling to the development of focal coronary artery stenoses. An intravascular ultrasound study. *Circulation*, 95(7): 1791-1798.

Moghadasian MH, McManus BM, Godin DV, Rodrigues B, Frohlich JJ (1999). Proatherogenic and antiatherogenic effects of probucol and phytosterols in

apolipoprotein E-deficient mice: possible mechanisms of action. *Circulation*, 99:1733-1739.

Mondy JS, Lindner V, Miyashiro JK, Berk BC, Dean RH, Geary RL (1997). Platelet-derived growth factor ligand and receptor expression in response to altered blood flow in vivo. *Circ Res*, 81: 320-327.

Morawietz H, Rueckschloss U, Niemann B, Duerschmidt N, Galle J, Hakim K, Zerkowski HR, Sawamura T, Holtz J (1999). Angiotensin II induces LOX-1, the human endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Circulation*, 100(9): 899-902.

Moysés MR, Cabral AM, Marcal D, Vasquez EC (1994). Sigmoidal curve-fitting of baroreceptor sensitivity in renovascular 2K1C hypertensive rats. *Braz J Med Biol Res*. 27(6):1419-24.

Mulvany MJ, Halpern W (1977). Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circulation Research*, 41: 19-26.

Mulvany MJ, Baumbach GL, Aalkjaer C, Heagerty AM, Korsgaard N, Schiffrin EL, Heistad DD (1996). Vascular remodeling. *Hypertension*, 28(3): 505-506.

Mulvany MJ(1999). Vascular remodelling of resistance vessels: can we define this? *Cardiovascular Research*, 41: 9-13.

Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R (1994). ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb*, 14(1): 133-40.

Neaton JD, Wentworth D (1992). Serum cholesterol, blood pressure, cigarette smoking, and death from coronary heart disease: overall findings and differences by age for 316,099 white men. *Arch Intern Med*, 152:56.

Neves MFT, Souza JF, Oigman W (1998). Alterações morfológicas na parede de artéria muscular em pacientes hipertensas. *Arq Bras Cardiol*, 70 (1): 19-23.

Nickenig G, Sachinidis A, Michaelsen F, Bohm M, Seewald S, Vetter H (1997). Upregulation of vascular angiotensin II receptor gene expression by low-density lipoprotein in vascular smooth muscle cells. *Circulation*, 95(2): 473-478.

Niederhoffer N, Lartaud-Idjouadiene I, Giummelly P, Duvivier C, Peslin R, Atkinson J (1997). Calcification of medial elastic fibers and aortic elasticity. *Hypertension*, 29:999-1006.

Nishima PM, Wang J, Toyofuku W, Kuypers FA, Ishida BY, Paigen B (1993). Atherosclerosis and plasma and liver lipids in nine inbred strains of mice. *Lipids*, 28: 599-605.

Nishimura H, Tsuji H, Masuda H, Nakagawa K, Nakahara Y, Kitamura H, Kasahara T, Sugano T, Yoshizumi M, Sawada S, Nakagawa M (1997). Angiotensin II increases plasminogen activator inhibitor-1 and tissue factor mRNA expression without changing that of tissue type plasminogen activator or tissue factor pathway inhibitor in cultured rat aortic endothelial cells. *Thromb Haemost*, 77(6): 1189-1195.

Olesen SP, Clapham DE, Davies PF (1988). Haemodynamic shear stress activates a K⁺ current in vascular endothelial cells. *Nature*, 331: 168-170.

Osawa M, Masuda M, Kusano K, Fujiwara K (2002). Evidence for a role of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 in endothelial cell mechanosignal transduction: is it a mechanoresponsive molecule? *J Cell Biol*, 158: 773-785.

Otsuka S, Sugano M, Makino N, Sawada S, Hata T, Niho Y (1998). Interaction of mRNAs for angiotensin II type 1 and type 2 receptors to vascular remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 32(3): 467-472.

Ozsarlak O, Parizel PM (2004). Role of mr angiography in the evaluation of renovascular hypertension. *JBR-BTR*, 87(1): 36-42.

Page IH (1949). Pathogenesis of arterial hypertension. *JAMA*, 140: 451.

Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA (1987). Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis*, 68: 231-240.

Paigen B, Ishida BY, Verstuyft J, Witters RB, Albee D (1990). Atherosclerosis susceptibility differences among progenitors of recombinant inbred strains of mice. *Atherosclerosis*, 10:316-323.

Pasterkamp G, Borst C, Gussenhoven EJ, Mali W, Post MJ, The S, Reekers JA, van den Berg FG (1995a). Remodeling of de novo atherosclerotic lesions in femoral arteries: impact on mechanism of balloon angioplasty. *J Am Coll Cardiol*, 26: 422-428.

Pasterkamp G, Wensing PJ, Post MJ, Hillen B, Mali WP, Borst C (1995b). Paradoxical arterial wall shrinkage may contribute to luminal narrowing of human atherosclerotic femoral arteries. *Circulation*, 91: 1444-1449.

Pasterkamp G, Borst C, Post MJ, Mali WP, Wensing PJ, Gussenhoven EJ, Hillen B (1996). Atherosclerotic arterial remodeling in the superficial femoral artery: individual variation in local compensatory enlargement response. *Circulation*, 93:1818-1825.

Pasterkamp G, Schoneveld AH, van Wolferen W, Hillen B, Clarijs RJ, Haudenschild CC, Borst C (1997). The impact of atherosclerotic arterial remodeling on percentage of

luminal stenosis varies widely within the arterial system. A postmortem study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17(11): 3057-3063.

Pasterkamp G, Schoneveld AH, Hijnen DJ, de Kleijn DPV, Teepen H, van der Wall AC, Borst C (2000). Atherosclerotic arterial remodeling and the localization of macrophages and matrix metalloproteinases 1, 2 and 9 in the human coronary artery. *Atherosclerosis*, 150: 245-253.

Pasterkamp G, Smits PC (2002). Imaging of atherosclerosis. Remodelling of coronary arteries. *J Cardiovasc Risk*. 9(5):229-235.

Piedrahita JA, Zhang SH, Hagan JR, Oliver PM, Maeda N (1992). Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci*, 89: 4471-4475.

Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL (1992). Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E - deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*, 71: 343-353.

Poiani GJ, Tozzi CA, Yohn SE, Pierce RA, Belsky SA, Berg RA, Yu SY, Deak SB, Riley DJ (1990). Collagen and elastin metabolism in hypertensive pulmonary arteries of rats. *Circ Res*, 66:968-978.

Prescott MF, Sawyer WK, Von Linden-Reed J, Jeune M, Chou M, Caplan SL, Jeng AY (1999). Effect of matrix metalloproteinase inhibition on progression of atherosclerosis and aneurysm in LDL receptor-deficient mice overexpressing MMP-3, MMP-12, and MMP-13 and on restenosis in rats after balloon injury. *Ann N Y Acad Sci*, 878: 179-190.

Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature*, 1990, 344: 254-257.

Reddick RL, Zhang SH, Maeda N (1994). Atherosclerosis in mice lacking apoE. Evaluation of lesional development and progression. *Arterioscler Thromb*, 14: 141-147.

Reid IA, Morris BJ, Ganong WJ (1978). The renin-angiotensin system. *Annu Rev Physiol*, 40:377-410.

Robbins J (1993). Gene targeting: the precise manipulation of the mammalian genome. *Circ Res*, 73: 3-9.

Rocha WA. *Remodelamento ventricular e arterial após suspensão do uso a longo prazo do captopril em ratos com hipertensão espontânea*. Dissertação de mestrado. Vitória, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, 101p, 2003.

Romanenko VG, Davies PF, Levitan I (2002). Dual effect of fluid shear stress on volume-regulated anion current in bovine aortic endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 282: 708-718.

Rosenfeld ME, Tsukada T, Chait A, Bierman EL, Gown AM, Ross R (1987). Fatty streak expansion and maturation in Watanabe heritable hyperlipidemic and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis*, 7: 24-34.

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

Ross R (1999). Mechanisms of disease: atherosclerosis – an inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine*, 340(2): 115-126.

Roux SP, Kuhn H, Lengsfeld H, Morand OH (1992). Effects of chronic aortic coarctation on atherosclerosis and arterial lipid accumulation in the Watanabe hereditary hyperlipidemic (WHHL) rabbit. *Atherosclerosis*, 93(1-2):123-132.

Safar ME, Simon AC, Levenson JA (1984). Structural changes of large arteries in sustained essential hypertension. *Hypertension*, 6(6 Pt 2): III-117-III-121.

Safar ME, London GM, Asmar R, Frohlich ED (1998). Recent advances on large arteries in hypertension. *Hypertension*, 32(1): 156-161.

Santos RA, Brosnihan KB, Chappell MC, Pesquero J, Chernicky CL, Greene LJ, Ferrario CM (1988). Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. *Hypertension*, (suppl. I) 11: 153-157.

Saraff K, Babamusta F, Cassis LA, Daugherty A (2003). Aortic dissection precedes formation of aneurysms and atherosclerosis in angiotensin II-infused, apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23:1621-1626.

Sasaki K, Hattori T, Fujisawa T, Takahashi K, Inoue H, Takigawa M (1998). Nitric oxide mediates interleukin-1-induced gene expression of matrix metalloproteinases and basic fibroblast growth factor in cultured rabbit articular chondrocytes. *J Biochem*, 123:431-439.

Satoh A, Toida T, Yoshida K, Kojima K, Matsumoto I (2000). New role of glycosaminoglycans on the plasma membrane proposed by their interaction with phosphatidylcholine. *FEBS Lett*, 477: 249-252.

Schenk H, Klein M, Erdbrügger W, Dröge W, Schulze-Osthoff K (1994). Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF- κ B and AP-1. *Proc Natl Acad Sci*, 91: 1672-1676.

Schieffer B, Schieffer E, Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Kovanen PT, Kaartinen M, Nussberger J, Harringer W, Drexler H (2000). Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability. *Circulation*, 101(12):1372-1378.

Schiffrin EL, Deng LY, Larochele P (1993). Morphology of resistance arteries and comparison of effects of vasoconstrictors in mild essential hypertensive patients. *Clinical Investigation Medicine*, 16: 177-186.

Schiffrin EL, Hayoz D (1997). How to assess vascular remodelling in small and medium-sized muscular arteries in humans. *Journal of Hypertension*, 15(6): 571-84.

Schoenhagen P, Ziada KM, Kapadia SR, Crowe TD, Nissen SE, Tuzcu EM (2000). Extent and direction of arterial remodeling in stable versus unstable coronary syndromes. An intravascular ultrasound study. *Circulation*, 101: 598-603.

Schoenhagen P, Vince DG, Ziada KM, Kapadia SR, Lauer MA, Crowe TD, Nissen SE, Tuzcu EM (2002). Relation of matrix-metalloproteinase 3 found in coronary lesion samples retrieved by directional coronary atherectomy to intravascular ultrasound observations on coronary remodeling. *Am J Cardiol*, 89: 1354-1359.

Schwarz G, Droogmans G, Nilius B (1992). Shear stress induced membrane currents and calcium transients in human vascular endothelial cells. *Pflugers Arch*, 421: 394-396.

Schwartz MA (2001). Integrin signaling revisited. *Trends Cell Biol*, 11: 466-470.

Schwartz SM, de Blois D, O'Brien ER (1995). The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ Res*, 77:445-465.

Seo HS, Lombardi DM, Polinsky P, Powell-Braxton L, Bunting S, Schwartz SM, Rosenfeld ME (1997). Peripheral vascular stenosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17: 3593-3601.

Siegelman MH, Stanescu D, Estess P (2000). The CD44-initiated pathway of T-cell extravasation uses VLA-4 but not LFA-1 for firm adhesion. *J Clin Invest*, 105:683-691.

Shepherd JT, Vanhoutte, PM. The human cardiovascular system. Facts and concepts. Raven Press, New York, 1980.

Shimaoka T, Kume N, Minami M, Hayashida K, Kataoka H, Kita T, Yonehara S (2000). Molecular cloning of a novel scavenger receptor for oxidized low density lipoprotein, SR-PSOX, on macrophages. *J Biol Chem*, 275: 40663-40666.

Shu Chien (2003). Review: Molecular and mechanical bases of focal lipid accumulation in arterial wall. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 83: 131–151.

Shyy YJ, Hsieh HJ, Usami S, Chien S (1994). Fluid shear stress induces a biphasic response of human monocyte chemotactic protein 1 gene expression in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci*, 91: 4678-4682.

de Smet BJGL, Pasterkamp G, van der Helm YJ, Borst C, Post MJ (1998). The relation between de novo atherosclerotic remodeling and angioplasty-induced remodeling in an atherosclerotic Yucatan micropig model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18: 702-707.

Sary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW (1995a). A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 15(9): 1512-1531;

Sary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW (1995b). A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Circulation, 92(5): 1355-1374.

Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL (1989). Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 320: 915-920.

Steinberg D (1997). Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation*, 95: 1062-1071.

Steinberg D (2002). Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nature Medicine*, 8(11): 1211-1217.

Steinbrecher UP (1999). Receptors for oxidized low density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta*, 1436: 279-298.

Stopeck AT, Nicholson AC, Mancini FP, Hajjar DP (1993). Cytokine regulation of low density lipoprotein receptor gene transcription in HepG2 cells. *J Biol Chem*, 268: 17489-17494.

Su EJ, Lombardi DM, Siegal J, Schwartz SM (1998). Angiotensin II induces vascular smooth muscle cell replication independent of blood pressure. *Hypertension*, 31(6): 1331-1337.

Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, Ueda O, Sakaguchi H, Higashi T, Suzuki T, Takashima Y, Kawabe Y, Cynshi O, Wada Y, Honda M, Kurihara H, Aburatani H, Doi T, Matsumoto A, Azuma S, Noda T, Toyoda Y, Itakura H, Yazaki Y, Kodama T, *et alii* (1997). A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature*, 386: 292-296.

Suzuki Y, Ortega MR, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egido J (2003). Inflammation and angiotensin II. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35: 881-900.

Tangirala RK, Rubin EM, Palinski W (1995). Quantitation of atherosclerosis in murine models: Correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and

differences in the extent of lesions between sexes in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice. *J Lip Res*, 36: 2320-2328.

Tauth J, Pinnow E, Sullebarger JT, Basta L, Gursoy S, Lindsay J Jr, Matar F (1997). Predictors of coronary arterial remodeling patterns in patients with myocardial ischemia. *Am J Cardiol*, 80(10): 1352-1355.

Taylor WR (1998). Mechanical deformation of the arterial wall in hypertension: a mechanism for vascular pathology. *Am J Med Sci*, 316(3): 156-161.

Taylor AJ, Burke AP, Farb A, Yousefi P, Malcom GT, Smialek J, Virmani R (1999). Arterial remodeling in the left coronary system: the role of high-density lipoprotein cholesterol. *J Am Coll Cardiol*, 34: 760 -767.

Textor SC (2004). Ischemic nephropathy: where are we now? *J Am Soc Nephrol*, 15(8):1974-1982.

Tham DM, Martin-McNulty B, Wang YX, da Cunha V, Wilson DW, Athanassious CN, Powers AF, Sullivan ME, Rutledge JC (2002). Angiotensin II injures the arterial wall causing increased aortic stiffening in apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 283(6): R1442-1449.

Thoma R. *Untersuchungen uber die Histogenese und Histomechanik des Gefasssystems*. Stuttgart, Germany: Enke; 1893.

Thubrikar MJ, Baker JW, Nolan SP (1988). Inhibition of atherosclerosis associated with reduction of arterial intramural stress in rabbits. *Arteriosclerosis*, 8(4): 410-420.

Thubrikar MJ, Roskelley SK, Eppink RT (1990). Study of stress concentration in the walls of the bovine coronary arterial branch. *J Biomech*, 23(1): 15-26.

Thubrikar MJ, Robicsek F (1995). Pressure-induced arterial wall stress and atherosclerosis. *Ann Thorac Surg*, 59(6): 1594-1603.

Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JA, Smith RD (1993). Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev*, 45(2): 205-251.

Traub O, Ishida T, Ishida M, Tupper JC, Berk BC (1999). Shear stress-mediated extracellular signal-regulated kinase activation is regulated by sodium in endothelial cells. Potential role for a voltage-dependent sodium channel. *J Biol Chem*, 274: 20144-20150.

Tronc F, Wassef M, Esposito B, Henrion D, Glagov S, Tedgui A (1996). Role of NO in flow-induced remodeling of the rabbit common carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 16: 1256-1262.

Tse J, Martin-McNulty B, Halks-Miller M, Kauser K, DeVecchio V, Vergona R, Sullivan ME, Rubanyi GM (1999). Accelerated atherosclerosis and premature calcified cartilaginous metaplasia in the aorta of diabetic male Apo E knockout mice can be prevented by chronic treatment with 17 β -estradiol. *Atherosclerosis*, 144: 303-313.

Touyz RM (2000). Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Current Hypertension Reports*, 2: 98-105.

Touyz RM (2004). Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells-implications in cardiovascular disease. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37: 1263-1273

Tuttle JL, Nachreiner RD, Bhuller AS, Condict KW, Connors BA, Herring BP, Dalsing MC, Unthank JL (2001). Shear level influences resistance artery remodeling: wall

dimensions, cell density, and eNOS expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 281(3): H1380-H1389.

d'Uscio LV, Baker TA, Mantilla CB, Smith L, Weiler D, Sieck GC, Katusic ZS (2001). Mechanism of endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21:1017-1022.

Vorp DA, Raghavan ML, Webster MW (1998). Mechanical wall stress in abdominal aortic aneurysm: influence of diameter and asymmetry. *J Vasc Surg*, 27: 632-639.
Walpole PL, Gotlieb AI, Cybulsky MI, Langille BL (1995). Expression of ICAM-1 and VCAM-1 and monocyte adherence in arteries exposed to altered shear stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 15: 2-10.

Wang M, Takagi G, Asai K, Resuello RG, Natividad FF, Vatner DE, Vatner SF, Lakatta EG (2003). Aging increases aortic MMP-2 activity and angiotensin II in nonhuman primates. *Hypertension*, 41(6): 1308-1316.

Wang YX, Halks-Miller M, Vergona R, Sullivan ME, Fitch R, Mallari C, Martin-McNulty B, da Cunha V, Freay A, Rubanyi GM, Kauser K (2000). Increased aortic stiffness assessed by pulse wave velocity in apolipoprotein E-deficient mice. *American Journal Physiology Heart Circ Physiol*, 278(2): H428-434.

Ward MR, Pasterkamp G, Yeung AC, Borst C (2000). Arterial remodeling: mechanisms and clinical implications. *Circulation*, 102:1186-1191.

Weinbaum S, Tzeghai G, Ganatos P, Pfeffer R, Chien, S (1985). Effect of cell turnover and leaky junctions on arterial macromolecular transport. *Am J Physiol*, 248: 945-960.

Wensing PJ, Meiss L, Mali WP, Hillen B (1998). Early atherosclerotic lesions spiraling through the femoral artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18: 1554 -1558.

Wiesel P, Mazzolai L, Nussberger J, Pedrazzini T (1997). Two-Kidney, One Clip and One-Kidney, One Clip Hypertension in Mice. *Hypertension*, 29: 1025-1030.

Wilcox CS (2002). Reactive oxygen species: roles in blood pressure and kidney function. *Current Hypertension Reports*, 4: 160-166.

Wilson PW (1994). Established risk factors and coronary artery disease: the Framingham Study. *Am J Hypertension*, 7: 7S-12S.

Wong CB, Porter TR, Xie F, Deligonul U (1995). Segmental analysis of coronary arteries with equivalent plaque burden by intravascular ultrasound in patients with and without angiographically significant coronary artery disease. *Am J Cardiol*, 76: 598-601.

Wung BS, Cheng JJ, Hsieh HJ, Shyy YJ, Wang DL (1997). Cyclic strain-induced monocyte chemotactic protein-1 gene expression in endothelial cells involves reactive oxygen species activation of activator protein 1. *Circ Res*, 81(1): 1-7.

Wuttge DM, Bruzelius M, Stemme S (1999). T-cell recognition of lipid peroxidation products breaks tolerance to self-proteins. *Immunology*, 98:273-279.

Xu CP, Glagov S, Zatina MA, Zarins CK (1991). Hypertension sustains plaque progression despite reduction of hypercholesterolemia. *Hypertension*, 18(2): 123-129

Xu C, Zarins CK, Pannaraj PS, Bassiouny HS, Glagov S (2000). Hypercholesterolemia superimposed by experimental hypertension induces differential distribution of collagen and elastin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20: 2566-2572.

Yang Z, Shen W, Zhang D (2003). Relationship between coronary arterial remodeling and clinical presentation. *Chin Med J*, 116(2): 263-266.

Yamagishi M, Terashima M, Awano K, Kijima M, Nakatani S, Daikoku S, Ito K, Yasumura Y, Miyatake K (2000). Morphology of vulnerable coronary plaque: insights from follow-up of patients examined by intravascular ultrasound before an acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol*, 35:106-111.

Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G (2000). Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*, 342(3): 145-153.

Zanchetti A, Mancia G (1991). Cardiovascular reflexes and hypertension. *Hypertension*, 18(suppl III):13-21.

Zarins CK, Runyon-Hass A, Zatina MA, Lu CT, Glagov S (1986). Increased collagenase activity in early aneurysmal dilatation. *J Vasc Surg*, 3: 238-248.

Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N (1992). Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*; 258: 468-471.

Zhou J, Moller J, Danielsen CC, Bentzon J, Ravn HB, Austin RC, Falk E (2001). Dietary supplementation with methionine and homocysteine promotes early atherosclerosis but not plaque rupture in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21:1470-1476.

Zhou X, Stemme S, Hansson GK (1996). Evidence for a local immune response in atherosclerosis. CD4+ T cells infiltrate lesions of apolipoprotein-E-deficient mice. *Am J Pathol*, 149: 359-366.

Zhou X, Paulsson G, Stemme S, Hansson GK (1998). Hypercholesterolemia is associated with a T helper (Th) 1/Th2 switch of the autoimmune response in atherosclerotic apo E-knockout mice. *J Clin Invest*, 101: 1717-1725.

ANEXOS



ANEXO I

Tabela: valores individuais do peso, idade e parâmetros morfométricos do grupo C57

C57 Sh	Peso (g)	Idade(d)	X Dex (mm2)	X Din (mm2)	ASTv (mm2)	ASTL (mm2)	ASTp (mm2)
8	27	99	1	0,9	0,78	0,63	0,15
11	25	95	0,87	0,75	0,59	0,44	0,15
15	28	91	0,96	0,84	0,72	0,56	0,16
38	27,5	96	0,92	0,82	0,67	0,53	0,14
39	31,5	92	0,86	0,75	0,58	0,45	0,14
40	29,5	92	0,92	0,81	0,66	0,51	0,14
41	24,8	69	0,82	0,72	0,53	0,4	0,13
46	27	89	0,95	0,81	0,7	0,52	0,18
47	28	89	0,89	0,75	0,62	0,44	0,18
57	27,5	96	0,91	0,8	0,65	0,5	0,15
60	27	90	0,91	0,8	0,65	0,5	0,15
MEDIA	27,5	91	0,91	0,80	0,65	0,50	0,15
DP	1,86	7,90	0,05	0,05	0,07	0,06	0,02
EPM	0,56	2,38	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00

C57 2R	Peso (g)	Idade(d)	X Dex (mm2)	X Din (mm2)	ASTv (mm2)	ASTL (mm2)	ASTp (mm2)
3	25	86	0,89	0,74	0,62	0,43	0,19
6	27	98	1,03	0,91	0,83	0,66	0,17
9	22,5	115	0,89	0,79	0,63	0,49	0,14
12	26,5	101	1,09	0,97	0,93	0,74	0,19
31	26	85	0,9	0,75	0,63	0,44	0,19
30	27	85	0,86	0,75	0,58	0,45	0,14
44	28	86	1,15	0,81	1,05	0,81	0,24
45	28	84	1,12	0,99	0,99	0,76	0,22
50	26	88	0,9	0,77	0,64	0,47	0,17
55	26	96	0,9	0,77	0,63	0,46	0,17
56	26	96	0,94	0,81	0,69	0,51	0,18
MEDIA	26	93	0,97	0,82	0,75	0,57	0,18
DP	1,52	9,60	0,11	0,09	0,17	0,15	0,03
EPM	0,46	2,90	0,03	0,03	0,05	0,04	0,01

Onde: C57Sh = camundongo C57 Sham; C57 2R = camundongo C57-2R1C; X Dex = média do maior diâmetro; X Din = média do menor diâmetro; AST = área de secção transversal, V = do vaso, L = do lúmen, P = da parede; DP = desvio padrão; EPM = erro padrão da média.

ANEXO II

Tabela: valores individuais do peso, idade e parâmetros morfométricos do grupo ApoE.

ApoESh	Peso (g)	Idade(d)	X Dex (mm ²)	X Din (mm ²)	ASTV (mm ²)	ASTL (mm ²)	ASTp (mm ²)
T2	25,5	93	0,86	0,69	0,58	0,37	0,21
16	26,5	85	0,91	0,79	0,65	0,49	0,15
21	27	80	1,06	0,93	0,89	0,68	0,2
T1	25,5	90	0,96	0,82	0,73	0,52	0,2
32	26,5	106	0,87	0,74	0,59	0,44	0,16
34	24,5	93	0,81	0,68	0,51	0,37	0,15
36	28	95	0,93	0,82	0,68	0,52	0,16
35	30	93	0,84	0,7	0,55	0,39	0,16
37	27	95	0,91	0,78	0,64	0,48	0,17
51	28,5	98	0,89	0,79	0,62	0,49	0,13
52	27	98	1,03	0,9	0,83	0,64	0,19
13	24	80	1,04	0,94	0,85	0,69	0,16
MEDIA	27	92	0,93	0,80	0,68	0,51	0,17
DP	1,68	7,57	0,08	0,09	0,12	0,11	0,02
EPM	0,49	2,18	0,02	0,03	0,04	0,03	0,01

ApoE2R	Peso (g)	Idade(d)	X Dex (mm ²)	X Din (mm ²)	ASTV (mm ²)	ASTL (mm ²)	ASTp (mm ²)
5	26,5	85	0,96	0,87	0,72	0,6	0,13
18	25,5	83	1,1	0,96	0,95	0,73	0,22
20	25,5	80	1,00	0,86	0,79	0,58	0,21
33	25,5	106	0,9	0,78	0,63	0,47	0,16
61	26	87	0,95	0,82	0,72	0,53	0,19
43	24,5	88	0,91	0,78	0,66	0,47	0,18
48	25	88	0,97	0,81	0,73	0,51	0,22
49	26	93	0,95	0,79	0,71	0,49	0,23
53	25,5	84	0,92	0,8	0,67	0,51	0,16
58	25,5	78	0,96	0,81	0,72	0,53	0,2
42	26,5	87	0,95	0,82	0,72	0,53	0,19
MEDIA	26	87	0,96	0,83	0,73	0,54	0,19
DP	0,60	7,47	0,05	0,05	0,08	0,07	0,03
EPM	0,18	2,25	0,02	0,02	0,03	0,02	0,01

Onde: ApoESh = camundongo ApoE Sham; ApoE2R = camundongo ApoE-2R1C; X Dex = média do maior diâmetro; X Din = média do menor diâmetro; AST = área de secção transversal, V = do vaso, L= do lúmen, P = da parede; DP = desvio padrão; EPM = erro padrão da média.

ANEXO III

Tabela: valores individuais da razão parede-luz (p:l) e do índice de remodelamento (RR)

C57 Sh	p:l	RR (%)
8	0,11	controle
11	0,16	
15	0,14	
38	0,12	
39	0,15	
40	0,14	
41	0,14	
46	0,17	
47	0,19	
57	0,14	
60	0,14	
MEDIA	0,14	
DP	0,02	
EPM	0,01	

C57 2R	p:l	R:R (%)
3	0,20	95,38
6	0,13	127,69
9	0,13	96,92
12	0,12	143,08
31	0,20	96,92
30	0,15	89,23
44	0,42	161,54
45	0,13	152,31
50	0,17	98,46
55	0,17	96,92
56	0,16	106,15
MEDIA	0,18	114,97
DP	0,08	26,25
EPM	0,03	7,91

Tabela: valores individuais da área

de lesão aterosclerótica

C57 Sh	Area de Lesão (µm ²)
11	1932,554
15	281,350
38	2902,578
39	350,713
40	650,719
41	137,880
46	160,546
47	444,425
57	741,062
M totais	844,6
DP	945,8
EPM	315,3

C57 2R M	Area de Lesão (µm ²)
6	4517,413
9	1154,115
12	923,426
30	457,493
31	2419,042
44	1811,646
45	829,926
50	1221,959
55	856,067
56	780,065
M totais	1497,1
DP	1203,9
EPM	380,7

ANEXO IV

Tabela: valores individuais da razão parede-luz (p:l) e do índice de remodelamento (RR)

ApoESh	p:l	R:R (%)
T2	0,25	89,23
16	0,15	100,00
21	0,14	136,92
T1	0,17	112,31
32	0,18	90,77
34	0,19	78,46
36	0,13	104,62
35	0,20	84,62
37	0,17	98,46
51	0,13	95,38
52	0,14	127,69
13	0,11	130,77
MEDIA	0,17	101,68
DP	0,03	19,01
EPM	0,01	5,16

ApoE2R	p:l	R:R (%)
5	0,10	110,77
18	0,15	146,15
20	0,16	121,54
33	0,15	96,92
61	0,16	110,77
43	0,17	101,54
48	0,20	112,31
49	0,20	109,23
53	0,15	103,08
58	0,19	110,77
42	0,16	110,77
MEDIA	0,16	112,17
DP	0,03	12,99
EPM	0,01	3,92

Tabela: valores individuais da área

de lesão aterosclerótica

ApoESh	Area de Lesão (µm ²)
T2	120965,5
16	8603,1
21	
T1	
32	19410,3
34	110830,8
36	45604,2
35	83071,5
37	68785,4
51	47365,5
52	104957,1
13	
M totais	67732,6
DP	40387,3
EPM	13462,4

ApoE2R M	Area de Lesão(µm ²)
5	74514,8
18	49298,0
20	20209,0
33	42942,7
61	
43	107848,6
48	161766,2
49	56743,9
53	114909,0
58	103237,5
42	
M totais	81274,4
DP	44253,5
EPM	14751,2

ANEXO V

Tabela: valores individuais da área de parede (ASTp), raio (r), tensão e stress de parede (σ) do grupo C57

C57 Sh	ASTp (mm2)	r	Tensão	σ
8	0,15	0,45	229	1526
11	0,15	0,37	278	1856
15	0,16	0,42	245	1533
38	0,14	0,41	251	1794
39	0,14	0,38	271	1936
40	0,14	0,4	258	1839
41	0,13	0,36	286	2201
46	0,18	0,37	278	1547
47	0,18	0,41	251	1396
57	0,15	0,4	258	1717
60	0,15	0,4	258	1717
MEDIA	0,15	0,40	260	1733
DP	0,02	0,03	17	229
EPM	0,00	0,01	5	69

C57 2R	ASTp (mm2)	r	Tensão	σ
3	0,19	0,37	346	1824
6	0,17	0,46	279	1639
9	0,14	0,39	329	2348
12	0,19	0,48	267	1406
31	0,19	0,37	346	1824
30	0,14	0,38	337	2410
44	0,24	0,51	251	1047
45	0,22	0,49	262	1189
50	0,17	0,39	329	1934
55	0,17	0,38	337	1985
56	0,18	0,4	321	1781
MEDIA	0,18	0,42	309	1762
DP	0,03	0,05	37	428
EPM	0,01	0,02	11	129

ANEXO VI

Tabela: valores individuais da área de parede (ASTp), raio (r), tensão e stress de parede (σ) do grupo ApoE

ApoESh	ASTp (mm ²)	r	Tensão	σ
T2	0,21	0,34	306	1457
16	0,15	0,4	260	1733
21	0,2	0,47	221	1106
T1	0,2	0,41	254	1268
32	0,16	0,37	281	1757
34	0,15	0,34	306	2039
36	0,16	0,41	254	1585
35	0,16	0,35	297	1857
37	0,17	0,39	267	1569
51	0,13	0,39	267	2051
52	0,19	0,45	231	1216
13	0,16	0,47	221	1383
MEDIA	0,17	0,40	264	1585
DP	0,02	0,05	30	312
EPM	0,01	0,01	9	90

ApoE2R	ASTp (mm ²)	r	Tensão	σ
5	0,13	0,44	287	2210
18	0,22	0,48	263	1197
20	0,21	0,43	294	1400
33	0,16	0,39	324	2026
61	0,19	0,41	308	1623
43	0,18	0,39	324	1801
48	0,22	0,4	316	1436
49	0,23	0,39	324	1409
53	0,16	0,4	316	1975
58	0,2	0,41	308	1541
42	0,19	0,37	342	1798
MEDIA	0,19	0,41	310	1674
DP	0,60	0,03	22	313
EPM	0,18	0,01	6	94