

**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

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

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

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

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

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

<b>Figura 17:</b> Área de secção transversal da parede vascular.	67
<b>Figura 18:</b> Área transversal de deposição de lipídios na parede vascular.	69
<b>Figura 19:</b> Histologia de animal C57- <i>Sham</i> coloração <i>Oil-Red-O</i> .	71
<b>Figura 20:</b> Túnicas vasculares do animal C57- <i>Sham</i> , coloração HE.	72
<b>Figura 21:</b> Achados morfológicos em segmento da aorta do grupo C57-2R1C.	72
<b>Figura 22:</b> Histologia de animal apoE- <i>Sham</i> coloração <i>Oil-Red-O</i> .	73
<b>Figura 23:</b> Histologia de animal apoE- <i>Sham</i> , mostrando a associação entre ruptura da lâmina elástica interna e células espumosas.	73
<b>Figura 24:</b> Histologia de animal apoE- <i>Sham</i> coloração Verhoeff-floxina.	74
<b>Figura 25:</b> Seqüência de ampliação de duas lesões ateroscleróticas de um animal apoE-2R1C.	74
<b>Figura 26:</b> Histologia de animal apoE-2R1C mostrando a adesão de leucócitos na parede vascular.	75
<b>Figura 27:</b> Histologia de animal apoE-2R1C mostrando a adesão de leucócitos na parede vascular com maior detalhe.	75
<b>Figura 28:</b> Histologia das lesões ateroscleróticas de animal apoE-2R1C.	76
<b>Figura 29:</b> Histologia de placa ateroscleróticas em animal apoE-2R1C, e hipertrofia da camada média.	77
<b>Figura 30:</b> Histologia de animal apoE-2R1C mostrando ruptura da lâmina elástica e áreas de hipertrofia da camada média.	77
<b>Tabela 1:</b> Terminologia do Remodelamento Arterial	34
<b>Tabela 2:</b> Razão parede:luz (p:l)	68
<b>Tabela 3:</b> Índice de Remodelamento Vascular (RR)	68
<b>Tabela 4:</b> Tensão de Parede (T)	71
<b>Tabela 5:</b> Estresse de Parede ( $\sigma$ )	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<sup>-/-</sup>: camundongo deficiente (*knockout*) homocigoticamente para apolipoproteína E
- AST<sub>L</sub>: área de secção transversal do lúmen
- AST<sub>lip</sub>: área de secção transversal de lipídios
- AST<sub>M</sub>: área de secção transversal da camada média
- AST<sub>p</sub>: área de secção transversal da parede (média-íntima)
- AST<sub>v</sub>: 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 H<sub>2</sub>O: 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
- $\mu\text{m}$ : micrômetro
- MMP: metaloproteinase
- NF- $\kappa$ 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
- $\sigma$ : estresse de parede
- SRA: sistema renina-angiotensina
- TNF-  $\alpha$ : fator de necrose tumoral  $\alpha$
- TGF- $\beta$ : fator de crescimento transformador  $\beta$
- 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<sup>-/-</sup>) 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

O camundongo *knockout* para apolipoproteína E (apoE<sup>-/-</sup>) 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<sup>-/-</sup> 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 mm<sup>2</sup>) do que no grupo C57-*Sham* (0,65±0,02 mm<sup>2</sup>, 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 mm<sup>2</sup>) 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 mm<sup>2</sup>) do que nos grupos controles (C57: 0,15±0,01 e apoE: 0,17±0,01 mm<sup>2</sup>, 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

ApoE<sup>-/-</sup> 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<sup>-/-</sup> mice with renovascular hypertension.

Male (12-14 weeks old) C57 and ApoE<sup>-/-</sup> 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 mm<sup>2</sup>) than in their respective controls (0.64±0.02 and 0.63±0.03 mm<sup>2</sup>, p<0.05). The wall vessel area was also greater in these hypertensive groups (0.18±0.01 and 0.19±0.01 mm<sup>2</sup>) than in the normotensive groups (0.15±0.01 and 0.17±0.01 mm<sup>2</sup>, 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<sup>-/-</sup> 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.