

X
LILIANA APARECIDA LUCCI DE ANGELO ANDRADE

Médica pela Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP

- ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO FINAL DA TESE DE DOUTORADO APRESENTADA PELA MÉDICA LILIANA Ap.L. DE ANGELO ANDRADE EM 30 DE JUNHO DE 1986.

Prof. Dr. José Lopes de Faria

ÍNTIMA DA AORTA NORMAL DE COELHO EM ÁREAS PREDISPOSTAS À
ATEROSCLEROSE

- Estudo morfológico qualitativo em microscopia
óptica e eletrônica

X
Orientador: Prof. Dr. JOSÉ LOPES DE FARIA

Prof. Titular do Departamento de Anatomia Patológica
da FCM-UNICAMP.

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP,
para obtenção do título de Doutor em Medicina.

CAMPINAS, 1986

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais, Waldomiro e Odette

*Ao João Carlos, companheiro de todas
as horas.*

*Aos meus filhos, Gustavo e Maurício,
fontes de alegria e de aprendizado
de vida.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. JOSÉ LOPES DE FARIA, pelo seu exemplo de trabalho, incansável, amigo, sempre disposto a colaborar e por quem tenho o maior respeito e admiração. Um educador.

As biólogas Isilda de Lourdes Passos Sene e Fátima Neder pelo trabalho cuidadoso, com carinho e responsabilidade no processamento do material para microscopia eletrônica.

Ao Marco Antonio Gôngora, pelo espírito de cooperação na execução das fotografias.

Ao Sebastião Henrique Militão, pelos cuidados especiais com o biotério e pela colaboração nos procedimentos com os animais.

Ao Ismael Vêncio e Jamilson Conceição Alves pelo processamento do material para microscopia óptica e pelas técnicas de coloração especial.

À Vilma Proide, pela confecção dos desenhos.

À Taka Ota Perroni, pelo serviço de datilografia.

À Comissão de Pós-Graduação da FCM-UNICAMP, pelas facilidades concedidas.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Anatomia Patológica que, através de uma convivência fraterna permitem um bom ambiente para que se possa trabalhar.

Aos meus familiares pelo apoio, compreensão e ânimo que sempre me deram.

ÍNDICE

ABSTRACT

I - INTRODUÇÃO	1
1. MORFOLOGIA DAS ARTÉRIAS NORMAIS	1
2. RELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA E FUNÇÃO	4
3. ESPESSEAMENTO INTIMAL DIFUSO	5
4. OBJETIVOS DO TRABALHO	10
II - MATERIAL E MÉTODO	12
III - RESULTADOS	18
1. MACROSCOPIA DA AORTA	18
2. MICROSCOPIA ÓPTICA	22
3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA	32
3.1. Endotélio	32
3.2. Junções intercelulares	34
3.3. Membrana basal	36
3.4. Espaço subendotelial	36
3.5. Membrana Elástica interna	42
IV - DISCUSSÃO	63
1. ASPECTOS MACROSCÓPICOS E DO AZUL DE EVANS	63
2. ASPECTOS MORFOLÓGICOS EM MICROSCOPIA ÓPTICA	70
2.1. Membrana elástica interna	70
2.2. Espessecimento intimal difuso	72

3. DADOS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA	74
3.1. Aspectos gerais	74
3.2. Endotélio	76
3.3. Junções intercelulares	78
3.4. Espaço subendotelial	80
V - RESUMO E CONCLUSÕES	87
VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
VII - APÊNDICE	106

ABSTRACT

In order to understand the alterations caused by atherosclerosis it is necessary to know the normal morphology of the arteries. According to the literature the smaller curvature of the aortic arch is a predisposing area for the development of atherosclerosis.

The main purpose of this thesis is to describe the morphological findings, comparing the smaller curvature in normal rabbit aortic intima, using both light and electron microscopy, with the greater curvature of the same arch, used as control.

Ten adult, male, New Zealand rabbits, five to six months of age, were studied. Seven of them received Evans blue dye in the ear vein, three hours before perfusion with Karnovsky fixative. Samples from both curvatures were embedded in paraffin or in Araldite, for light or transmission electron microscopy.

The pattern of the "in vivo" Evans blue intimal uptake observed in this study was weak and poorly delimited, but it was similar to that reported by other authors. The stained areas were mainly localized in the ascendent aorta and in the smaller curvature of the arch.

No differences were observed in the morphology of the two curvatures of the aortic arch, or between blue or white areas, by either light or transmission electron microscopy.

From this, we may conclude that: 1°) the different intimal permeability of the adult rabbits to Evans blue dye can not be explained by morphological methods such as those used in this work. It must be a physiological property and not a pathological one; 2°) as the internal elastica laminae in the

aortic arch is not easily delimited, we could propose that it is not a static structure but a dynamic one, which can change position in the arterial wall with growth and with age; 3°) the diffuse intimal thickening cannot be seen as an early atherosclerosis lesion but it must be part of the normal development of the arterial wall; 4°) there are different types of cells in the subendothelial region which were characterized as: smooth muscle cell, fibroblast, monocyte and multifunctional mesenchimal cell; 5°) there are no morphological differences between the smaller and the greater curvatures of the aortic arch. Then, the explanation that lipid deposits start early in the smaller curvature is not morphological. It must be related to the functional conditions of the blood stream in this area.

I - INTRODUÇÃO

É a aterosclerose a mais importante, a mais comum e a de patogênese mais controvertida das doenças arteriais. É universal e representa a principal causa de morte em países ou regiões sócio-economicamente mais desenvolvidas (McGill Jr *et alii*, 1968; Tejada *et alii*, 1968; Montenegro e Iabuki, 1969).

A imensa literatura que existe sobre o assunto enfatiza que ainda é pouco conhecida a verdadeira natureza da aterosclerose.

Conceituamos aterosclerose como uma das variantes da arteriosclerose, termo genérico que significa endurecimento da parede da artéria. A definição de aterosclerose, de forma descritiva, já demonstra a sua complexidade: é a doença arterial fundamentalmente degenerativa onde existe uma combinação variável de alterações da íntima (depósitos de lípidos, cálcio, hidratos de carbono e outros produtos do sangue), com fenômenos patológicos reparadores ou progressivos como a fibrose, associados com alterações da média (Luginbühl *et alii*, 1977). É difusa no sistema arterial nas artérias de grande e médio calibre sem, entretanto, comprometê-las em igual intensidade.

Desta forma é imprescindível para o melhor entendimento desta doença complexa, o estudo detalhado das características anatômicas e funcionais das artérias normais, bem como os diferentes estágios do seu desenvolvimento, tentando se buscar um limite entre as alterações que seriam fisiológicas para a parede do vaso, daquelas realmente patológicas.

MORFOLOGIA DAS ARTÉRIAS NORMAIS

A circulação sistêmica começa na valva aórtica e percor

re todos os tecidos do corpo com vasos de luz progressivamente decrescente e de espessura da parede cada vez menor. De uma maneira simplificada e geral, todas as artérias possuem histologicamente a parede constituída por 3 camadas: a íntima, a média e a adventícia. A íntima ou camada interna é fina e margeada na face luminal pelas células endoteliais e limitada da média por um feixe de fibras elásticas conhecido como membrana elástica interna. Logo abaixo do endotélio encontramos a membrana basal, melhor visualizada em microscopia óptica (MO) nas colorações pela prata e para as glicoproteínas (PA-Schiff). Em microscopia eletrônica (ME), na região correspondente à membrana basal existe uma fina e delicada camada descontínua de material pouco denso aos elétrons, denominada de lâmina basal. Muitas vezes os termos membrana basal e lâmina basal são empregados como sinônimos, o que deve ser evitado pois a membrana basal é uma estrutura descrita em MO e não corresponde exatamente à fina lâmina basal, observada em ME. Os constituintes da lâmina basal reconhecidos em estudos imuno-histoquímicos incluem fibras colágenas, dos tipos IV e V, glicoproteínas, laminina e fibronectina, provavelmente produzidas pelas próprias células endoteliais (Simionescu e Simionescu, 1984). Entre o endotélio e a membrana elástica interna destaca-se a região subendotelial onde há fibras colágenas, elásticas, substância fundamental (proteoglicanas) e poucas células (musculares lisas e células indiferenciadas), presentes desde o nascimento (Ross e Glomset, 1976) mas que com a idade vão aumentando em número em todo o perímetro da artéria, de maneira geralmente uniforme, constituindo o espessamento intimal difuso (Geer e Haust, 1972).

A média forma o principal componente estrutural da parede da artéria e contém fibras musculares lisas separadas por elementos do tecido conjuntivo em quantidade variada: fibras elásticas, colágenas e proteoglicanas. O termo artéria elástica é apli-

cado aos vasos nos quais as fibras elásticas formam o componente principal da média, intercalando-se com as fibras musculares lisas. Tal estrutura é observada nas artérias de maior calibre como a aorta, carótidas e ilíacas comuns. Nas artérias musculares, a média consiste principalmente de células musculares lisas e as fibras elásticas são em menor quantidade e concentradas principalmente nas membranas elásticas interna e externa. As artérias musculares são menos calibrosas que as elásticas e também são chamadas de artérias de distribuição.

A adventícia ou camada externa é formada de fibroblastos, fibras colágenas, elásticas, proteoglicanas, nervos e vasa-vasorum. Fica separada da média por uma camada mais nítida de fibras elásticas, ou seja, a membrana elástica externa.

Esta divisão em camadas aparentemente simples não é, na prática, tão facilmente conseguida pois as camadas ou tûnicas não são sempre tão nitidamente delineadas, principalmente nas artérias elásticas (Ham, 1970). Desta forma, para a caracterização da íntima precisamos definir o que é a membrana elástica interna (MEI) e isto não está claramente situado na literatura. Segundo Benninghoff *et alii*, em 1930, nas artérias elásticas como a aorta, o limite entre a íntima e a média é difícil ou pode faltar em certas áreas, devido às dificuldades em se reconhecer a MEI que se confunde ou com as lamelas elásticas da média ou com as da íntima. Por outro lado, Biering e Kobayasi, em 1963, conceituam a MEI como sendo a primeira lamela elástica mais espessa, separando a íntima da média.

Para outros autores (Geer e Haust, 1972 e Stout e Thorpe, 1980) há variações no aspecto da MEI das grandes artérias e com a idade e o espessamento intimal difuso, a MEI pode desaparecer e ser substituída por fibras elásticas mais finas, mais densamente dispostas.

RELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA E FUNÇÃO

A parede da artéria não é um conduto passivo mas é um órgão altamente reativo (Campbell e Chamley-Campbell, 1981). Seus componentes (fibras musculares lisas, fibras elásticas, colágeno e glicosaminoglicanas) juntos formam unidades funcionais integradas e complexas. A proporção dos componentes varia conforme as demandas necessárias de cada vaso específico. Numa artéria elástica como a aorta, uma das principais funções é manter uma pressão hidrostática relativamente alta dentro do sistema arterial, através do ciclo cardíaco. As artérias próximas do coração são distendidas durante a sístole e, pela sua elasticidade, durante a diástole, servem como uma bomba acessória para propulsar o sangue, mantendo um fluxo contínuo, apesar das contrações do coração serem intermitentes (Campbell e Chamley-Campbell, 1981). Isto é conseguido pela presença da elastina nas lamelas elásticas.

Nas artérias musculares, os elementos predominantes na constituição da camada média são as células musculares lisas, que alteram ativamente o diâmetro do vaso para regular o volume de sangue necessário ao funcionamento do órgão ou tecido.

Desta forma, notamos que realmente existe uma relação entre a estrutura e a função dos elementos da parede arterial e, em condições normais, estes elementos estão em um equilíbrio dinâmico.

Qualquer alteração nas demandas funcionais sofridas pela aorta, deverá levar a um remodelamento da estrutura da parede a partir dos seus elementos constituintes. Assim, situações como por exemplo, as de crescimento da artéria ou de hipertensão levam consequentemente a adaptações na estrutura arterial, de causas fisiológicas ou patológicas, respectivamente (Campbell e Chamley-Campbell, 1981).

Durante o crescimento e desenvolvimento, o diâmetro das grandes artérias aumenta muito (cerca de quatro vezes o do nasci-

mento), bem como a espessura de parede arterial (cerca de duas vezes). Esse aumento de espessura da parede é principalmente devido a dois mecanismos: 1º aumento do número e tamanho das unidades funcionais e 2º) formação de uma camada músculo-elástica dentro do espaço sub endotelial (Benninghoff *et alii*, 1930, Campbell e Chamley-Campbell, 1981). Esta camada está presente desde o nascimento, e é constituída de fibras elásticas, poucas fibras musculares lisas (Vellicam, 1974; Yoshida *et alii*, 1980) e substância fundamental; e com a idade o seu desenvolvimento progride de maneira a formar o chamado espessamento intimal difuso fibro-muscular do adulto, que pode atingir até um quinto de espessura total da parede, na aorta abdominal (Campbell e Chamley-Campbell, 1981).

Numa condição patológica como a hipertensão, a parede da aorta é sobrecarregada e surgem respostas adaptativas e esta condição: espessamento acentuado e precoce da íntima (Cabbiani *et alii*, 1979; Haudenschild *et alii*, 1981) e da média (Olivetti *et alii* 1982; Chobanian, 1983). Estudos histológicos e bioquímicos demonstraram que estes espessamentos são devidos a maior quantidade de fibras musculares lisas, fibras elásticas, colágenas e glicosaminoglicanas (Campbell e Chamley-Campbell, 1981).

Portanto, que tanto em condições fisiológicas como patológicas pode haver um espessamento intimal e a avaliação deste espessamento é muitas vezes difícil (Tracy *et alii*, 1979), pois o limite entre o normal e o patológico, não é preciso.

ESPESSAMENTO INTIMAL DIFUSO

O espessamento intimal difuso (Geer e Haust, 1972) também é conhecido por outros nomes na literatura: alterações do desenvolvimento, do crescimento (Woolf, 1978, Restrepo *et alii*, 1979) do envelhecimento ou ainda como parte inicial dos processos de aterosclerose (Wilens, 1951).

Como podemos observar são várias formas de interpretação para o mesmo quadro histológico de espessamento.

Segundo Geer e Haust, (1972), as alterações que se descrevem como do envelhecimento, começam a surgir logo após o nascimento ou na infância e, seriam melhor estudadas como parte do desenvolvimento e maturação da parede arterial. Estes autores afirmam que tem sido demonstrado, em estudos baseados em grande número de artérias, de várias idades, que às vezes, as manifestações mais precoces deste espessamento intimal podem começar focal ou multifocalmente, ao invés de difusamente e, com o tempo, estendem-se por toda ou quase toda a circunferência do vaso. A proporção com que o espessamento intimal difuso progride varia em indivíduos da mesma idade, varia de uma artéria para outra, em diferentes níveis da mesma artéria e em diferentes locais circunferenciais de uma dada artéria. Enquanto este processo, caracterizado pelo desenvolvimento de camadas é basicamente o mesmo em qualquer artéria, sua intensidade e a sua morfologia podem variar conforme a estrutura e a função da artéria em questão, e de seus segmentos.

Assim, as variações do normal podem ser muitas, daí a necessidade do estudo da morfologia normal não só de artérias individuais como também de trechos vários ao longo do seu percurso.

Outros estudos que mostram estas áreas de espessamento intimal como locais de predisposição às lesões de aterosclerose demonstram que em condições normais, a parede da aorta e de outras artérias não apresenta em toda a sua extensão a mesma espessura, ou seja, há áreas de espessamentos focais espontâneos da íntima tanto no homem (Lopes de Faria, 1965a, Jorgensen *et alii*, 1972), como em vários animais estudados (Moss e Benditt, 1970; Lopes de Faria e Faria, 1971, Stemerman e Ross, 1972; Gerrity *et alii*, 1977; Scott *et alii*, 1979). Estes espessamentos da íntima

são espontâneos, focais e atribuídos às áreas que sofrem maior tensão pela corrente sanguínea (Jorgensen *et alii*, 1972; Chobanian, 1983). Estas áreas localizam-se, em diferentes animais, principalmente no arco aórtico e em torno de óstios de ramos (Bell *et alii*, 1972). Tais áreas ainda possuem outras propriedades particulares como a captação focal de corantes vitais como o azul de Evans e azul de Trypan (Bell *et alii*, 1972, Caplan e Schwartz, 1973; Stehbens, 1978), maior permeabilidade à albumina (Bell, Adamson e Schwartz, 1974), ao fibrinogênio (Bell, Gallus e Schwartz, 1974) e colesterol marcados com isótopos radioativos (Bell *et alii*, 1975; Somer e Schartz, 1971 e 1972).

Em microscopia óptica estas áreas de espessamento são constituídas de fibras colágenas, elásticas, células musculares lisas e células indiferenciadas, de natureza discutível, segundo Vellican.

A importância de tais áreas de espessamento ao longo da parede arterial vem do fato de que são locais de maior predileção para as lesões iniciais da aterosclerose.

Em animais com dietas aterogênicas esclerosantes, Schenk *et alii*, (1966) observaram deposição lipídica nestes locais de espessamento intimal espontâneo, em coelhos. Em 1971, Lopes de Faria e Faria demonstraram a importância destas áreas espessadas para a deposição lipídica na aorta de coelhos submetidos a leve hipercolesterolemia de curta duração. Encontraram em estudos de microscopia óptica que tais áreas no coelho correspondiam principalmente às regiões da curvatura menor do arco aórtico ou seja, a parte convexa voltada para a luz, aorta ascendente, aorta torácica descendente e aorta abdominal, em ordem decrescente de frequência para o acúmulo lipídico.

Alguns trabalhos, em microscopia eletrônica, sobre le-

sões arteriais ateroscleróticas em animais surgiram na literatura a partir de 1958 (Buck, 1958; Bierring e Kobayasi, 1963; Parker, 1960, Pease e Paule, 1960, Yamamoto, 1962, Luft, 1963).

Desde então, um grande número de pesquisadores vem se preocupando em estudar em microscopia eletrônica a constituição normal da íntima das artérias de diferentes animais, tentando explicar as áreas de espessamento intimal nos normais e nos submetidos a diferentes condições patológicas como: lesão mecânica do endotélio (Minick *et alii*, 1979), hipertensão (Kojimara *et alii*, 1971; Svendsen, 1981), dietas hiperlipidêmicas (Svendsen, 1978, 1979), hipóxia (Constantinides e Robinson, 1969; Kjeldsen e Thomsen, 1975), etc..

Os aspectos normais do endotélio (Majno e Joris, 1978; Escoubet e Dosne, 1979), das junções endoteliais (Schneeberger e Lynch, 1984), das lesões endoteliais iniciais ou acentuadas (Ts'ao Chung-hsin, 1970, Asano *et alii*, 1979; Svendsen e Tindall, 1981; Garbarsch *et alii*, 1982; Joris *et alii*, 1982), a composição do espaço subendotelial (Robert *et alii*, 1971; Spaet *et alii*, 1974; Somlyo, 1975; Rucker e Tinker, 1977; Urry, 1978; Legrand *et alii*, 1979), foram e continuam sendo intensamente estudados e têm fornecido informações para o entendimento da normalidade e das formas de reação da parede arterial frente aos diferentes estímulos.

Apesar das descrições serem morfológicamente semelhantes, nem sempre as interpretações são concordantes.

Um dos problemas críticos é o da caracterização da natureza das células do espaço subendotelial, suas propriedades, sua relação com os elementos fibrosos (fibras colágenas e elásticas) e a partir de que células precursoras elas se originariam. Em estudos de microscopia óptica, Lopes de Faria (1970) concluiu que as células do espessamento intimal provêm de multiplicação de célu-

las existentes na própria íntima (fibras musculares lisas ou células indiferenciadas). Segundo Hassler, em 1970, em estudos com autorradiografia, as células do espessamento intimal são provenientes da média e do próprio endotélio, como também Kojimara *et alii*, (1971) sugerem em estudos com microscopia eletrônica. Webster *et alii*, (1974) estudando através da timidina tritiada concluíram que as células intimais são de três tipos básicos: fibras musculares lisas típicas, musculares lisas modificadas e células indiferenciadas.

Para a maioria dos autores, em trabalhos de microscopia eletrônica, as células proliferadas na íntima são principalmente fibras musculares lisas que proviriam da camada média a partir de fenestrações da membrana elástica interna (Imai *et alii*, 1970 ; Poole *et alii*, 1971; Stemerman e Ross, 1972; Spaet *et alii*, 1975; Stetz *et alii*, 1979; Haudenschild *et alii*, 1981; Fuzese *et alii*, 1982; Thomas e Kim, 1983). Por outro lado, muitos autores estudam quais os estímulos necessários para haver esta migração e proliferação celular na íntima. Lopes de Faria mostrou em numerosos trabalhos experimentais no coelho, que tanto a íntima da aorta (1955) como a das artérias coronárias (1962), apresentam um espessamento hiperplásico secundário à necrose da média. Tal espessamento foi estudado em suas diversas fases evolutivas. Também no homem em cardiopatias cianóticas (1961), nos espessamentos espontâneos da aorta ascendente (1965a) e nas artérias coronárias (1968), os espessamentos da íntima estavam nitidamente relacionados com as lesões da camada média.

Dentre as teorias mais recentes sobre a aterogênese, a partir da década de 70, a hipótese de resposta à lesão endotelial tem sido grandemente investigada (Bjorkerud, 1972; Ross, 1976, 77, 79; Niewiarowski e Rao, 1983). Segundo ela, a perda da integridade

endotelial é o primeiro estímulo desencadeador de um longo processo que envolve aglutinação plaquetária, liberação de fatores mitogênicos pelas plaquetas e substâncias relacionadas à prostaglandinas, com conseqüente proliferação de células musculares lisas na íntima (Niewiarowski e Rao, 1983). A repetição continuada deste processo de lesão endotelial levaria ao espessamento intimal, precursor das lesões ateroscleróticas.

Trabalhos de Svendsen, em 1979 e 1981, em coelhos submetidos à hipercolesterolemia aguda por 2 dias ou à hipertensão respectivamente, demonstraram sinais de lesão focal do endotélio, principalmente nas regiões da pequena curvatura do arco aórtico e porção distal das artérias intercostais. Explicam tais localizações das lesões como conseqüentes às forças mecânicas da corrente sanguínea específicas de regiões de curvaturas, associadas aos estímulos patogênicos.

Em 1981, Kjeldsen e Thomsen estudaram a ultra-estrutura da íntima da aorta de coelhos normais, em focos de captação do corante azul de Evans. Tais focos estavam localizados principalmente no arco aórtico e óstios de ramos da aorta torácica. Não estudaram separadamente a curvatura maior e a menor do arco aórtico. As áreas selecionadas para o exame foram as coradas de azul, comparando-se com as não coradas. Encontraram diferenças morfológicas entre as áreas coradas e não coradas. Segundo a sua interpretação, tais diferenças decorreriam de processos regenerativos ocorridos nas áreas submetidas a maior lesão pelo fluxo hemodinâmico normal.

OBJETIVOS DO PRESENTE TRABALHO

Partindo-se de todos estes dados da literatura e toman

do-se como base o trabalho de Lopes de Faria e Faria de 1971, que encontra os primeiros depósitos lipídicos em áreas de espessamento intimal, localizados na região da pequena curvatura do arco aórtico, pretendemos:

1) descrever em coelhos adultos normais os aspectos morfológicos em microscopia óptica e eletrônica da íntima, desta área que no trabalho citado, foi a primeira a sofrer o depósito lipídico (curvatura menor do arco aórtico).

2) comparar os dados morfológicos da íntima da curvatura menor com os da curvatura maior do arco aórtico, que servirá como área controle.

3) avaliar o comportamento da coloração vital da íntima do arco aórtico pelo azul de Evans com especial atenção à área em que se inicia o depósito lipídico, em coelhos normais.

4) conceituar a membrana elástica interna no arco aórtico, elemento fundamental para a definição do espessamento intimal.

5) estudar a composição do espessamento intimal em ambas as áreas, para saber se na íntima normal já há diferença morfológica entre a área predisposta e a não predisposta ao depósito lipídico, de grande importância na aterogênese.

II - MATERIAL E MÉTODO

Estudamos 10 coelhos albinos da raça Nova Zelândia, de ótima procedência (granja Selecta, em Itu), machos, adultos, com 5 a 6 meses de idade, pesando de 3 a 4 kg. Foram alimentados com ração comercial para coelho, adicionada de folhas verdes, e água à vontade.

Os animais foram divididos em 2 grupos: **grupo A**, com 7 animais, que receberam injeção intra-venosa do corante azul de Evans e **grupo B**, com 3 animais que não receberam o corante. O motivo desta divisão em 2 grupos foi para verificar se havia alterações morfológicas provocadas pelo corante.

O azul de Evans (art. 3169 - Merck) foi injetado na veia da orelha, numa solução a 0,5% em soro fisiológico, numa dose de 3 ml/kg de peso, cerca de 3 a 6 h antes do processo de fixação por perfusão (Kjeldsen e Thomsen, 1981).

Passado este tempo, os animais foram anestesiados e em seguida, submetidos à fixação pelo método da perfusão.

Testamos várias drogas anestésicas (barbitúricos, uretana) e conseguimos os melhores resultados através da combinação de Neozine (levopromazina), na dose de 1 mg/kg de peso, e Rohypnol (flunitrazepam) na dose de 0,01 mg/kg de peso, ambos pela via intra-muscular, como pré-anestésicos. Depois de 15 a 20 minutos os animais receberam Ketalar (cloridrato de Ketamina), na dose de 10 mg/kg de peso, também intra-muscular.

Depois de anestesiados, os animais foram imobilizados numa goteira (Figura 1) para abrir a cavidade torácica e expor a área cardíaca. Em seguida, abertura do saco pericárdico e colocação da cânula de perfusão, com cerca de 3 mm de diâmetro, na pon-

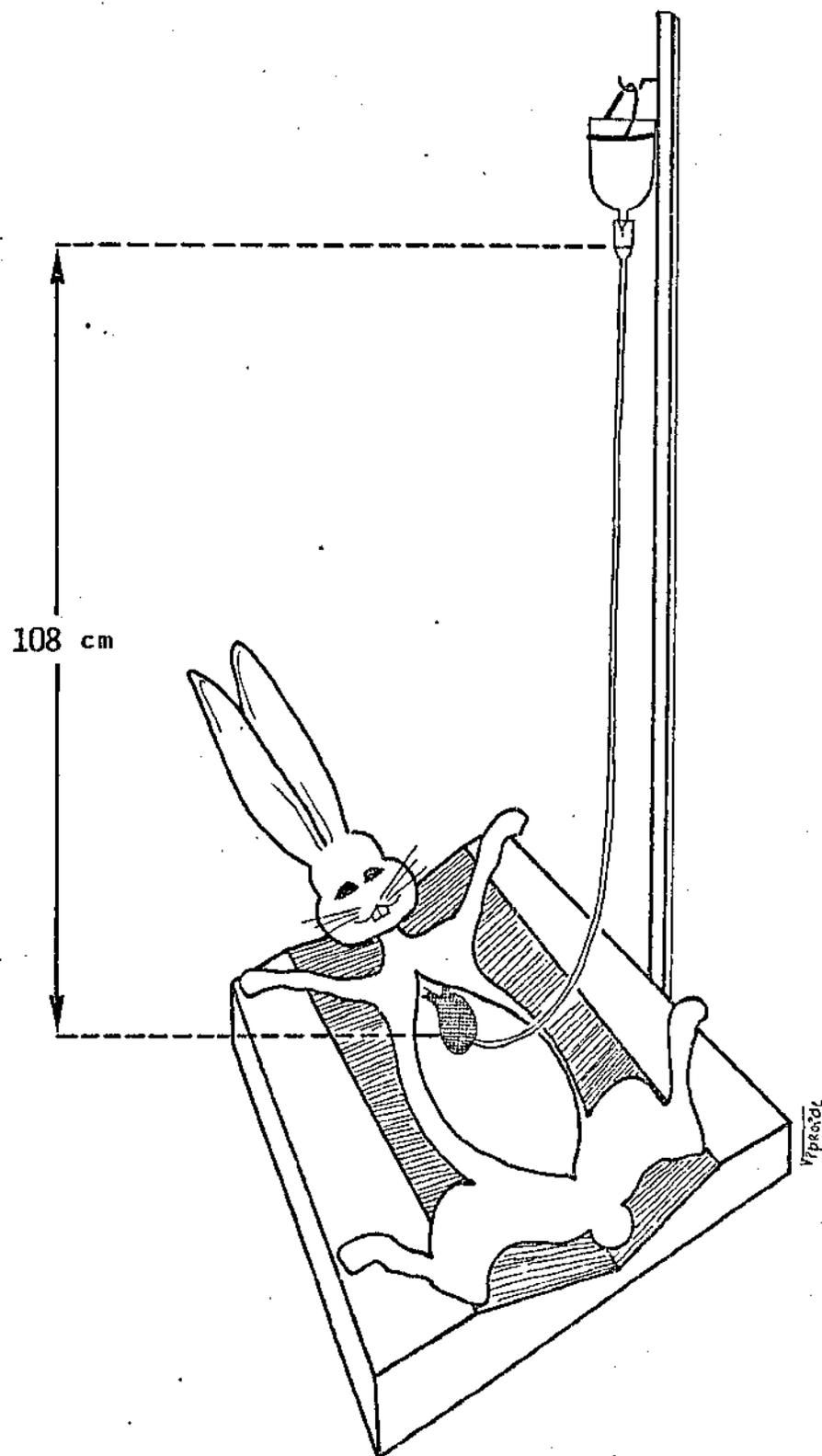


Fig. 1 - Esquema do processo de fixação por perfusão à pressão de 80mm de Hg, que corresponde a uma coluna líquida do fixador com 108cm de altura.

ta do ventrículo esquerdo, perfurado com uma tesoura. Clampeamos a aorta torácica na altura do diafragma e abrimos o átrio direito para escoar o líquido de perfusão, após ter circulado no sistema arterial e voltado ao coração.

O fixador perfundido (Haudenschild *et alii*, 1972), foi a solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) modificada, numa pressão de 80 mm de mercúrio, por cerca de 10 a 15 minutos. Tal pressão de perfusão foi conseguida através de uma coluna líquida do fixador com 1,08 m de altura (Fig. 1). O volume de fixador gasto para cada animal foi de aproximadamente 600 ml. Com o passar do tempo, o líquido que escoava pela abertura do átrio, de início sanguinolento, se tornava incolor.

Terminada a perfusão, o coração com a aorta foram retirados juntos cuidadosamente, e imersos no fixador.

Em seguida, abrimos com uma pequena tesoura a aorta em toda extensão pela parede anterior para examinar a íntima e retirar os fragmentos. Nos animais que receberam o corante azul de Evans, descrevemos e esquematizamos os achados macroscópicos (Figura 2).

Os fragmentos processados tanto para a microscopia óptica quanto para a eletrônica foram retirados através de corte transversal à luz do vaso, de 4 diferentes regiões: a) aorta ascendente, b) curvatura menor do arco aórtico, c) curvatura maior do arco aórtico, d) início da aorta torácica descendente. Sempre tomamos o cuidado de retirar os fragmentos fora e longe dos orifícios de ramos. O número de fragmentos retirados de cada área para a microscopia variava, sendo cerca de 2 para a óptica e 5 para a eletrônica.

Nossa área de estudo para exame pormenorizado no microscópio eletrônico foi a curvatura menor do arco aórtico pois foi

aí que ocorreu o depósito lipídico mais precocemente (Lopes de Faria e Faria, 1971). Como área-controle foi usada a curvatura maior do arco aórtico que, no mesmo trabalho já citado não apresentou o depósito lipídico precoce. Os outros fragmentos foram incluídos e não cortados.

Os fragmentos para microscopia óptica foram colocados, logo após retirada, em formalina para o processamento comum em cortes por inclusão em parafina. Foram corados pela hematoxilina-eosina, azul de toluidina e pelo Weigert-van-Gieson. A nível óptico estudamos a íntima, distinguindo-a da média através do reconhecimento da membrana elástica interna (MEI). Usamos o conceito de Biering e Kobayasi (1963), que reconhecem como MEI a primeira lamela elástica mais espessa que surge na parede do vaso a partir do endotélio.

O processamento para a microscopia eletrônica foi feito do seguinte modo (ver os pormenores técnicos no apêndice):

A) **Fixação:** 1º) em Karnovsky por 2 h; 2º) em tetróxido de ósmio a 1% por 2 horas; 3º) em acetato de uranila a 0,5% por período de uma noite.

B) **Desidratação:** em acetona, à temperatura ambiente.

C) **Inclusão:** em Araldite, na composição citada no apêndice.

D) **Cortes semi-finos:** obtidos com navalha de vidro no ultra-micrótomo Sorvall, modelo MT-2B, tendo os cortes aproximadamente 0,5 μ m de espessura (o que corresponde à coloração esverdeada). Foram corados pelo azul de metileno e fucsina básica (Huber *et alii*, 1968; Humphrey e Pittman, 1974) ou apenas pelo azul de metileno - azur II. Estes cortes foram examinados ao microscópio

óptico, onde descrevemos os aspectos encontrados e selecionamos os melhores blocos para os cortes ultra-finos. Conseguindo-se distinguir a MEI em nível óptico, poderemos avaliar as áreas de espessamento intimal e estes dados obtidos serão transportados para o estudo posterior das fotos de microscopia eletrônica dos respectivos blocos examinados nos cortes semi-finos.

E) **Cortes ultra-finos:** com o ultra-micrótomo Sorvall MT-5000 e navalha de diamante. Os cortes de tonalidade prateada ou cinza, correspondendo a 50 ou 60 nm de espessura, foram colocados em telinhas de 200 malhas ("mesh") e corados pelo citrato de chumbo por 3 a 5 minutos. Estes cortes foram examinados no microscópio eletrônico Zeiss, modelo EM-10.

No microscópio eletrônico, os campos para as fotografias foram selecionados e estas agrupadas do seguinte modo:

1) fotos panorâmicas, em aumentos de até 5000 vezes, onde estudamos as soluções de continuidade do endotélio, a delimitação entre a íntima e a média através da caracterização da membrana elástica interna, o espaço subendotelial, sua espessura e composição.

2) fotos de células endoteliais para avaliação de lesões celulares, pormenores de organelas, e do estado da membrana basal;

3) fotos de junções de células endoteliais, caracterizando os tipos juncionais predominantes e suas alterações;

4) fotos de células subendoteliais, para o reconhecimento de sua natureza e aspectos morfológicos diversos.

Cada animal foi examinado separadamente nas duas áreas

estabelecidas e identificadas como curvatura menor do arco aórtico (arco menor) e curvatura maior do arco aórtico (arco maior).

O exame pormenorizado das fotos obedeceu um esquema sistemático, através de uma ficha para cada foto (ver apêndice), para posterior comparação dos dados.

Depois do exame de todas as fotos de cada curvatura, foi feito um resumo dos achados, que foi colocado numa tabela que continha todos os dados daquele animal (idade, peso, procedimentos anestésicos, cirúrgicos, intercorrências, dados macroscópicos, de microscopia óptica e eletrônica). Desta forma, tínhamos o conjunto de todos os achados de cada animal. Comparamos os dados obtidos qualitativos, nas duas áreas referidas do mesmo animal. Finalmente, comparamos os 10 animais entre si e anotamos as diferenças ou semelhanças existentes.

III - RESULTADOS

DADOS GERAIS

A reação dos animais frente aos procedimentos anestésicos foi variável mas, os coelhos de números 1 e 3 foram os que mais reagiram, mostrando sinais de sofrimento durante este período (frequência respiratória alterado, cianose, movimentos bruscos, etc.).

1. MACROSCOPIA DA AORTA

Em nenhum dos animais foi observada lesão macroscópica. Os 7 animais do grupo A, que foram injetados intra-venosamente com o azul de Evans apresentaram (Fig. 2):

- **coelho nº 4:** Valva aórtica corada intensamente de azul enquanto que a íntima da aorta ascendente se corou leve e difusamente, sem limites nítidos. A íntima do arco aórtico não se corou. Na aorta abdominal, a íntima ao nível do óstio da artéria mesentérica e ao nível da bifurcação da aorta nas ilíacas estava focalmente azulada.

- **coelho nº 5:** valva aórtica fortemente azulada: toda a íntima da aorta mostrava uma cor azul pálida difusa. A porção ascendente e o início da curvatura menor do arco aórtico estavam mais azulados, porém com limites pouco nítidos. Os orifícios de ramos, a aorta torácica e a abdominal não se mostraram corados.

- **coelho nº 6:** cor azulada difusa da valva aórtica e da íntima da aorta ascendente, com uma área linear contornando a curvatura menor mais azulada. A íntima em torno dos orifícios de ramos estava mais clara que fora dos mesmos, exceto em torno do orifício de um ramo da aorta abdominal, nitidamente corado de azul.

- coelho n° 7: tonalidade azul nítida da valva aórtica, menos intensa e difusa da íntima de toda a aorta, com uma área, à maneira de traço fino, fortemente azul, oblíqua, que atingia toda a aorta ascendente, até o início do arco menor, e em situação mais posterior (Fig. 3). Havia uma pequena área arredondada, como uma placa, com 2mm de diâmetro, não corada na aorta ascendente. A íntima em torno dos ôstios da carótida esquerda e da primeira artéria intercostal esquerda também estava mais corada. No início da aorta torácica descendente havia pequenas áreas puntiformes azuis, na íntima.

- coelho n° 8: tonalidade azul difusa e intensa da valva aórtica e leve focal da íntima da aorta ascendente, de forma arredondada, com 1mm de diâmetro. A íntima do arco aórtico não estava corada. Havia leve coloração azul em torno do ôstio da artéria subclávia esquerda.

- coelho n° 9: leve tonalidade azul da valva aórtica. A íntima não se corou em toda a aorta.

- coelho n° 10: coloração azul difusa da valva aórtica e da íntima de segmentos da artéria pulmonar. A íntima do arco aórtico não estava corada, bem como as outras porções da aorta.

Resumindo, nos 7 animais injetados com azul de Evans, a valva aórtica sempre se apresentou forte e difusamente corada de azul. A íntima da aorta ascendente estava mais frequentemente corada de modo difuso do que a de outros segmentos da aorta (em 5 dos 7 animais), vindo em segundo lugar a íntima da curvatura menor do arco aórtico, que mostrou coloração azulada em 3 dos 7 animais, porém pouco intensa e pouco nítida. Apenas em um animal (n° 7) havia uma área linear na íntima do arco menor nitidamente corada de azul (Fig. 3). A íntima em torno dos orifícios de ramos foi raramente corada e em um dos animais, estava até menos corada que o resto da íntima da aorta. Em apenas um coelho observaram-se pe-

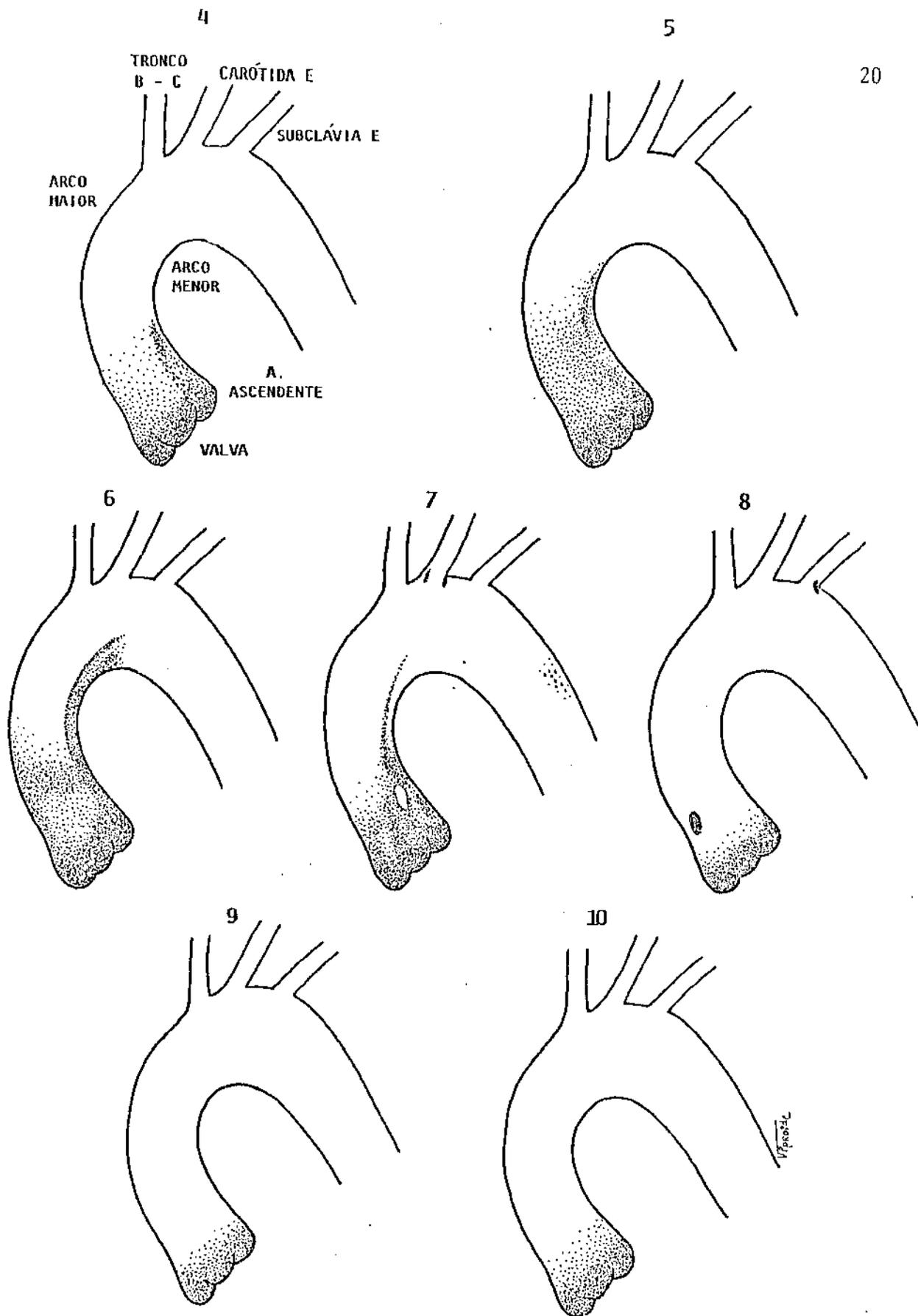


Fig. 2 - Esquemas das áreas de coloração azulada da íntima da aorta obtidas nos animais injetados com o azul de Evans.



Fig. 3 - Coelho nº 7: aspecto macroscópico da íntima da aorta corada pelo azul de Evans. Notar a tonalidade mais escura (azulada) da aorta ascendente, fino traço escuro (azulado) contornando a curvatura menor (seta) e pontilhado escuro (azulado) no início da aorta torácica descendente.

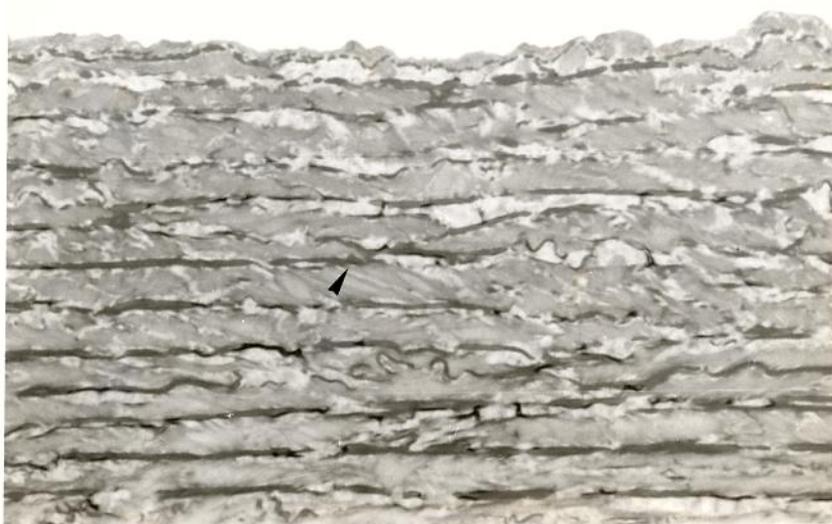


Fig. 4 - Coelho nº 1, curvatura menor: A MEI não se destaca e foi considerada neste trecho como a 7.^a lamela elástica, pois esta é a primeira camada mais espessa a partir do endotélio. É segmentada e se ramifica (seta). (corte semi-fino, azul de metileno - azur II, 528X).

quenos pontos azulados na íntima da porção inicial da aorta torácica descendente.

2. MICROSCOPIA ÓPTICA

Os dados de microscopia óptica seguem-se para cada animal, separadamente nas duas áreas estudadas:

Coelho nº 1: Curvatura menor: Endotélio achatado ou ausente em certos trechos. O espaço subendotelial é de espessura variada. A membrana elástica interna (MEI) não é distinta das lamelas da média. Foi considerada, em alguns trechos (Fig. 4), como MEI a 7.^a lamela elástica a partir da camada endotelial em direção à média, por ser ela a primeira lamela mais grossa que precedeu as lamelas elásticas da média. Nestes trechos, o espaço subendotelial é de máxima espessura e contém lâminas elásticas, em número de 6, e células musculares lisas de permeio. Em outros trechos, o espaço subendotelial é mais estreito e contém uma ou mais lamelas elásticas e as respectivas células musculares de permeio.

Curvatura maior: endotélio preservado e moderadamente proeminente em certas áreas. O espaço subendotelial é de espessura variada, mostra áreas focais de alargamento, com lamelas mais finas de elástico, fibras musculares lisas e com moderado afastamento entre estas estruturas, referido como aspecto edematoso. A MEI foi considerada como a 5.^a camada de elástico, um pouco mais espessa que as lamelas anteriores a ela. É descontínua e em alguns trechos se torna indistinta das outras lamelas da média (Fig. 5).

Conclusão: a espessura máxima da íntima é um pouco maior

focalmente, na curvatura menor do arco aórtico.

Coelho nº 2: Curvatura menor: endotélio preservado, com algumas células tumefeitas e salientes na luz. O espaço subendotelial é de espessura variada com até 5 lamelas de fibras elásticas, com as fibras musculares lisas de permeio. Logo abaixo do endotélio há focalmente, leve aspecto edematoso. A MEI não é distinta das lamelas elásticas da média e foi considerada, em alguns trechos, como a 6.^a camada de elástico, descontínua e que se duplica focalmente.

Curvatura maior: endotélio preservado ou destacado focalmente. A MEI é em alguns trechos a 1.^a lamela elástica logo abaixo do endotélio (Fig. 6) mas, aos poucos vai-se tornando a 4.^a camada, pelo espessamento da íntima (Fig. 7). A MEI mostra descontinuidade e duplicação, à maneira de bifurcação (Fig. 6). O espaço subendotelial tem espessura variada e irregular, apresentando 1 a 3 camadas de fibras musculares lisas envoltas por fibras elásticas segmentadas.

Conclusão: áreas de espessamento intimal um pouco maior na curvatura menor do arco aórtico.

Coelho nº 3: Curvatura menor: endotélio tumefeito, com células salientes na luz e vacúolos sob as células endoteliais. No tam-se trechos sem endotélio. A MEI é difícil de ser reconhecida. Consideramos como MEI a 1.^a camada de fibras elásticas logo abaixo do endotélio, muito segmentada e com várias ramificações. O espaço subendotelial tem caráter edematoso, espaços arredondados lembrando bolhas, porções de fibras elásticas, células musculares lisas típicas e algumas menores, não caracterizadas.

Curvatura maior: endotélio tumefeito, com células sa-

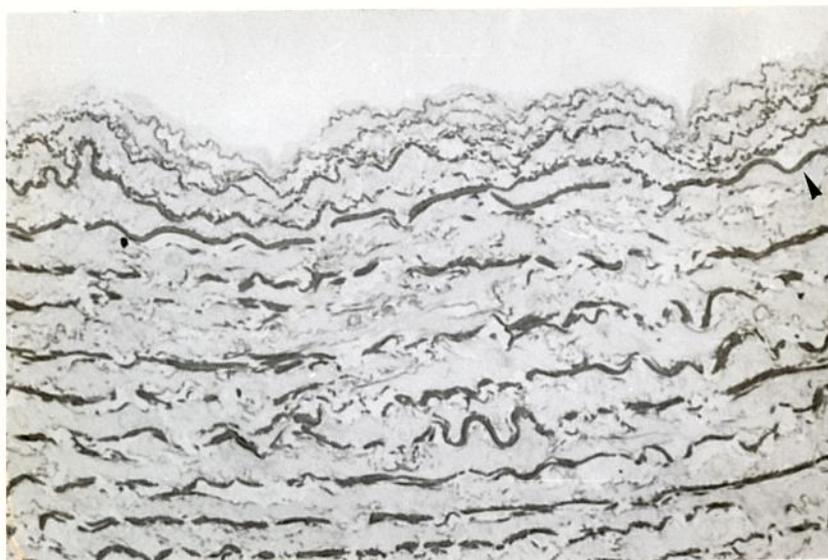


Fig. 5 - O espaço subendotelial é de espessura variada e contém lamelas mais finas de elástico e fibras musculares lisas entre elas. A MEI foi considerada como a 5.^a lamela elástica (seta); é descontínua e ramificada (corte semi-fino, azul de metileno-fucsina básica, 528X).

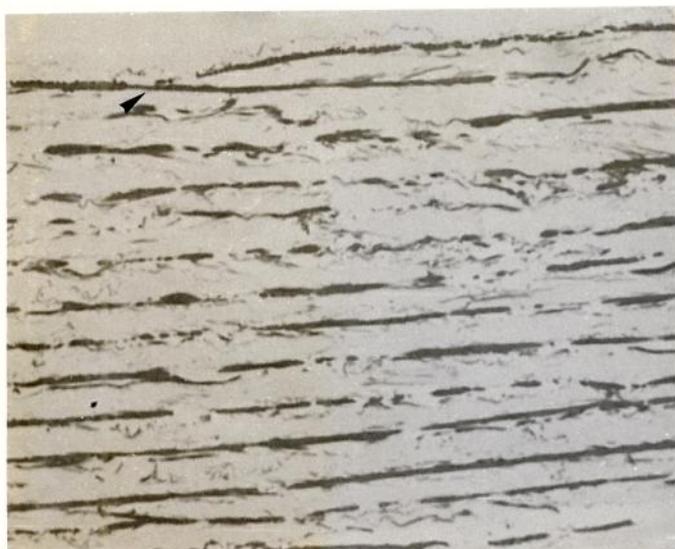


Fig. 6 - Coelho nº 2 - curvatura maior A MEI é em alguns trechos a primeira lamela elástica abaixo do endotélio (seta) que se ramifica (corte semi-fino, azul de metileno-fucsina, 528X).

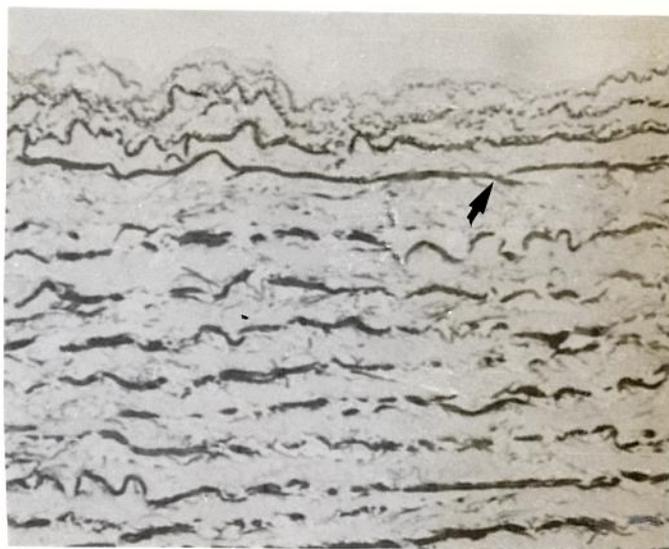


Fig. 7 - Coelho nº 2 - curvatura maior: em outro trecho da mesma região nota-se espessamento intimal, com fibras elásticas mais finas e a MEI torna-se a 4.^a lamela elástica (seta), mostrando ramificações (corte semi-fino, azul de metileno-fucsina básica, 528X).

lientes na luz. A MEI é difícil de ser individualizada. Abaixo do endotélio há cerca de 3 a 4 lâminas de elástico, de espessura semelhante, que constituem uma zona fibrilar e não uma única MEI (Fig. 8). Em outros trechos distinguimos uma camada mais espessa que é a 3^a lamela elástica e em outros é a 7^a lamela. O espaço subendotelial mostra aspecto edematoso menos acentuado, segmentos de fibras elásticas e tem espessura variada.

Conclusão: o espessamento intimal é maior na curvatura maior do arco aórtico. O aspecto edematoso do espaço subendotelial é maior na região da curvatura menor.

Coelho n° 4: Curvatura menor: células endoteliais achatadas ou levemente proeminentes na luz. É difícil de se distinguir a MEI das lamelas da média. Focalmente ela se apresenta como a 3^a lâmina ou como a 7^a lâmina elástica, porém de aspecto fragmentado ou com várias duplicações. Poderíamos considerar, ao invés de uma única MEI, uma zona de 3 a 7 lamelas elásticas lembrando o espessamento hiperplásico. O espaço subendotelial é de espessura irregular e variada, com cerca de 3 a 7 lamelas ou segmentos de elástico, intercaladas com as fibras musculares lisas.

Curvatura maior: endotélio achatado ou levemente saliente. A MEI é nítida focalmente (Fig. 9) e corresponde a 4^a lamela ou a 10^a lamela elástica. Desta forma, o espaço subendotelial é de espessura variada difusamente, com 3 a 9 lâminas de elástico e fibras musculares lisas intercaladas.

Conclusão: o espessamento intimal é maior na curvatura maior do arco aórtico.

Coelho n° 5: Curvatura menor: endotélio achatado e íntegro. A MEI é nítida e é a primeira lamela elástica. O espaço sub-

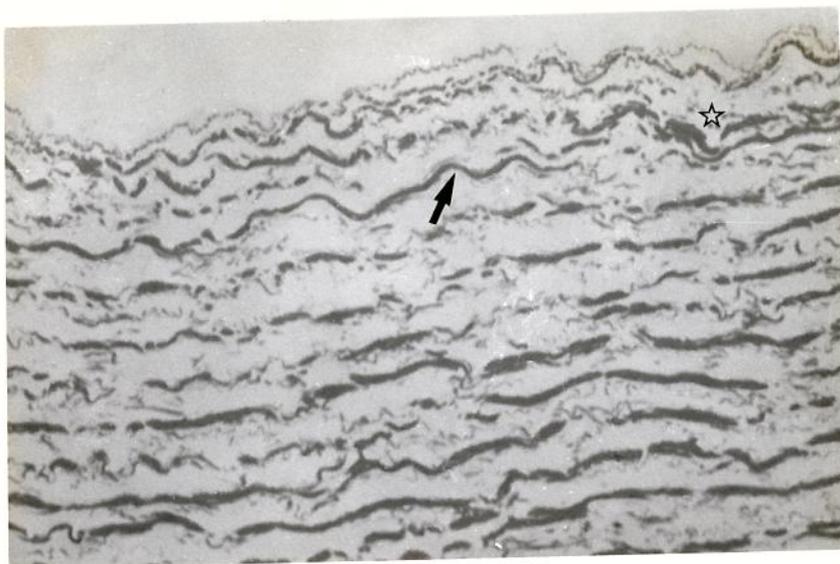


Fig. 8 - Coelho nº 3: curvatura maior: abaixo do endotélio há cerca de 4 lâminas de elástico que formam uma zona fibrilar. As lamelas elásticas mais espessas se ramificam como se "desfiassem"☆. Em outro trecho, reconhecemos uma lamela mais contínua e mais espessa (seta) que foi considerada como MEI. (Corte semi-fino, azul de metileno-fucsina básica, 528X).

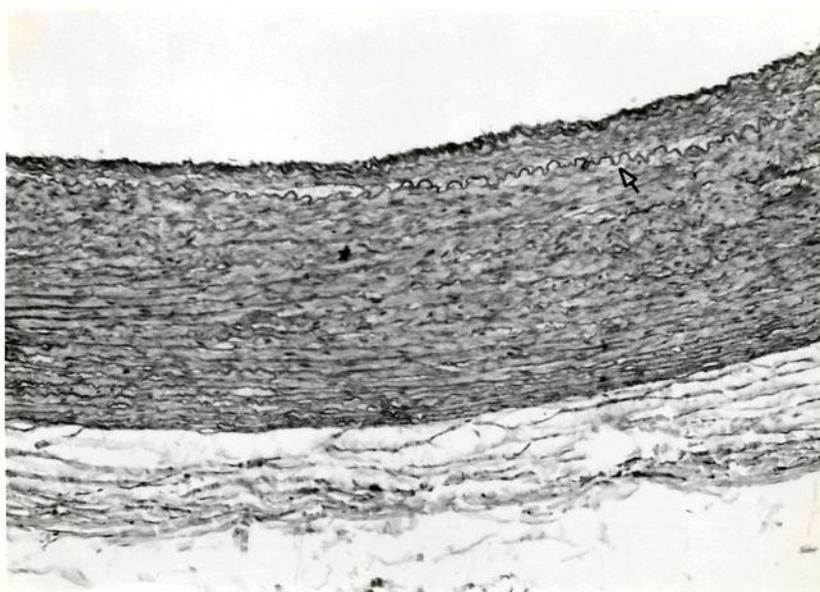


Fig. 9 - Coelho nº 4: a MEI é nítida neste trecho (seta) e delimita a íntima de espessura variada, correspondendo ao espessamento intimal difuso. (corte em parafina, Weigert-van-Gieson 132X).

endotelial é muito estreito; algumas vezes, porém, é um pouco mais amplo focalmente, onde há segmentos de elástico (Fig. 10).

Curvatura maior: endotélio achatado, sem alterações. A MEI é nítida, sendo em alguns trechos a 1.^a lamela e em outros, a 4.^a. O espaço subendotelial varia de espessura, ora é pequena e difusa, ora é maior e focal (Fig. 11).

Conclusão: o espessamento intimal é maior na curvatura maior do arco aórtico.

Coelho nº 6: Curvatura menor: endotélio achatado ou levemente tumefeito, sem alterações. A MEI é pouco nítida e foi considerada como a 1.^a ou 3.^a lamela de elástico. É descontínua, apresenta áreas de aspecto bifurcado e outras em que desaparece totalmente. O espaço subendotelial é de espessura irregular, pequena e difusa, com áreas de maior espessura contendo 1 a 3 lâminas de elástico, sob a forma de grânulos ou de lamelas finas.

Curvatura maior: endotélio leve a moderadamente proeminente na luz. A MEI não se destaca das lamelas da média e foi considerada como a 1.^a ou 3.^a lamela elástica. É descontínua e com numerosas ramificações. O espaço subendotelial é irregular e estreito difusamente; contém grânulos ou lamelas finas de elástico e fibras musculares lisas.

Conclusão: o espessamento difuso da íntima é irregular e semelhante nos dois segmentos.

Coelho nº 7: Curvatura menor: o endotélio está íntegro, achatado ou levemente tumefeito. Nos cortes semi-finos não conseguimos distinguir a MEI, mas na coloração pelo Weigert-van-Gieson, notamos que ela não se destaca das lamelas da média e, focalmente

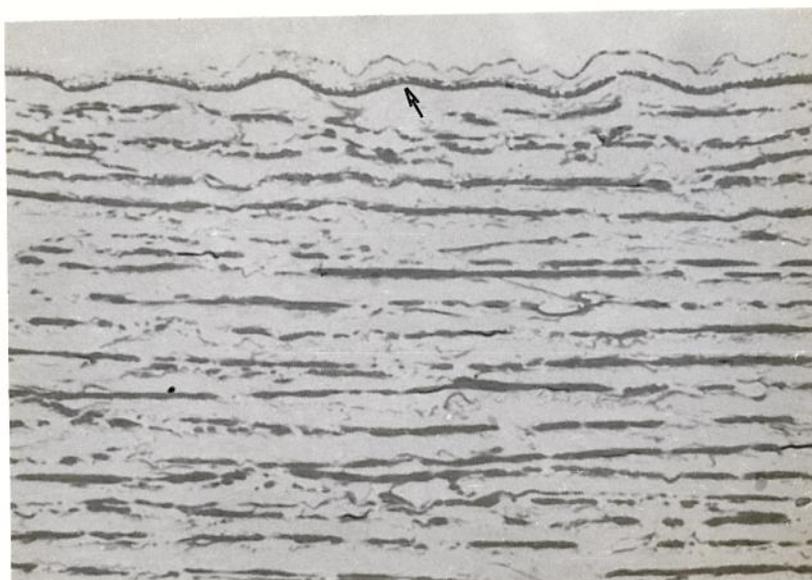


Fig. 10 - Coelho nº 5: curvatura menor: a MEI é nítida em toda a região (seta). O ESE é estreito e mostra focalmente áreas levemente mais espessas, onde há segmentos mais finos de elástico (corte semi-fino, azul de metileno-fucsina básica, 528X).



Fig. 11 - Coelho nº 5: curvatura maior: A MEI é nítida (seta) e delimitada área de espessamento intimal maior do que o observado na curvatura menor. (corte semi-fino, azul de metileno-fucsina básica, 528X).

pode ser considerada como a 1.^a ou 3.^a lamela. O espaço subendotelial mostra leve aspecto edematoso e até 2 lamelas elásticas intercaladas com as células musculares lisas.

Curvatura maior: o endotélio não apresenta particularidades e a MEI é a 3.^a lamela em certas áreas; é descontínua e de limites imprecisos.

Conclusão: o espessamento intimal difuso é irregular e semelhante nos 2 segmentos estudados.

Coelho n^o 8: Curvatura menor: endotélio achatado ou levemente tumefeito, sem outras particularidades. A MEI não se destaca entre as outras lamelas elásticas e foi considerada, em certas áreas, como a 1.^a ou 2.^a lâmina elástica. É descontínua e se bifurca frequentemente. O espaço subendotelial é de pouca espessura difusamente; contém 1 ou 2 fileiras de fibras elásticas segmentadas.

Curvatura maior: endotélio é leve ou moderadamente proeminente na luz. A MEI é pouco nítida e na coloração pelo Weigert-van-Gieson destaca-se um pouco melhor, como a 1.^a ou 3.^a lamela elástica. É descontínua e também se bifurca. O espaço subendotelial mostra 1 ou 2 camadas de fibras musculares lisas, em corte transversal, segmentos de fibras elásticas e aspecto pouco edematoso (Fig. 12).

Conclusão: espessamento intimal semelhante nas duas áreas examinadas.

Coelho n^o 9: Curvatura menor: endotélio é levemente tumefeito, estando ausente em certos cortes. A MEI é praticamente indistinta e, em alguns trechos a consideramos como a 1.^a lamela

elástica, que se bifurca e forma prolongamentos granulares para a íntima. O espaço subendotelial é estreito e mostra focalmente 2 ou 3 camadas de fragmentos de fibras elásticas e algumas fibras musculares lisas em corte transversal. Nota-se ainda, discreto aspecto edematoso.

Curvatura maior: o endotélio está achatado em certas áreas e tumefeito em outras. A MEI foi considerada como a 1.^a ou 2.^a lamela elástica, pouco distinta das outras lamelas, descontínua e com várias ramificações. No espaço subendotelial notamos áreas com aspecto de edema moderado e outras áreas sem edema. Notam-se fibras musculares lisas e elástico granuloso.

Conclusão: tanto a MEI como o espessamento intimal têm aspecto semelhante nos 2 segmentos examinados.

Coelho nº 10: Curvatura menor: endotélio achatado, sem alterações. A MEI é nítida e corresponde em certas áreas à 2.^a, 6.^a ou 10.^a lamela. Ela se bifurca, é descontínua e por vezes de aspecto granuloso. Em alguns trechos se torna indistinta. O espaço subendotelial é de espessura variada, com áreas irregulares mais espessas. Contém fibras musculares lisas, segmentos de fibras elásticas e lamelas finas.

Curvatura maior: endotélio achatado ou levemente tumefeito. A MEI é nítida e surge como a 2.^a, 3.^a ou 4.^a lamela, por se ramificar em vários pontos. Ela parece se "desfiar" em direção à íntima. O espaço subendotelial é estreito e mostra áreas mais amplas, irregulares com até 3 lamelas de fibras elásticas finas ou grumosas, e fibras musculares lisas (Fig. 13).

Conclusão: o espessamento intimal é focalmente maior na área da curvatura menor do arco aórtico.

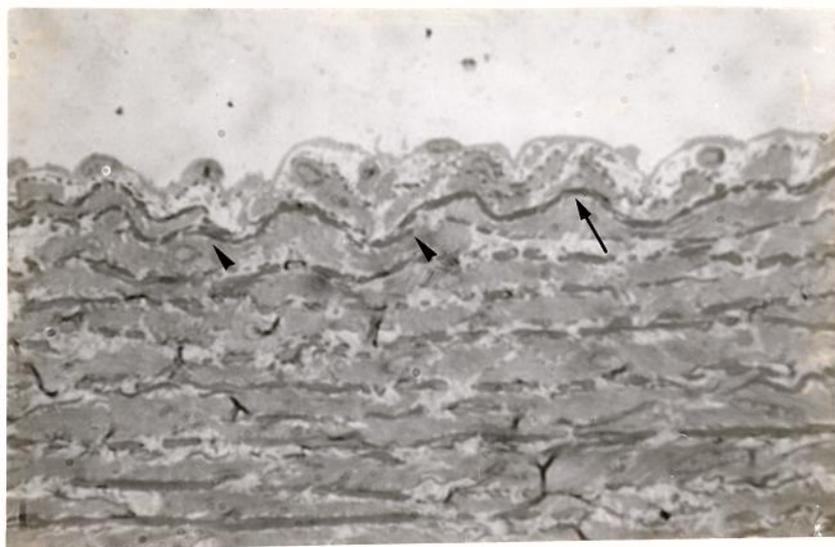


Fig. 12 - Coelho n° 8: Curvatura maior: A MEI foi considerada como a primeira lamela mais espessa (seta). É segmentada e se bifurca frequentemente (setas), dificultando a sua delimitação em outros trechos. O ESE mostra fibras musculares lisas, algumas em corte transversal, segmentos de elástico e aspecto edematoso (corte semi-fino, azul de metileno - azur II, 528X).

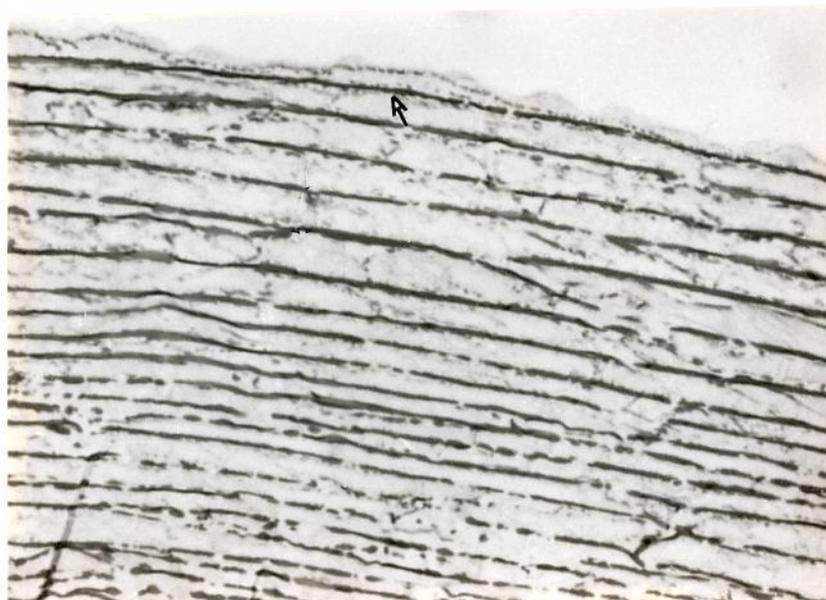


Fig. 13 - Coelho n° 10: A MEI é nítida. O ESE é estreito neste trecho e contém fibras elásticas finas e grumosas (corte semi-fino, azul de metileno - fucsina básica, 528X).

A coloração pelo Azul de Toluidina demonstrou em todos os animais, substância metacromática preenchendo os espaços entre os elementos celulares e fibrosos, tanto na íntima como na média. Aquelas áreas focais de maior afastamento entre os componentes da íntima, referidas como aspecto edematoso, também apresentaram metacromasia. Esta coloração revela os constituintes da chamada substância fundamental do tecido conjuntivo (proteoglicanas ácidas).

3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA

De uma maneira geral, os resultados em nível ultra-estrutural não diferiram ou só mostraram pequenas variações entre uma e outra área (curvatura menor e maior do arco aórtico) de um mesmo animal. As variações existentes entre os animais também foram leves e, desta forma, descreveremos conjuntamente os aspectos morfológicos encontrados nas duas curvaturas.

3.1. Endotélio: a célula endotelial reveste a superfície interna da aorta, formando uma única camada. É poligonal, geralmente achatada mas, também apresentou-se leve ou moderadamente proeminente na luz. O citoplasma é centralmente mais espesso e gradualmente se afina em direção à periferia da célula, voltada para as junções inter-celulares. Podemos dividir a célula endotelial esquematicamente em 4 regiões: a) zona periférica, b) região nuclear, c) região das organelas e d) zona para-juncional (Fig. 14). Em algumas fotos de diferentes animais, encontramos na superfície luminal áreas de arrancamentos focais do citoplasma (Fig. 15, 25), membranas celulares na luz, às vezes formando imagens de figuras mielínicas (Fig. 16). Frequentemente, ainda na superfície luminal, ha-

via pequenas projeções citoplasmáticas digitiformes para a luz (Fig. 15, 30). Toda a superfície celular (vade basal ou luminal) mostrou invaginações múltiplas da membrana citoplasmática, notando-se grande número de cavéolas ou vesículas difusamente distribuídas. São as chamadas vesículas de pinocitose, citoplasmáticas, ou de transporte, presentes também em toda a espessura da célula (Fig. 14).

O núcleo é alongado e de localização central, com o maior eixo paralelo ao da célula. Mostrou frequentemente contorno irregular, mais ou menos denteado, conforme o grau de contração celular.

Todo o citoplasma endotelial mostra um fino pontilhado de fundo que, em aumento maior são ribossomos livres em grande quantidade e grânulos de glicogênio.

As mitocôndrias foram encontradas com facilidade, esparsas no citoplasma. Em raros animais (coelhos n^os 1 e 3), havia sinais de lesão celular, indicados pela presença de mitocôndrias volumosas e edemaciadas (Fig. 17). Na grande maioria dos casos, em ambas as áreas estudadas, as mitocôndrias apresentaram-se com a forma de bastonete ou arredondada, moderadamente elétron-densas e com as cristas internas características (Fig. 14).

Tanto o retículo endoplasmático liso (REL) quanto o rugoso (RER) estão presentes na célula endotelial, porém o retículo rugoso é mais abundante. Em algumas fotos, encontramos dilatação do RER (Fig. 18), de grau leve, moderado ou intenso, formando grandes vacúolos, mais raramente. Esta alteração foi encontrada com certa facilidade mas ocorreu tanto na curvatura menor quanto na curvatura maior do arco aórtico.

Outra organela observada, porém menos frequentemente, foi o aparelho de Golgi, com a localização preferencial na região

peri-nuclear (Fig. 14).

Os lisossomos apresentaram dimensões e forma variada sendo que as imagens de fagossomos ou de corpos multivesiculares foram as mais facilmente observadas. Raramente vimos figuras mielínicas intracitoplasmáticas (Fig. 19).

Filamentos citoplasmáticos ou microfilamentos, existem esparsos por toda a célula endotelial, embora tenham sido mais frequentemente demonstrados na região basal da célula e próximos às áreas de junção. Apresentam espessura variada e agregam-se em diferentes direções, parecendo formar uma fina malha intra-celular, o citoesqueleto (Babbiani *et alii*, 1983).

Os corpos de Weibel-Palade foram raramente observados no citoplasma da célula endotelial. Têm a forma de bastonetes alongados, com matriz moderadamente eletrônica e túbulos paralelos no seu interior (Ghadially, 1977). Em alguns animais esta estrutura não pôde ser reconhecida.

Em algumas fotos evidenciamos áreas de menor densidade citoplasmática (Fig. 15, 16, 22), focalmente esparsas em ambas as regiões estudadas. Tais áreas parecem ter perdido parte das organelas e surgiram preferencialmente no polo basal da célula ou região para-juncional.

Na superfície basal da célula endotelial, observamos frequentemente prolongamentos citoplasmáticos, envoltos por lâmina basal, projetando-se para o espaço sub-endotelial. São geralmente finos e às vezes mostram íntima relação com os prolongamentos de fibras musculares lisas, formando focalmente áreas que poderíamos chamar de junções mio-endoteliais (Fig. 15, 16, 25, 26).

3.2. Junções intercelulares: As células endoteliais são ligadas entre si por junções ou áreas especializadas, de forma variada. No

nosso material, tanto no arco menor quanto no arco maior, predominaram as junções do tipo de pregas interdigitadas (Ghadially, 1977, Simionescu, 1984). Este é um tipo de junção onde há um imbricamento dos prolongamentos celulares, de complexidade muito variada. Desta forma vimos áreas juncionais quase que retas, ao lado de outras com intensa tortuosidade, como "dedos de luva" (Fig. 15, 16, 20). As formas mais complexas foram as mais frequentes em ambos os segmentos estudados. Neste tipo de junção distinguimos um espaço intercelular entre as lâminas externas das membranas plasmáticas (Fig. 20). Tal espaço varia pouco de amplitude e tem raras áreas focais de alargamento. Em alguns segmentos ou pontos nas áreas de junção, observamos um borramento das membranas citoplasmáticas, ou mesmo ausência do espaço intercelular (Fig. 20). Estes focos ou são áreas de redução do espaço intercelular ou de fusão das folhas externas das duas membranas celulares, constituindo outras variantes juncionais. Tais tipos juncionais, bem menos frequentes no nosso material, são chamados respectivamente de junção comunicante ("gap junction") e junção íntima ou oclusiva (do inglês "tight junction") (Bjorkerud, 1975). A frequência destes tipos juncionais não variou nos dois segmentos estudados do arco aórtico.

Não vimos sinais de lesão nas regiões de junção e, por outro lado, mesmo células endoteliais com aspectos sugestivos de lesão ou com áreas de arrancamento superficial do citoplasma, mostram junções íntegras.

Frequentemente, nas áreas de junção observamos prolongamentos longos e finos da célula endotelial para a luz, formando estruturas que lembram pequenas válvulas. Tais prolongamentos têm forma variada e apareceram ora acolados sobre a superfície de outra célula, ora oblíquos ou perpendiculares à superfície endotelial, projetando-se na luz (Fig. 18).

3.3. Lâmina basal: adjacente à porção basal da membrana plasmática da célula endotelial há a lâmina basal. Esta membrana descontínua, de espessura irregular é composta por material moderadamente elétron-denso, de aparência flocosa, onde se distinguem finos filamentos, formando rede de malha fina (Fig. 14, 21). Típicas fibras colágenas, com a estriação característica e pequenos grumos de material elástico foram vistos muito próximos ou mesmo acolados à membrana basal, focalmente. A espessura da lâmina basal variou muito mas, na maioria das fotos, ficou entre 30 a 80 nm. Havia áreas de espessamentos focais, irregulares, muitas vezes difíceis de se delimitar, pois o material filamentoso da lâmina basal se confundia com as microfibrilas do espaço subendotelial ou com o componente microfibrilar da fibra elástica jovem (Fig. 15). Desta forma, em algumas aortas observamos grandes espessamentos focais, com cerca de 1 μ m ou mais, constituídos por material do tipo lâmina basal. Estas áreas de maiores espessamentos focais (Fig. 22) ocorreram tanto na curvatura menor como na curvatura maior do arco aórtico mas, predominaram na região da curvatura maior. A distribuição das áreas com lâmina basal mais espessa foi: em 5 animais na curvatura maior do arco aórtico, em 3 na curvatura menor e em 2 animais e espessura encontrada nos dois segmentos era semelhante.

3.4. Espaço subendotelial: Entre a lâmina basal do endotélio e a membrana elástica interna (MEI) existem vários elementos celulares e fibrosos, preenchendo o chamado espaço subendotelial (ESE). Também aqui, como na microscopia óptica, apesar de MEI frequentemente não se destacar das lamelas da média, sempre a conceituamos como a primeira lamela mais grossa que aparece a partir da íntima. Assim procedendo, a espessura do ESE em cada animal e nos diferen

tes animais foi variável nas duas curvaturas do arco aórtico. Esta variação de espessura está relatada na tabela 1.

Em alguns animais, o ESE era estreito focalmente, estando o endotélio praticamente repousando sobre a MEI (Fig. 23). Mas como a localização da MEI variava, havia num mesmo animal áreas focais de ampliação do espaço subendotelial. Esta ampliação era variável, focal e ocorreu nas duas regiões do arco aórtico, às vezes predominando numa ou noutra área.

Vemos na tabela 1 que a espessura do espaço subendotelial no coelho nº 1 variou de 1,2 a 14 μm na curvatura menor e de 1,5 a 12 μm na curvatura maior. Considerando-se como a maior espessura da íntima aquela área que contém o maior número de fibras elásticas, à maneira de lamelas, com as respectivas células musculares intercaladas, verifica-se que os coelhos nºs 1, 2 e 10 apresentaram a região da curvatura menor mais espessa. Por outro lado, os animais de números 3, 4 e 5 mostraram maior espessura da íntima na curvatura maior e nos outros animais (nºs 6, 7, 8 e 9) a espessura da íntima era semelhante nas duas curvaturas. Medindo-se, porém, a espessura da íntima pela distância que vai da camada endotelial até a suposta MEI (Tab. 1), nota-se que nem sempre há correspondência entre o número de lamelas elásticas formadas na íntima e a respectiva medida em micrômetros. Isto pode ser melhor verificado no coelho nº 3 onde apesar da região da curvatura maior apresentar maior número de lamelas e de fibras musculares do que a curvatura menor, a medida da íntima em μm variou de 8 a 18 μm , enquanto que na curvatura menor, foi mais espessa (de 2 a 30 μm). Esta aparente disparidade é devida à composição diferente do espaço subendotelial, mais edematoso na curvatura menor do que na maior.

Os componentes estruturais do espaço subendotelial são as fibras colágenas elásticas, microfibrilas, substância fundamen

TABELA 1: Espessura e composição do espaço subendotelial em microscopia eletrônica.

Coelho	Curvatura menor	Curvatura maior
1	e = 1,2 a 14 μm 6 camadas de fm e el edema: leve	e = 1,5 a 12 μm 5 camadas de fm e el edema: leve a intenso
2	e = 2 a 22 μm 5 camadas de fm e el edema: moderado	e = 5 a 13 μm 1 a 3 camadas de fm e el edema: leve
3	e = 2 a 30 μm de MEI logo abaixo do endotélio até 2 camadas de fm e el edema: moderado a intenso	e = 8 a 18 μm 3 a 6 camadas de fm e el edema: moderado
4	e = 10 a 20 μm 3 a 7 camadas de fm e el edema: leve	e = 5 a 20 μm 3 a 9 camadas de fm e el edema: leve a moderado
5	e = 1 a 6,6 μm MEI logo abaixo do endotélio edema: leve	e = 10 a 17 μm até 3 camadas de fm e el edema: leve
6	e = 2,5 a 17 μm 1 a 3 camadas de fm e el edema: ausente	e = 10 a 16 μm 1 ou 2 camadas de fm e el edema: leve a moderado
7	e = 1 a 9 μm até 2 camadas de fm e el edema: leve a moderado	e = 2 a 11 μm 2 camadas de fm e el edema: leve
8	e = 1,2 a 10 μm 1 ou 2 camadas de fm e el edema: ausente ou leve	e = 8 a 14 μm 1 ou 2 camadas de fm e el edema: leve a moderado
9	e = 2 a 9 μm 1 ou 2 camadas de fm e el edema: leve	e = 4 a 14 μm 1 ou 2 camadas de fm e el edema leve a moderado
10	e = 3 a 11 μm 3 a 9 camadas de fm e el edema: ausente	e = 3 a 11 μm 3 camadas de fm e el edema: leve

e=espessura fm=fibra muscular el=fibra elástica MEI=membrana elástica interna μm =micrômetro.

tal, células musculares lisas e menos frequentemente, fibroblastos e células pouco diferenciadas, de natureza discutível.

As fibras colágenas são facilmente reconhecidas pela sua estriação característica. Elas são muito frequentes no espaço subendotelial de ambas as regiões estudadas.

As fibras elásticas aparecem como elemento amorfo, pouco denso aos elétrons, com quantidade variável de microfibrilas no seu interior (Fig. 14, 15, 22, 23). Desta forma, distinguimos 2 componentes na fibra elástica: 1º) material homogêneo e elétron-luzente e 2º) material microfibrilar. Quanto mais jovem for a fibra elástica, tanto maior é o seu componente microfibrilar (Geer e Haust, 1972). As fibras elásticas têm espessura variada e apresentam-se como agregados de diferentes grossuras ou lamelas descontínuas. Nas áreas de espessamento do espaço subendotelial notamos várias lamelas elásticas, intercaladas com fibras musculares lisas. A primeira lamela mais espessa foi sempre considerada como a MEI. O componente elástico apresentou o mesmo aspecto nas duas áreas estudadas.

As microfibrilas são finos filamentos eletro-densos, de comprimento e diâmetro variados, encontradas difusamente esparsas no espaço subendotelial, mais frequentemente nas proximidades da célula endotelial, junto à lâmina basal, ou associadas às lamelas elásticas (Fig. 18, 21).

A substância fundamental situada entre os elementos descritos é pouco densa aos elétrons, nos métodos de preparação habituais. Desta forma apresentou-se como espaço claro entre as fibras e as células, que em alguns animais estava alargado, em intensidade variável. Este alargamento do interstício foi referido como "edema" ou aspecto edematoso do espaço subendotelial e graduado subjetivamente em leve, moderado ou intenso. Voltando à tabela 1, notamos que um leve edema estava presente na maioria dos

animais e que, no mesmo animal, também havia variação da intensidade, geralmente de grau leve a moderado. Apenas o coelho nº 1, na região de curvatura maior do arco aórtico e o coelho nº 3, na curvatura menor, apresentaram áreas focais de edema graduado como intenso.

Os elementos celulares encontrados na íntima foram as fibras musculares lisas bem caracterizadas e mais raramente, células com características de fibroblastos e células indiferenciadas de natureza discutível.

A fibra muscular lisa (Fig. 15, 21) é geralmente fusiforme, alongada mas também se apresentou com muitos prolongamentos citoplasmáticos que frequentemente penetravam em fendas das lamelas elásticas. Caracteriza-se por uma membrana basal limitante, numerosas vesículas de pinocitose ao longo da membrana plasmática, miofilamentos citoplasmáticos e corpos densos associados aos miofilamentos (Rhodin, 1962, Somlyo, 1975, Kocher *et alii*, 1984). O citoplasma apresenta ainda outras organelas como o retículo endoplasmático liso e rugoso, mitocôndrias e aparelho de Golgi. Inclusões ocasionais de densidade eletrônica variada (Fig. 25), foram observadas no citoplasma, mais raramente. O núcleo é central, alongado e mostra contorno liso ou ondulado. Em algumas fotos, notamos que o espessamento intimal constituído por várias camadas de fibras musculares e lamelas elásticas, mostrava frequentemente fibras musculares lisas em corte transversal, diferentes das da média que sempre e apresentam em corte longitudinal (Fig. 26).

As fibras musculares lisas são separadas entre si mas mostram focalmente, áreas muito próximas e aí apresentam junções. Observamos no nosso material só junções em que as membranas citoplasmáticas estavam aproximadas, mas não fundidas. Estas áreas de junção geralmente eram em curtos segmentos entre os prolongamen-

tos celulares finos de ambas as células musculares. Outras vezes, a junção era mais longa e linear (Fig. 26).

O relacionamento das células musculares lisas com as fibras elásticas e colágenas é grande e muito imbricado. Desta forma, na periferia de toda célula muscular lisa há elementos fibrosos muito próximos que, focalmente, parecem fazer conexão com a membrana basal da célula ou com a própria membrana citoplasmática. Finos prolongamentos da célula muscular frequentemente são vistos passando através das fendas das lamelas elásticas (Fig. 15, 16, 24, 28, 30).

Porções celulares de forma arredondada e de diferentes volumes, envoltas por membrana citoplasmática, contendo no seu interior material semelhante ao citoplasma das fibras musculares, são vistos também no espaço subendotelial. Outras vezes, nestas porções celulares reconhecemos apenas resíduos de retículo endoplasmático, organelas degeneradas, figuras de mielina ou apenas material amorfo pouco denso aos elétrons (Fig. 17, 19, 22, 24).

Além da típica fibra muscular lisa já descrita, encontramos em todos os animais, exceto no de nº 5, outros tipos celulares muito menos frequentes no espaço subendotelial. Desta forma conforme as características apresentadas, agrupamos estas outras células em 2 categorias: a) fibroblastos; b) células pouco diferenciadas de natureza discutível.

Os fibroblastos típicos (Fig. 27) foram raros no nosso material (coelhos nº 1, 4, 10) e caracterizam-se por forma alongada ou estrelária, com prolongamentos citoplasmáticos longos que se estendem pelo espaço intercelular. Não apresentam membrana basal limitante e há poucas vesículas de pinocitose ao longo da membrana plasmática. O citoplasma é escasso e contém principalmente retículo endoplasmático rugoso. São envoltos por grande quantidade de fibras colágenas.

Chamamos de célula pouco diferenciada de natureza discutível, a vários tipos de células que ora possuem alguns constituintes que lembram os de uma célula muscular lisa, ora lembram células de linhagem sanguínea (monócitos, linfócitos).

As células subendoteliais mais ovóides, sem membrana basal, com poucas vesículas de pinocitose na membrana plasmática, citoplasma com poucas organelas (mitocôndrias, retículo endoplasmático e ribossomos principalmente) e núcleo geralmente reniforme, lembraram mais os monócitos do sangue. Foram os tipos celulares mais raramente observados (coelho nº 10) e ficavam localizados preferencialmente próximos do endotélio (Fig. 28).

As células deste grupo mais frequentemente observadas foram as que se pareciam com as fibras musculares lisas em alguns dos seus caracteres (coelhos nºs 2, 3, 6, 8, 9, 10). Apresentavam forma variável: ovóide, alongada ou estrelária. A membrana plasmática continha um número variável de vesículas de pinocitose e a membrana basal da célula podia ser completa ou incompleta. O citoplasma apresentava geralmente mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso, ribossomos livres e microfilamentos esparsos, lembrando os miofilamentos de fibra muscular lisa. Diferiam das fibras musculares lisas típicas por serem menores, terem maior número de organelas e menor quantidade de filamentos (Fig. 29).

3.5. Membrana elástica interna: O critério adotado para reconhecer a MEI foi o mesmo que o da microscopia óptica e a sua distinção entre as várias lamelas elásticas da média e da própria íntima, foi melhor conseguida em fotos panorâmicas ou em pequenos aumentos. A MEI é constituída de fibras elásticas lamelares, pouco densas aos elétrons, e variável quantidade de microfibrilas. É uma camada descontínua, segmentada, mostrando várias fenestrações

por onde passam feixes de fibras colágenas e prolongamentos de células musculares lisas (Fig. 30, 31). Frequentemente notamos que a MEI apresentava pontos de bifurcação ou de emissão de vários prolongamentos (Fig. 17), que se confundiam com as outras lamelas elásticas da íntima ou da média.

Observamos que, em apenas 2 dos 10 animais estudados (coelhos nºs 5 e 10), a MEI foi nítida, destacando-se entre as outras lamelas elásticas (Fig. 23). Na maioria das vezes foi difícil distinguí-la, pois se em alguns trechos surgia uma lamela mais grossa, em outros ela se bifurcava ou emitia vários prolongamentos mais finos, perdendo seus limites. Em alguns trechos a MEI era completamente indistinta das outras lamelas elásticas. Em outros, ela mostrava variação de localização, delimitando áreas focais de espessamento intimal nos diferentes segmentos estudados.

Todos os aspectos da MEI vistos em microscopia óptica foram confirmados pela eletrônica, que fornecia maiores detalhes quanto à descontinuidade, bifurcações e emissão de prolongamentos. Desta forma, naqueles animais em que a distinção da MEI foi fácil em nível óptico, também a microscopia eletrônica mostrava uma nítida lamela mais espessa, destacando-se entre as outras. Por outro lado, se a nível óptico era difícil distinguí-la, também à eletrônica encontramos esta dificuldade, não contribuindo com melhores informações.

Tanto na região da curvatura menor do arco aórtico, quanto na curvatura maior, observamos os mesmos aspectos morfológicos da MEI e as mesmas dificuldades para distinguí-la.

São usadas nas fotos e nas legendas as seguintes abreviaturas:

E	=	célula endotelial
MEI	=	membrana elástica interna
fm	=	fibra muscular lisa
mb	=	lâmina basal
col	=	fibra colágena
el	=	fibra elástica
µf	=	microfibrilas
V	=	vesículas
mt	=	mitocôndria
RER	=	retículo endoplasmático rugoso
REL	=	retículo endoplasmático liso
G	=	aparelho de Golgi
cd	=	corpos densos
cm	=	corpos multivesiculares
mf	=	microfilamentos
fig	=	figura mielínica
mi	=	miofilamento
pd	=	projeções digitiformes
ID	=	prega interdigitada
GJ	=	junção comunicante
TJ	=	junção íntima ou oclusiva
PC	=	prolongamentos ou porções celulares
N	=	núcleo
ESE	=	espaço subendotelial

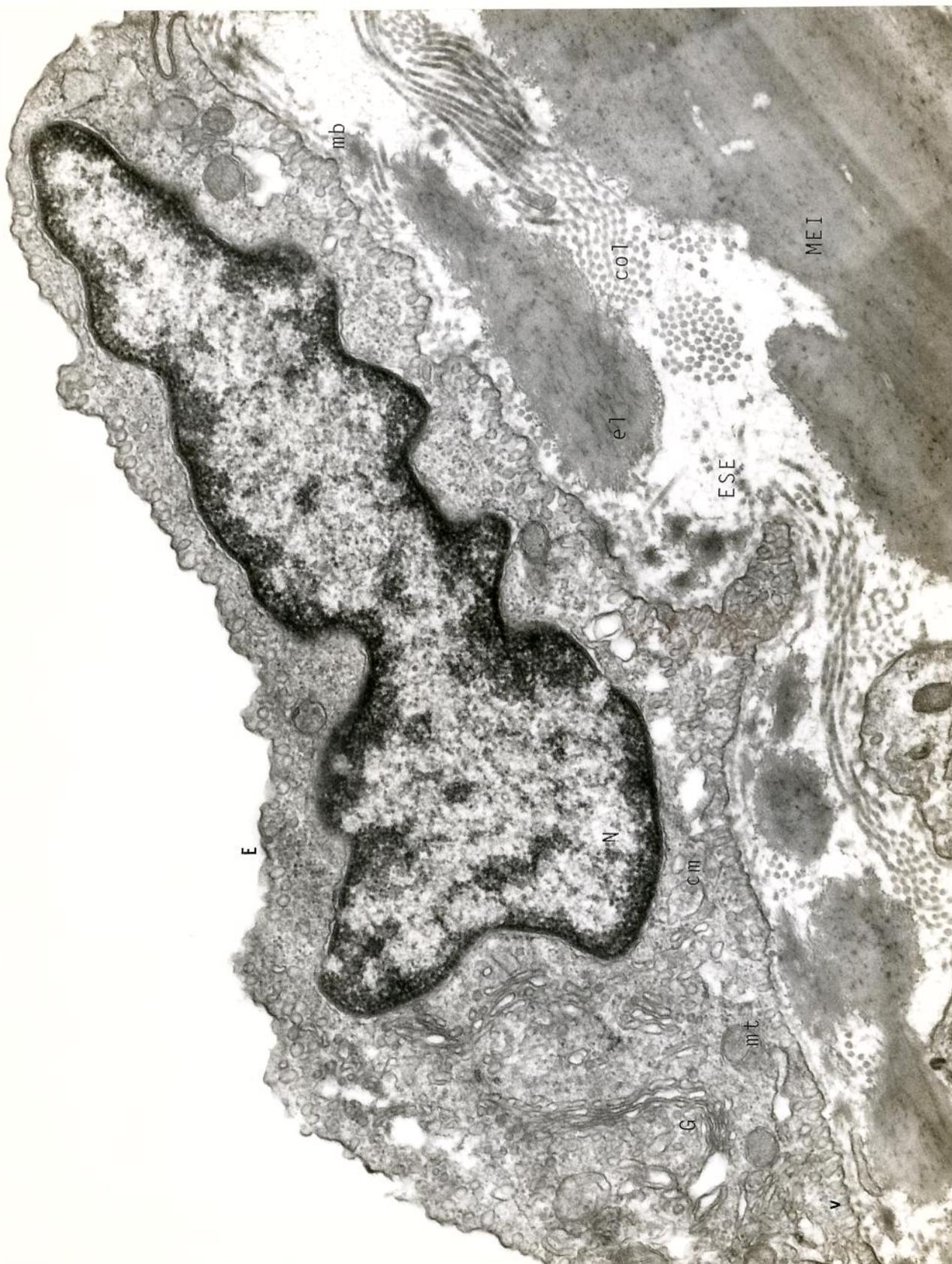


Fig. 14 - Coelho nº 10, arco Maior - Detalhe da célula endotelial com suas organelas, lâmina basal, espaço subendotelial estreito com fibras colágenas, elásticas e a membrana elástica interna (negativo 1407-30000X).

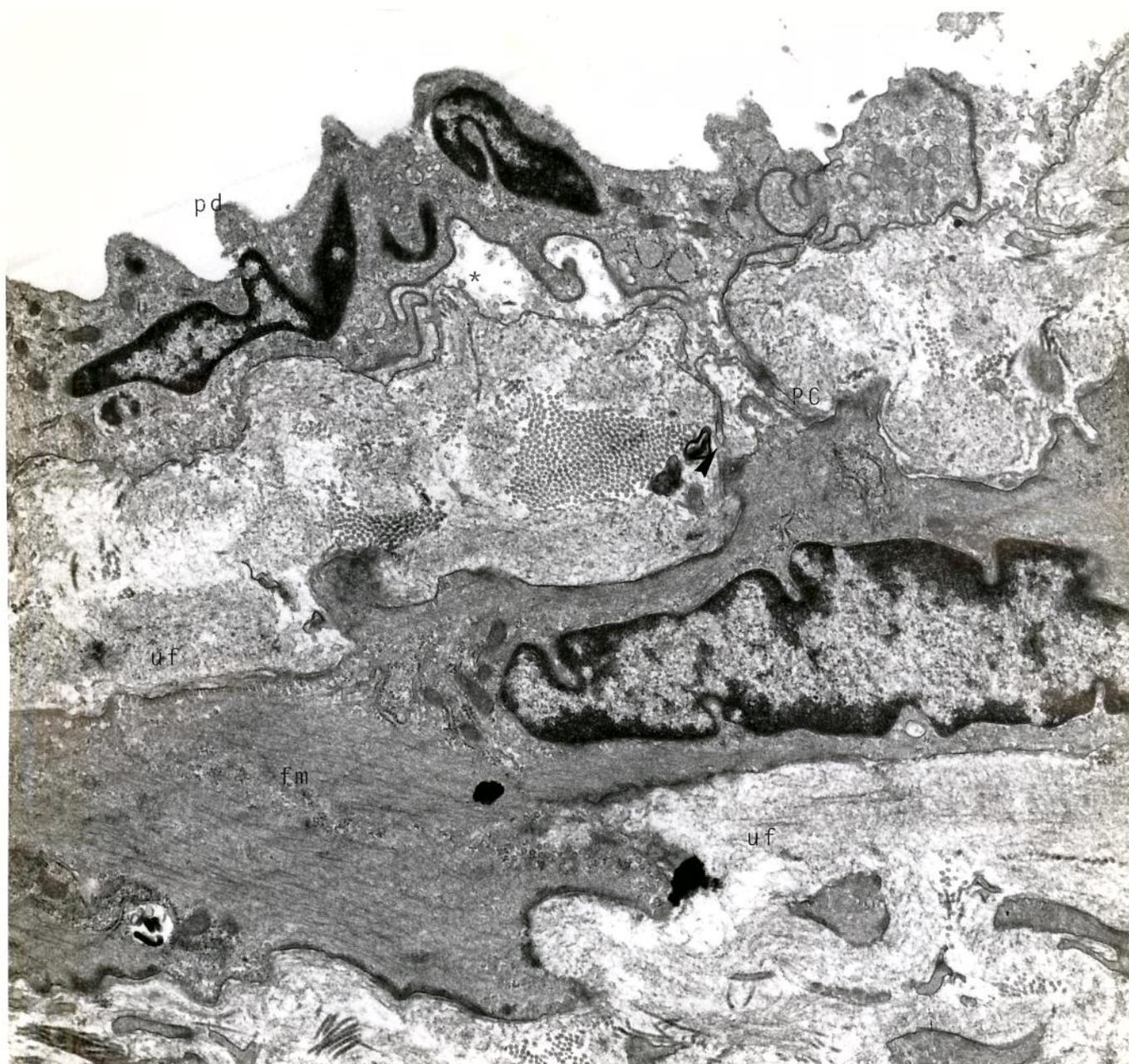


Fig. 15 - Coelho nº 6, arco menor. Endotélio com projeções digitiformes para a luz e área de menor densidade citoplasmática(*). No espaço subendotelial há fibras colágenas, fibras elásticas de aspecto jovem pela grande quantidade de microfibrilas. Uma fibra muscular é vista no espaço subendotelial e está muito próximo do prolongamento de célula endotelial (seta) (negativo 765 - 17500X).

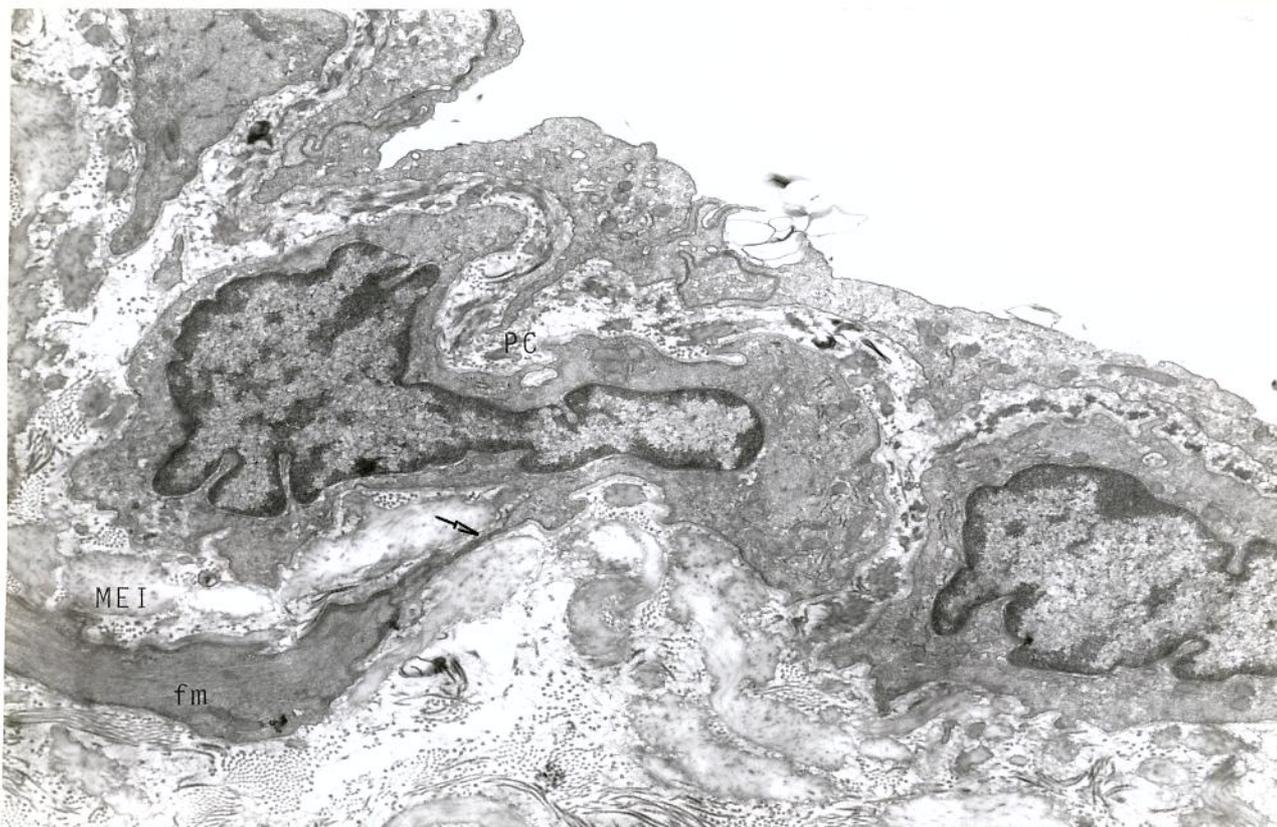


Fig. 16 - Coelho nº 5, arco maior. Endotélio apresentando prolongamentos membranosos soltos na luz e prolongamentos finos em direção ao espaço subendotelial. Notar a fibra muscular lisa atravessando a fenda da membrana elástica interna (seta) (negativo 587 - 10000X).

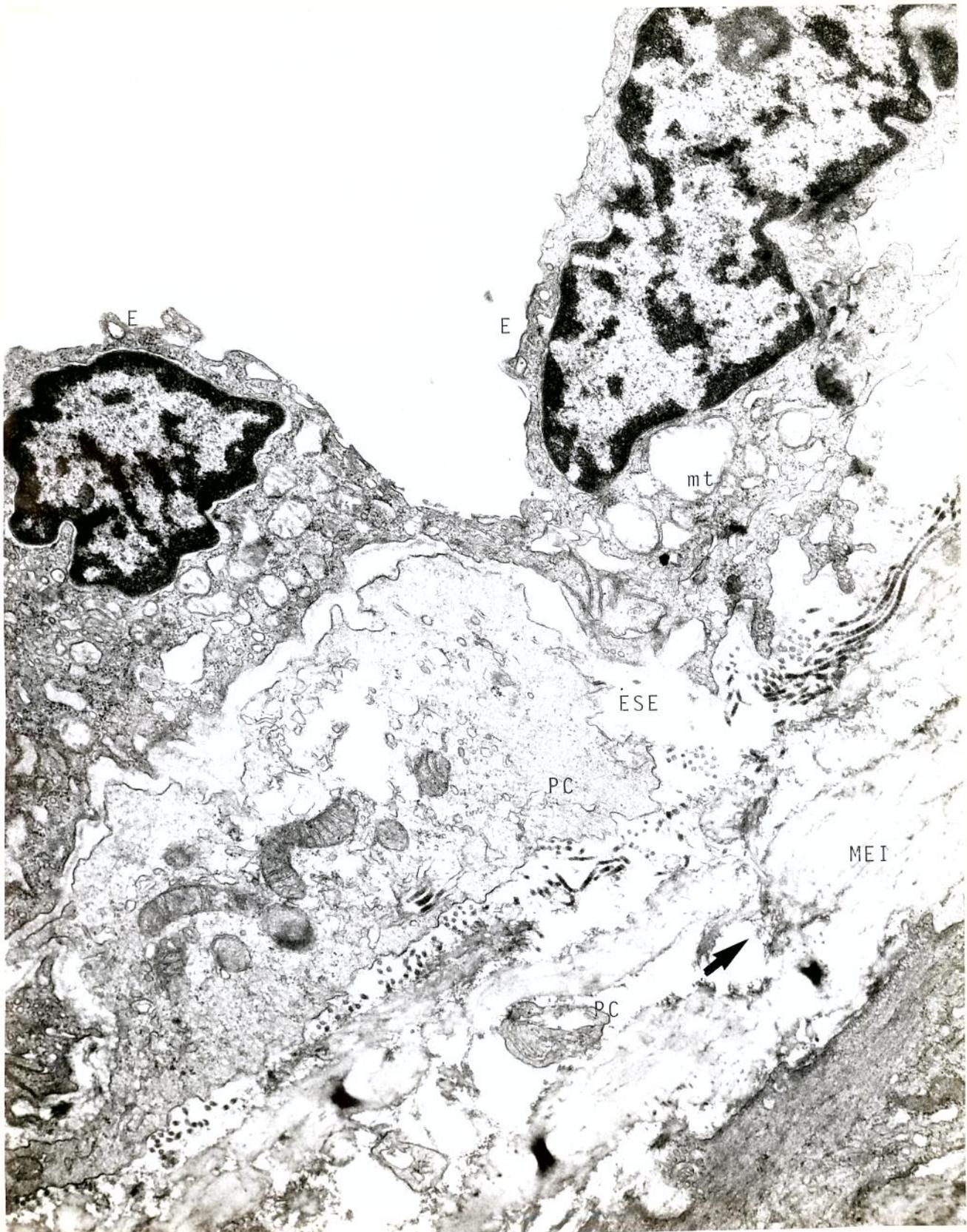


Fig. 17 - Coelho nº 1, arco maior. Células endoteliais tumefeitas, com mitocôndrias edemaciadas e vacúolos. No espaço subendotelial há porções celulares em degeneração. A membrana elástica interna parece se bifurcar (seta) (negativo 427 - 18900X).

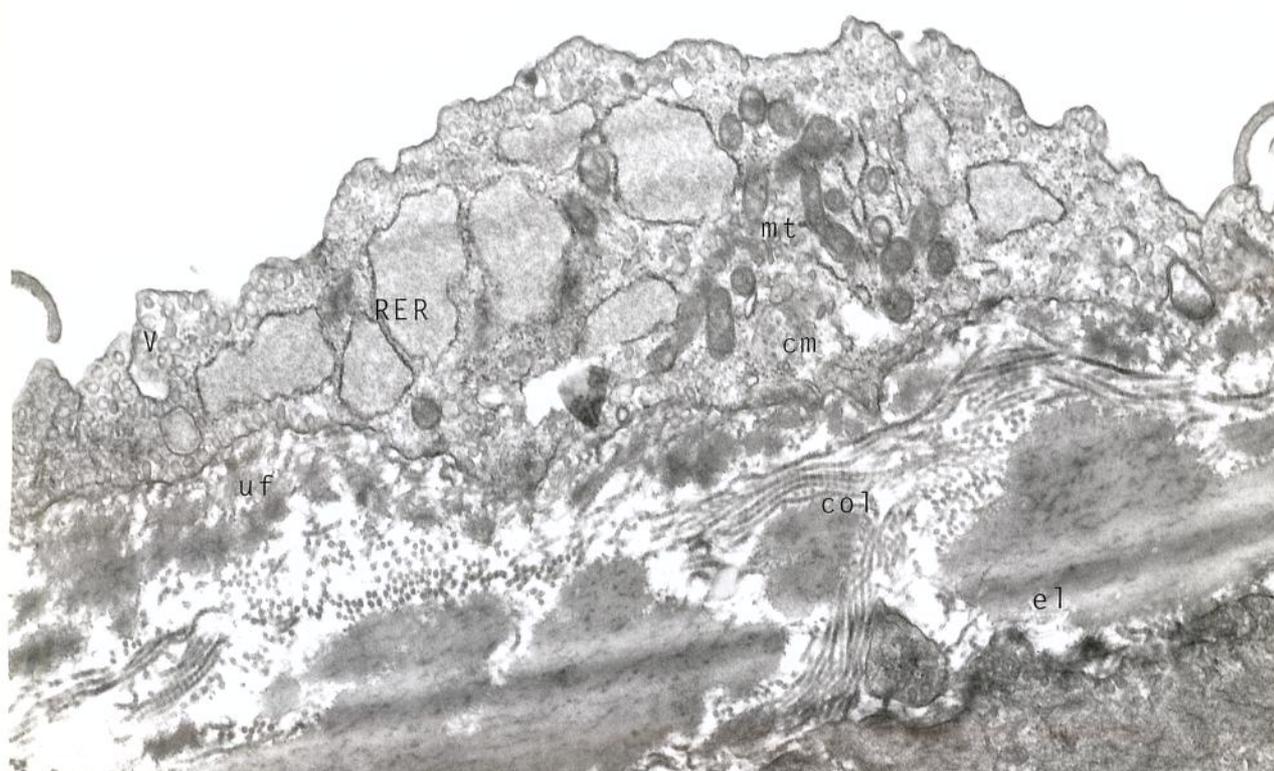


Fig. 18 - Coelho nº 10, arco maior. Célula endotelial mostrando dilatação acentuada do retículo endoplasmático rugoso, várias vesículas, mitocôndrias e corpos multivesiculares. No espaço subendotelial há fibras colâgenas, elásticas e maior densidade de microfibrilas na região da lâmina basal (negativo 1416 - 27500X).

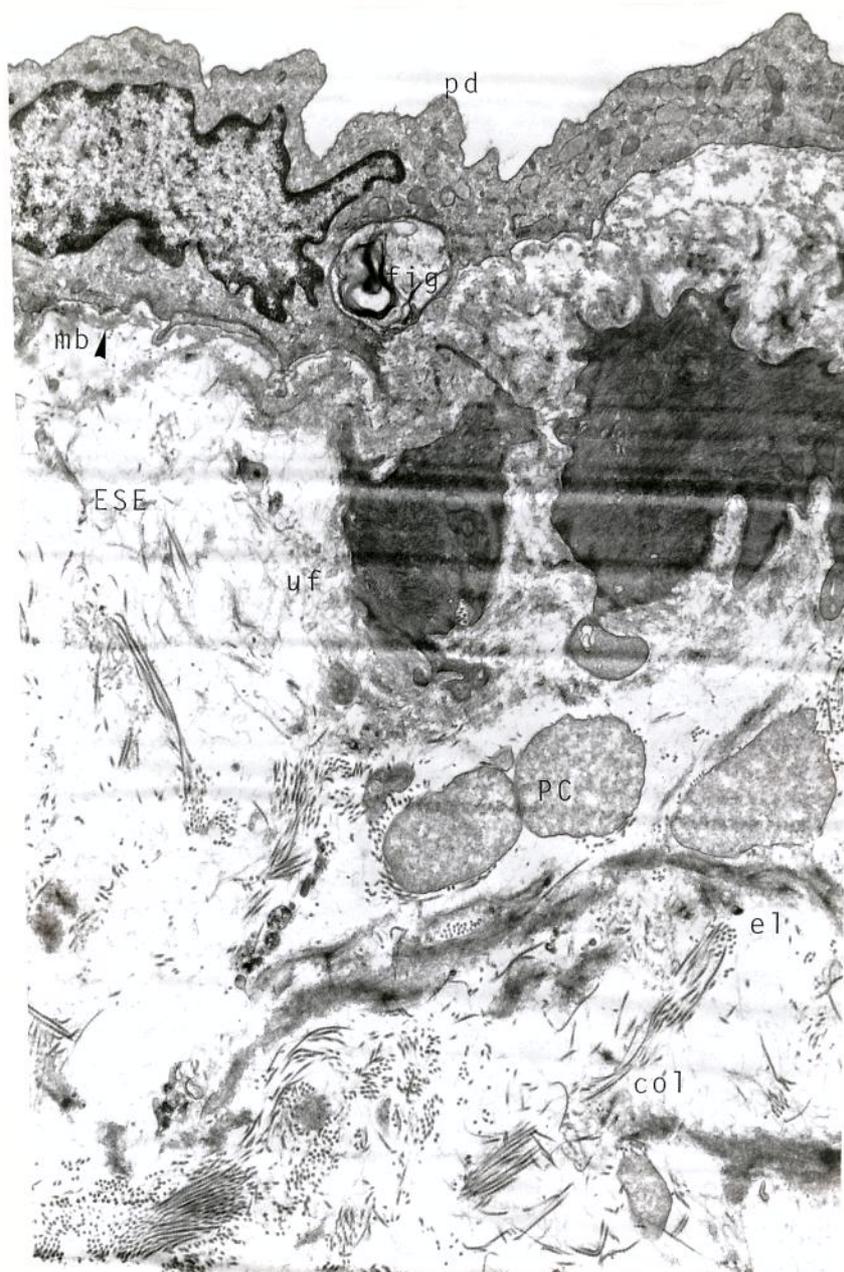


Fig. 19 - Coelho nº 8, arco maior. Endotélio com projeções para a luz e figura mielínica no citoplasma. A lâmina basal mostra espessamentos focais (seta) e o espaço subendotelial apresenta aspecto edematoso, porções celulares, fibras colágenas, elásticas e microfibrilas (negativo 1090 - 10000X).



Fig. 20 - Coelho nº 1, arco menor. Observar na junção complexa de células endoteliais o espaço intercelular nítido (ID), inexistente (TJ) ou diminuído (GJ), com borramento da imagem das membranas celulares (negativo 246 - 125000X).

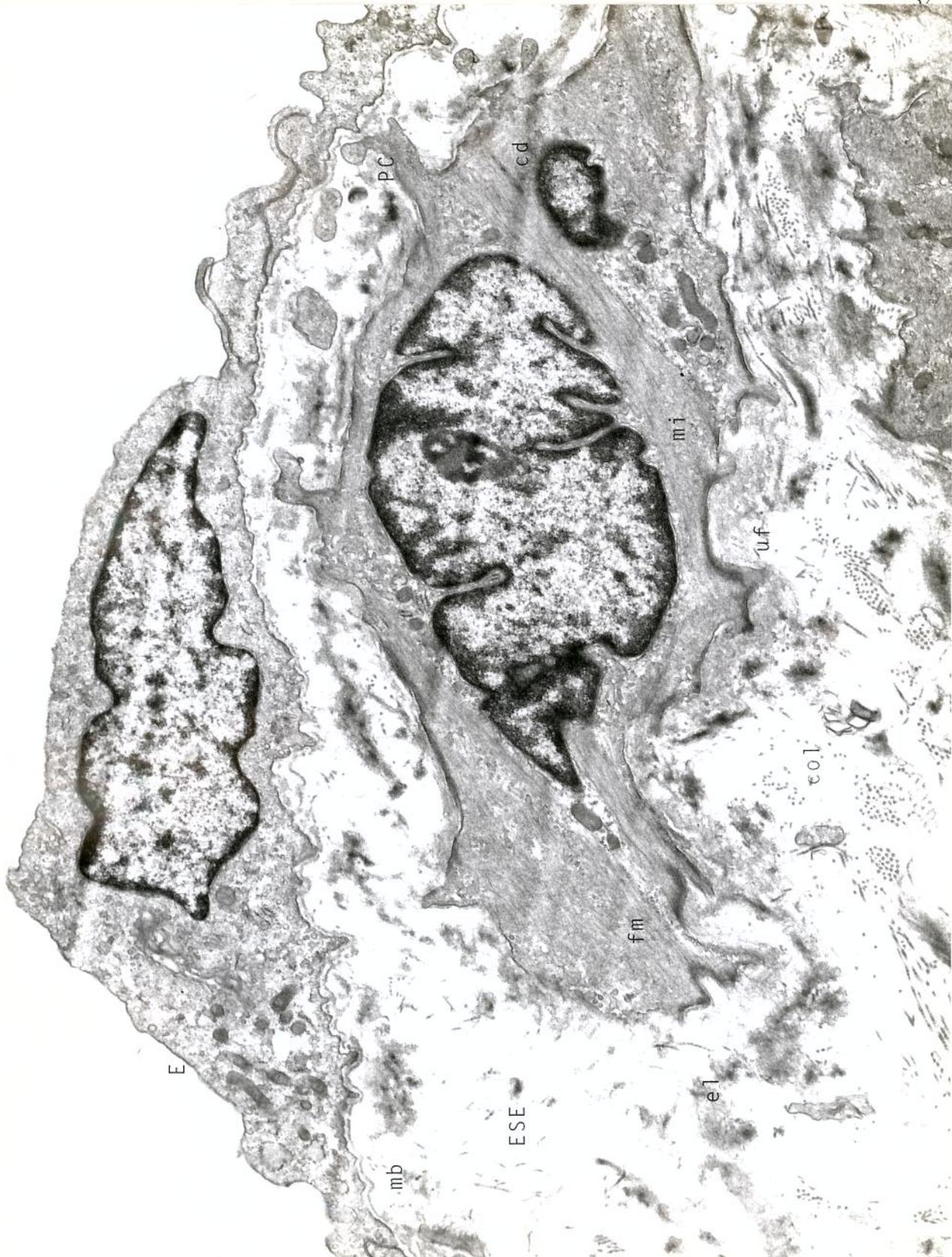


Fig. 21 - Coelho nº 8, arco menor. Notar célula endotelial, junções intercelulares, lâmina basal de espessura normal, fibra muscular lisa subendothelial com prolongamento muito próximo do endotélio, espaço subendothelial com aspecto levemente edematoso, com microfibrilas, fibras colágenas e elásticas (negativo 991 - 12000X).

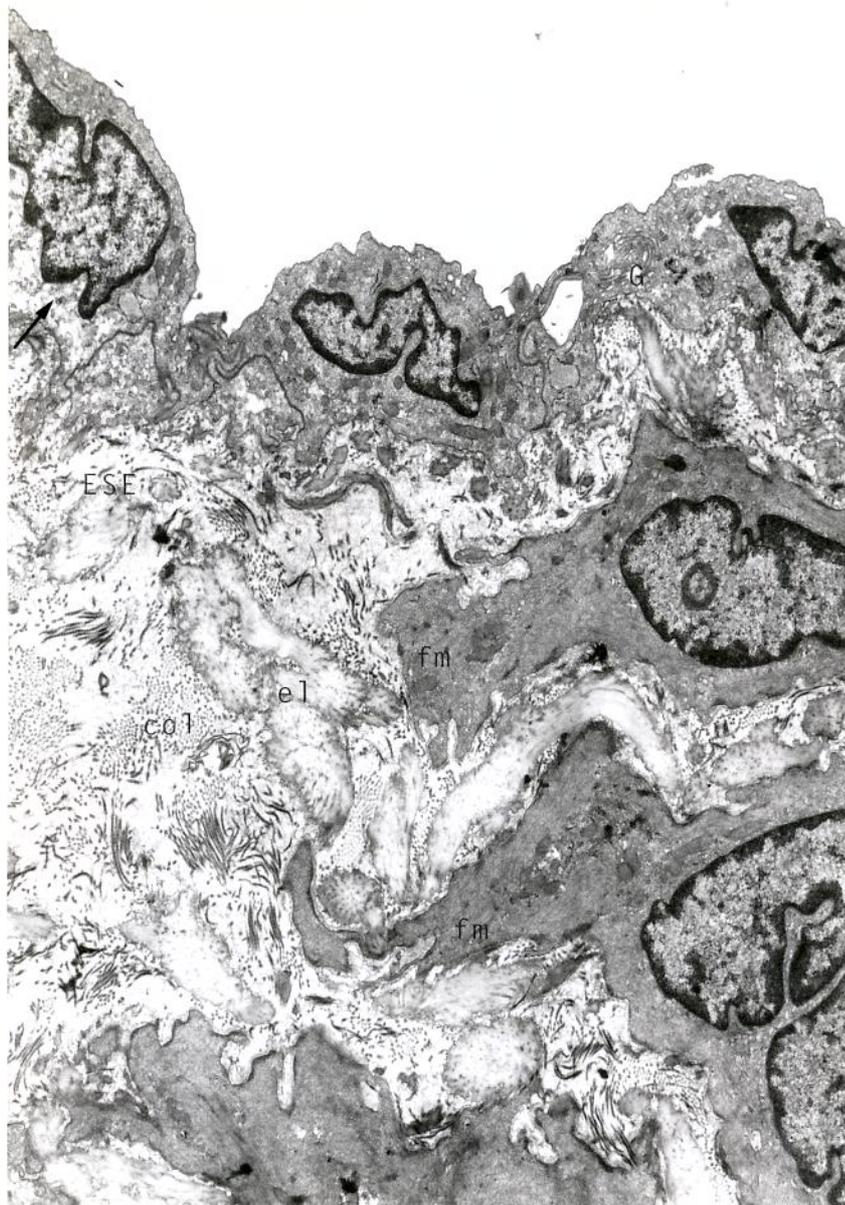


Fig. 22 - Coelho nº 4, arco menor. Junções intercelulares muito complexas, diminuição focal da densidade do citoplasma endotelial (seta), espaço subendotelial com fibras colágenas, microfibrilas e lamelas elásticas descontínuas, muito imbricadas às fibras musculares lisas (negativo 589 - 8800X).

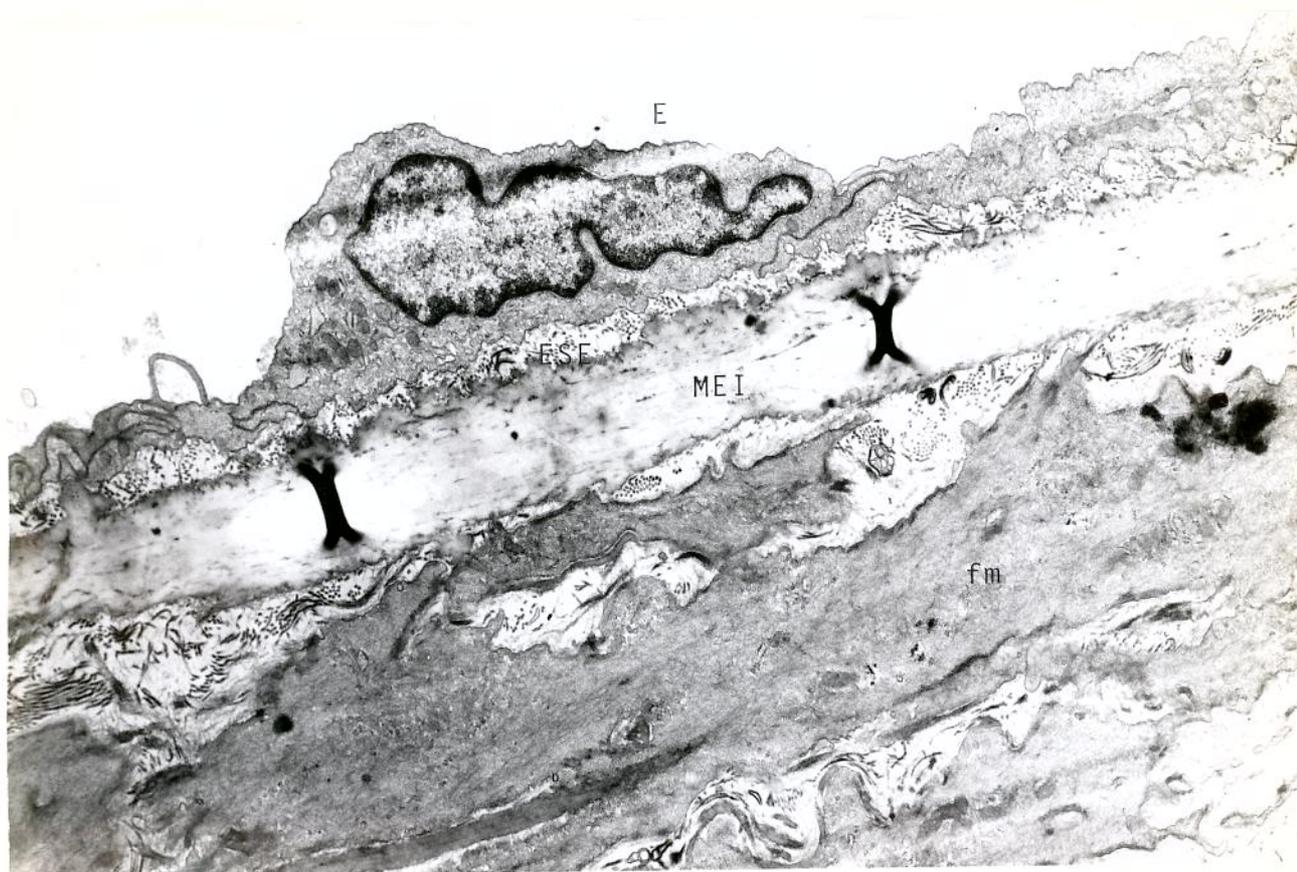


Fig. 23 - Coelho nº 5, arco menor. Membrana elástica interna nítida, logo abaixo do endotélio e espaço subendotelial muito estreito. (negativo 547 - 12500X).



Fig. 24 - Coelho nº 3, arco menor. Célula endotelial saliente na luz, com grande vacúolo. O espaço subendotelial tem aspecto edematoso e mostra pequenos agrupamentos de fibras elásticas, colágenas e porções celulares. No campo, a 2.^a lamela elástica, mais espessa e fenestrada foi considerada a membrana elástica interna. (negativo 447 - 7500X).

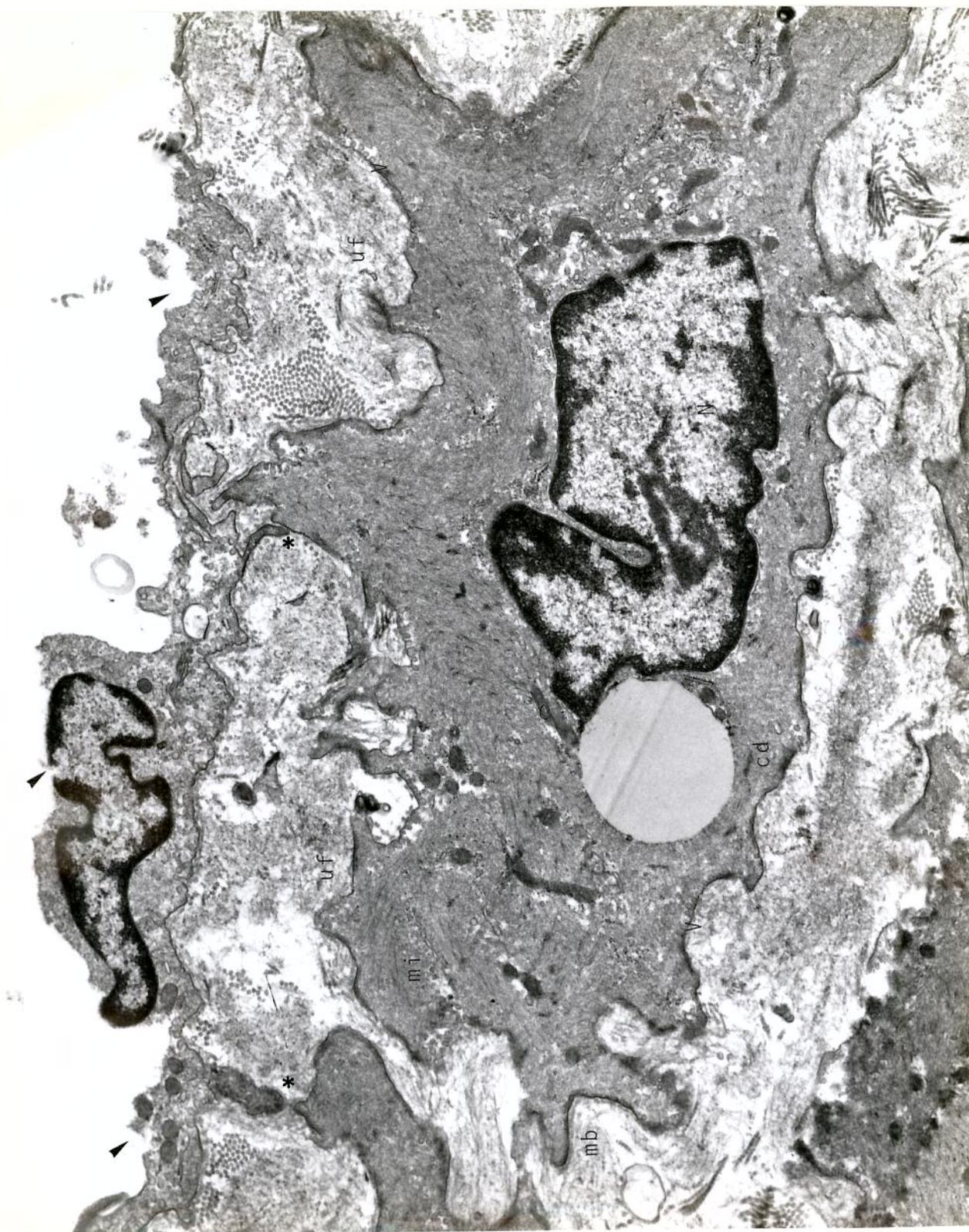


Fig. 25 - Coelho nº 6, arco menor. Observar os arrancamentos superficiais das células endoteliais (setas), a aproximação dos prolongamentos das células endoteliais e das fibras musculares lisas (*) e o espaço subendotelial com grande quantidade de microfibrilas. Notar a fibra muscular lisa do espaço subendotelial com seus componentes característicos e com uma inclusão clara no citoplasma. (negativo 768 - 17500X).

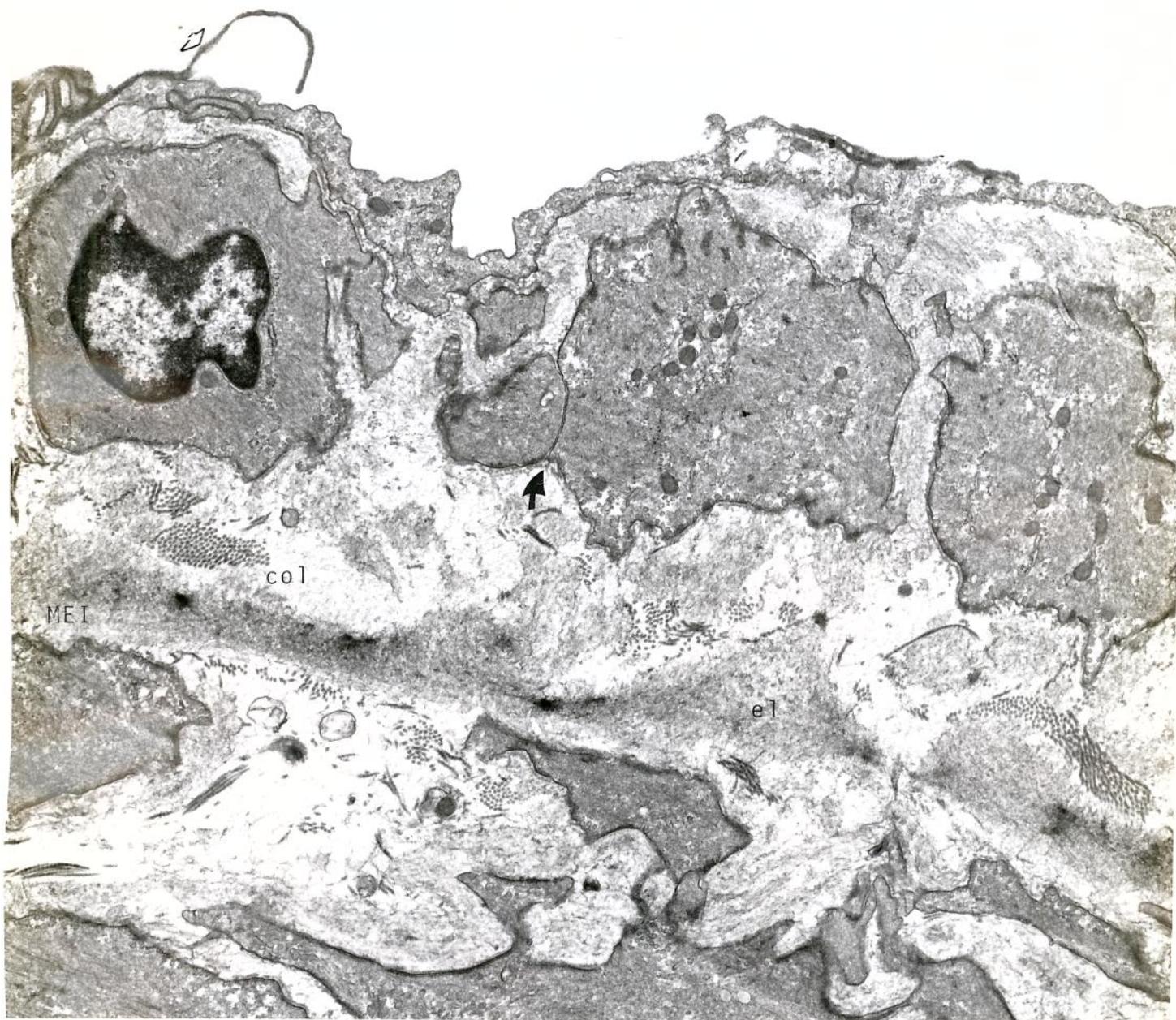


Fig. 26 - Coelho nº 6, arco maior. Notar prolongamento fino da célula endotelial para a luz, na área de junção (seta). Comparar as fibras musculares lisas em corte transversal no espaço subendotelial com as longitudinais da média. O componente microfibrilar das fibras elásticas é predominante. Observar a área de junção entre as fibras musculares do espaço subendotelial (seta). (negativo 775 - 12000X).

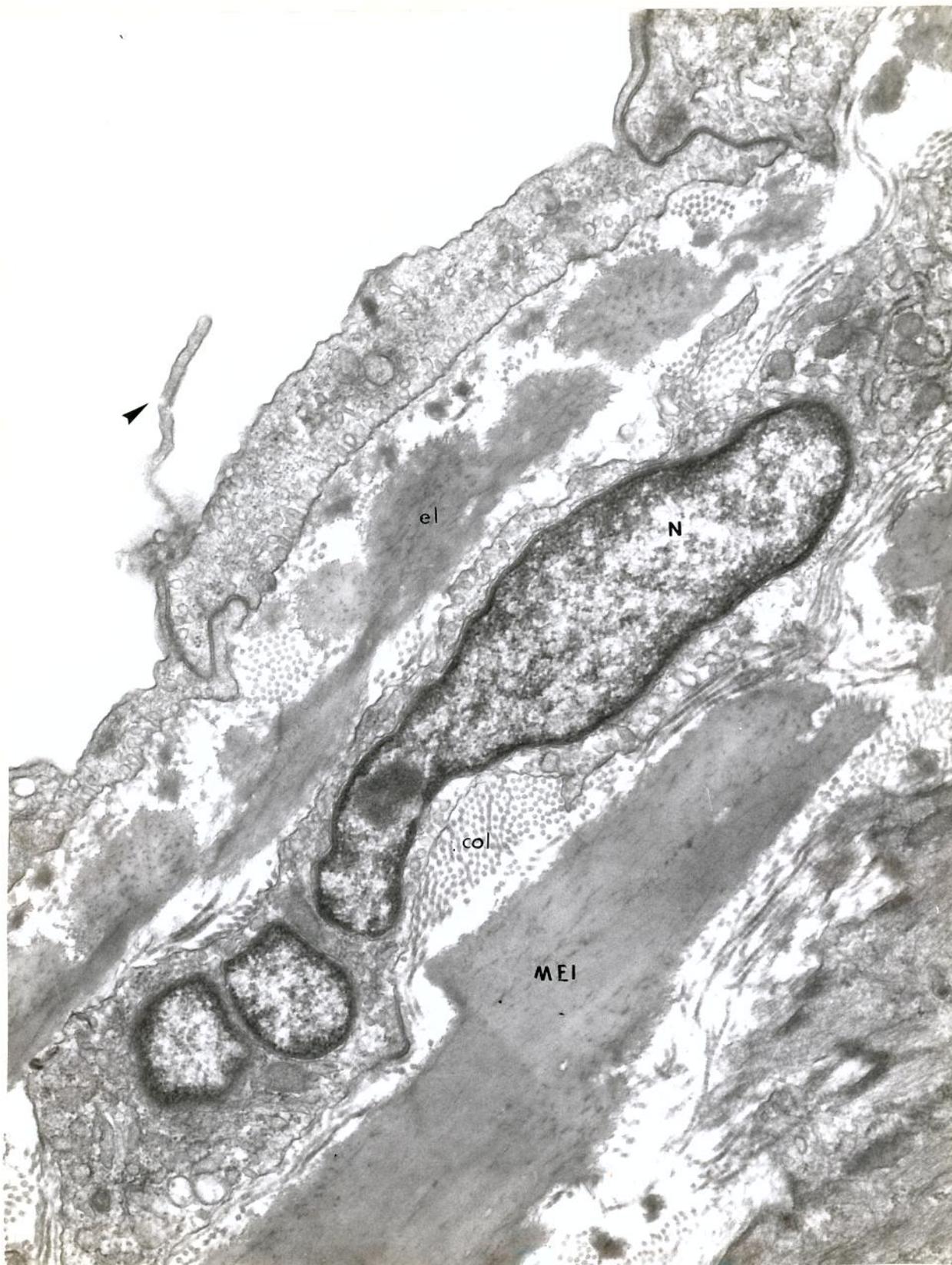


Fig. 27 - Coelho nº 10, arco maior. Prolongamento alongado na luz na região de junção de células endoteliais. Notar no espaço subendotelial célula com características de fibroblasto, mostrando grande quantidade de colágeno ao redor. A membrana elástica interna é nítida e fenestrada neste trecho. (negativo 1408 - 32000X).

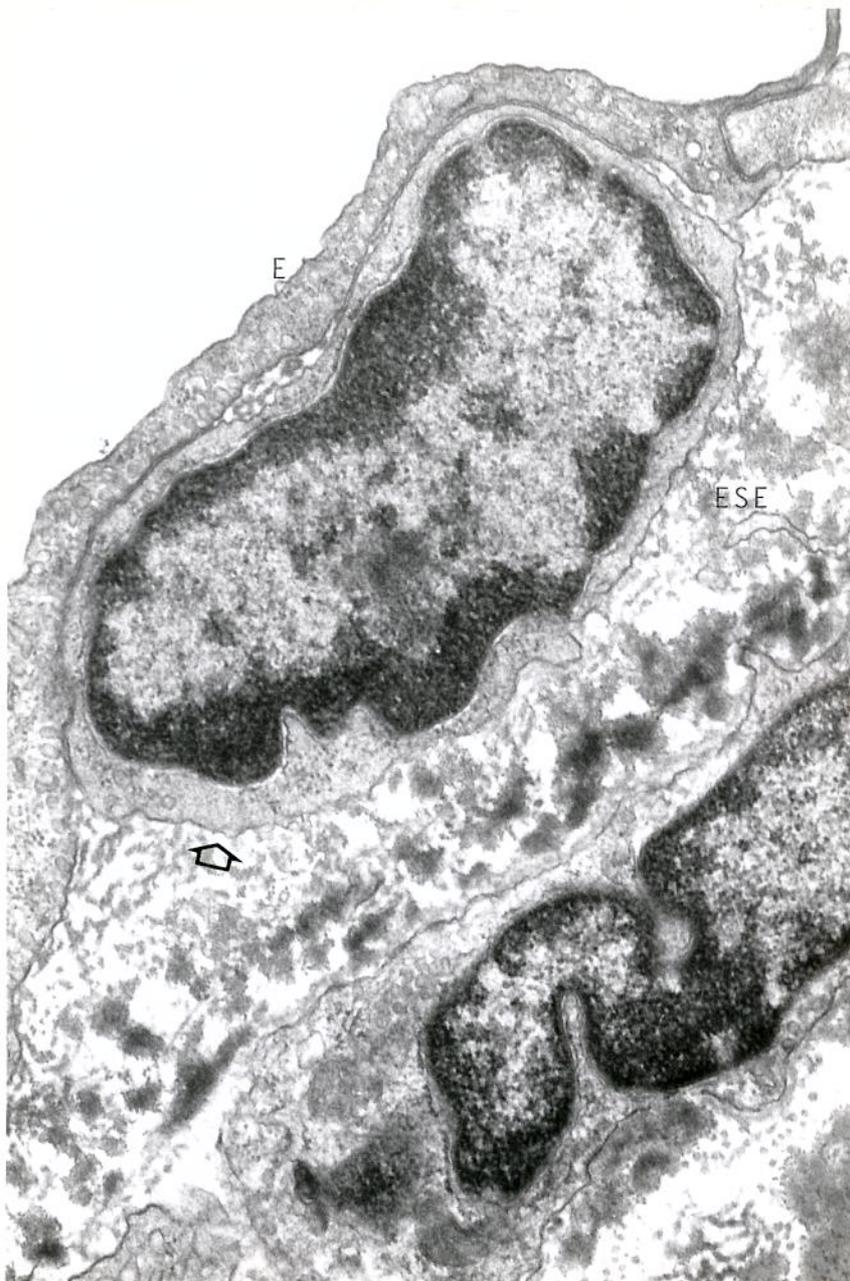


Fig. 28 - Coelho nº 10, arco menor. Notar a célula no espaço subendotelial, muito próxima do endotélio, com forma ovóide, poucas organelas e núcleo reniforme, caracterizada como célula de origem sanguínea (monócito). (negativo 1314 - 30000X).

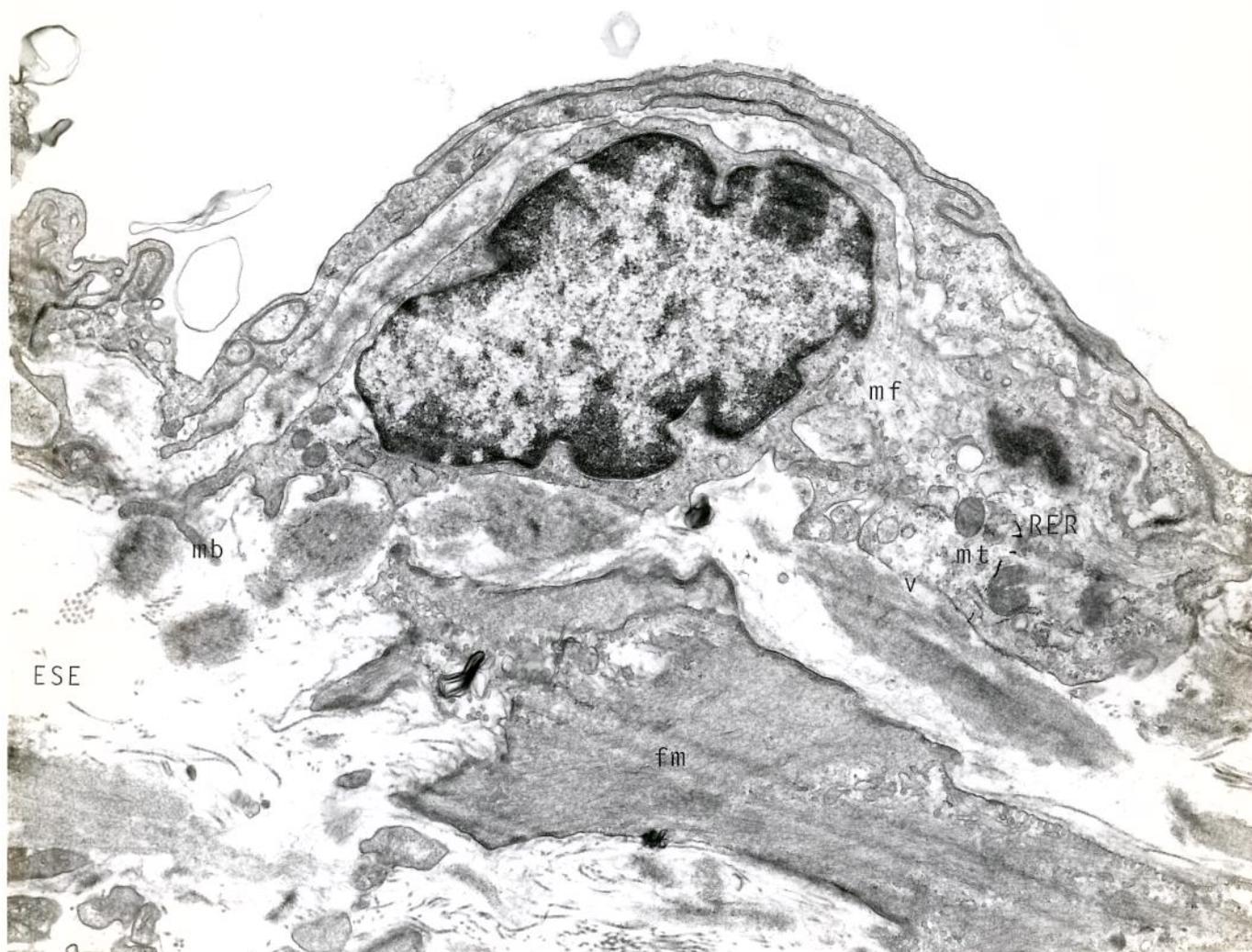


Fig. 29 - Coelho nº 8, arco menor. No espaço subendotelial célula mesenquimatosa pouco diferenciada que apresenta membrana basal descontínua, membrana plasmática, retículo endoplasmático rugoso, ribossomos livres e microfilamentos esparsos. Comparar com a fibra muscular lisa adjacente (negativo 968 - 15000X).

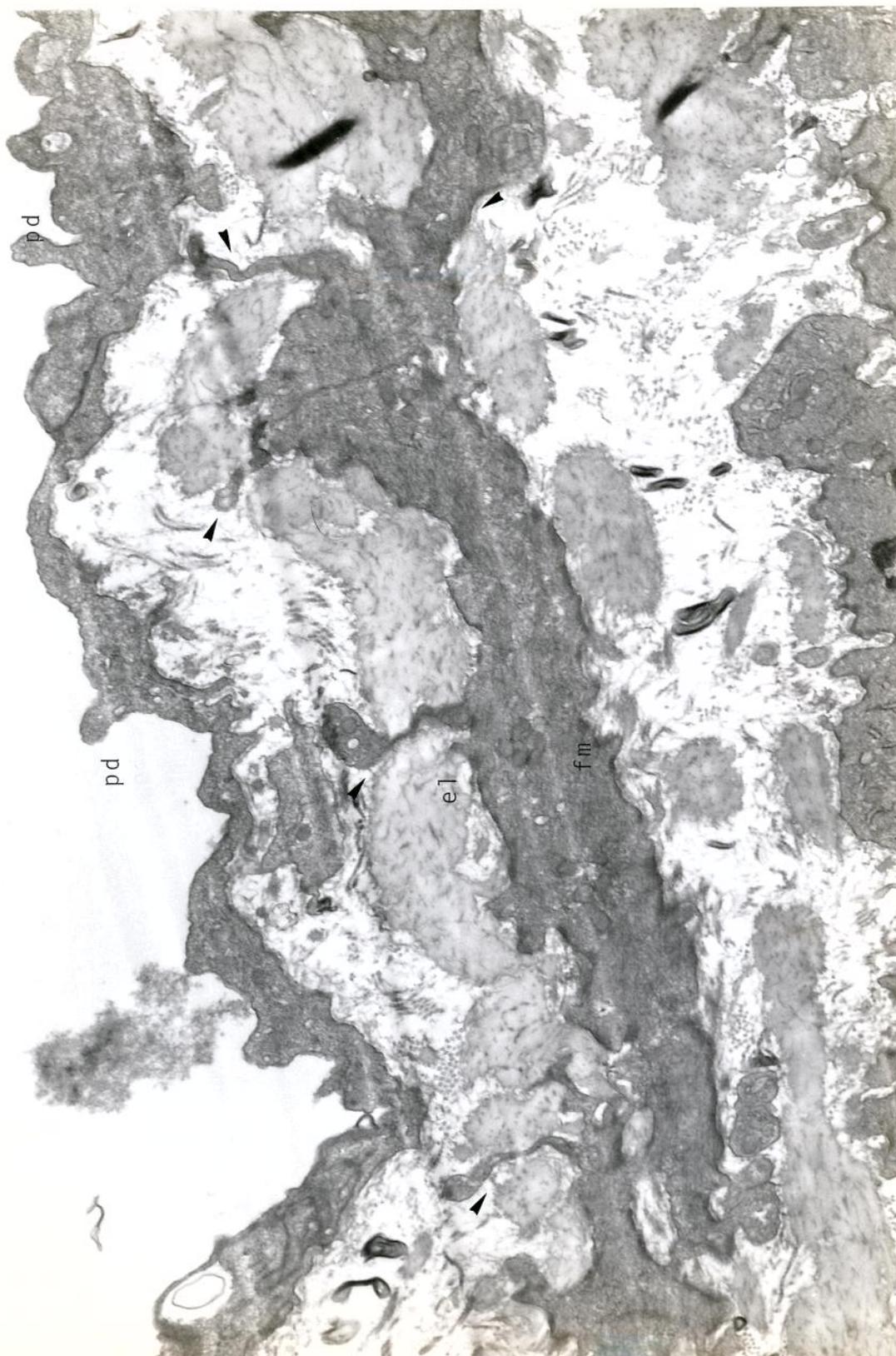


Fig. 30 - Coelho nº 9, arco menor. Endotélio com projeções digitiformes para a luz e no espaço subendotelial observar finos prolongamentos da fibra muscular lisa (setas) atravessando fendas da lamela elástica (negativo 1110 - 17500X).

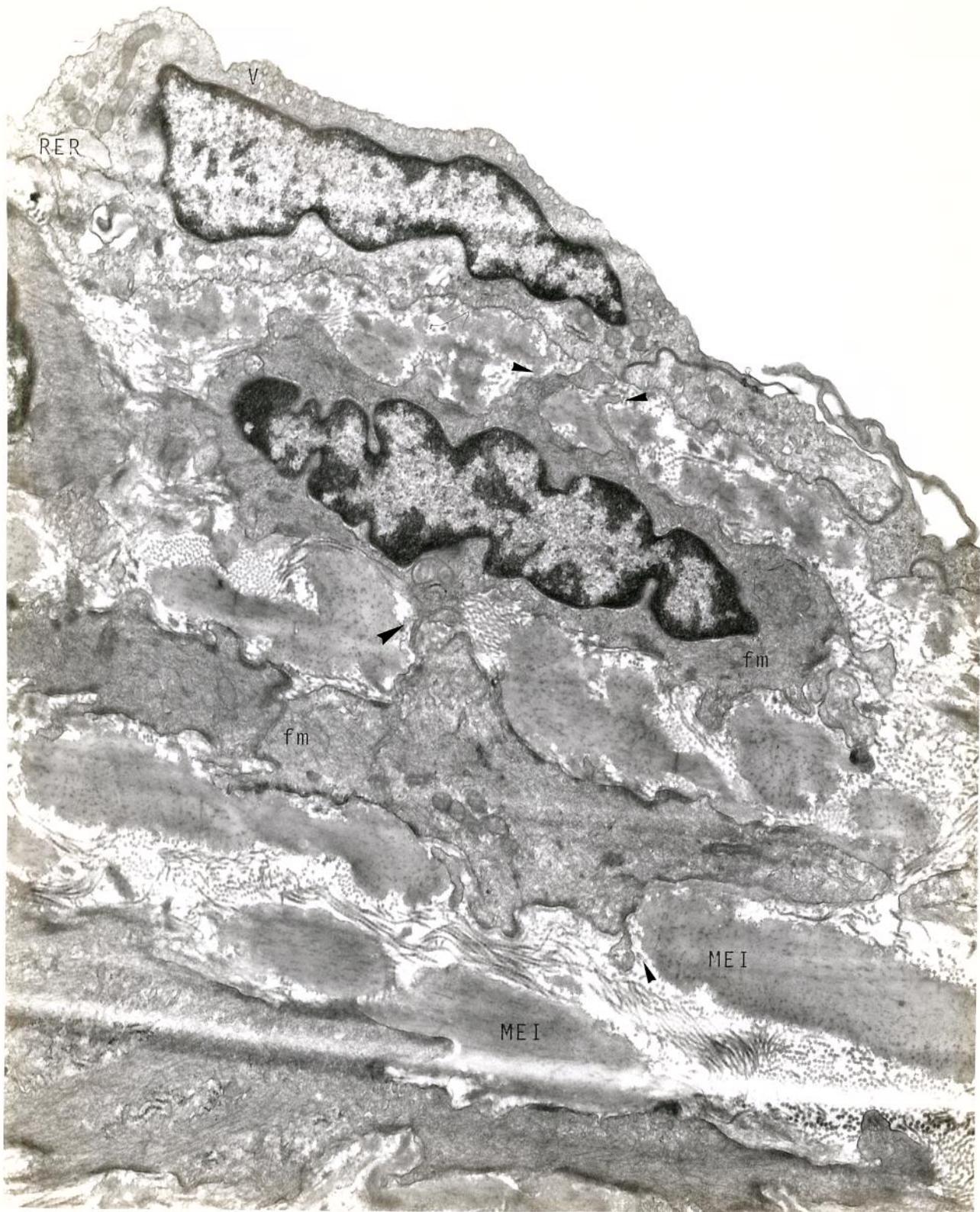


Fig. 31 - Coelho nº 10, arco maior. Observar a célula endotelial com suas organelas, fibra muscular lisa do espaço subendotelial com prolongamentos finos (seta) e fibra muscular lisa atravessando as fendas das lamelas elásticas (setas). Neste campo o espaço subendotelial não tem aspecto edematoso e a membrana elástica interna aparece duplicada (negativo 1415 - 20000X).

IV - DISCUSSÃO

1. ASPECTOS MACROSCÓPICOS E DO AZUL DE EVANS

A coloração da íntima pelo azul de Evans mostrou algumas peculiaridades. Segundo os vários trabalhos da literatura que relacionam as áreas mais permeáveis ao corante como predispostas a aterogênese (Bell *et alii*, 1972; Caplan *et alii*, 1973 e 1974; Bjorkerud, 1975, Gerrity e Schwartz, 1977; Tanimura *et alii*, 1980; Kjeldsen e Thomsen, 1981), esperávamos encontrar áreas focais nitidamente mais azuladas, principalmente na região do arco aórtico e óstios de ramos, mas isto não aconteceu.

Nos 7 animais submetidos à coloração vital observamos uma coloração leve e difusa em toda a aorta e raras áreas focais pouco nítidas coradas de azul mais acentuado. Apenas a região da valva aórtica estava nitidamente mais corada em todos os animais. O arco aórtico não se corou em 4 dos 7 animais (57%). A aorta ascendente foi a que se apresentou mais frequentemente corada (5 dos 7 animais), em áreas de limites pouco precisos e de intensidade variável. A região da curvatura menor do arco aórtico corou-se em apenas 3 dos 7 animais, sendo que destes, em apenas um (Fig. 3) a coloração era mais forte e com limites nítidos. Os óstios de ramos foram raramente corados e em um dos animais (coelho nº 6), estavam com tonalidade até mais clara que a parede da aorta adjacente.

À primeira vista, os nossos resultados parecem ser conflitantes com os trabalhos da literatura especialmente os de Gerrity *et alii* em suínos, em 1977, e Kjeldsen e Thomsen, em 1981, em coelhos. Estes dois últimos autores descrevem as áreas azuis nos

animais normais, principalmente localizadas na aorta ascendente, arco aórtico e óstios de ramo. Gerrity *et alii* estudaram 18 animais e Kjeldsen e Thomsen 14, e não descrevem as áreas de coloração azul separadamente, mas fazem um diagrama constituído pela somatória das áreas coradas nos diferentes animais, encontrando o predomínio nas localizações já referidas.

Se formos considerar desta forma, apesar do nosso menor número de animais (sete) injetados com o azul de Evans, as áreas que se coraram foram principalmente as da aorta ascendente e curvatura menor do arco aórtico, levando-se em conta a pouca intensidade de coloração e a demarcação imprecisa. Assim, quando surgiram áreas coradas no nosso material, estas foram localizadas de preferência nas regiões correspondentes às mais frequentes dos outros autores (Gerrity *et alii*, Kjeldsen e Thomsen). Deve porém ser novamente enfatizado que não encontramos áreas nitidamente demarcadas ao exame macroscópico e sim, leve coloração azul que aumentava de intensidade e se perdia pouco a pouco nas adjacências, tornando difícil um mapeamento fiel. Apenas no coelho nº 7 a demarcação foi nítida na curvatura menor do arco aórtico. A região da curvatura maior do arco aórtico corou-se focalmente em 2 animais, junto aos óstios de ramos.

Por outro lado, Armstrong *et alii* em 1978 e Adams em 1981 não encontraram correlação entre as áreas azuis e as estrias gordurosas na íntima da aorta de animais com hipercolesterolemia. Armstrong, citando Wissler comenta que "as áreas azuis frequentemente não apresentam qualquer lesão aterosclerótica e que as áreas lesadas pela aterosclerose também ocorrem com frequência em locais que não são azuis". Portanto, o corante estaria apenas marcando as áreas de maior permeabilidade a macromoléculas, como as dos complexo albumina-corante. O trabalho de Friedman e Byers de

1963, sobre permeabilidade endotelial, mostra que as alterações histológicas iniciais em coelhos com hipercolesterolemia, ocorriam em áreas que não captam o azul de Evans. Adams, em 1981, enfatiza que o azul de Evans é excelente para a coloração do elástico e, em trabalhos onde é feita a de-endotelização (Stemerman *et alii*, 1977; Christensen e Chemitz, 1983), as áreas sem endotélio se coram de azul, indicando que o endotélio normal é uma barreira à captação do corante e a tonalidade azul da área lesada evidencia a coloração das fibras elásticas subendoteliais pelo azul de Evans.

Gammal, em 1979, estudando a captação do corante em aortas de ratas demonstra nos 8 controles normais, áreas de coloração azul, de intensidade variável, geralmente leve, preferencialmente localizadas na aorta ascendente e arco aórtico. Em dois de seus animais, a região do arco também não se corou e seus esquemas de coloração assemelham-se aos dos nossos resultados.

Desta forma, ainda podemos considerar o corante azul de Evans como um indicador para alterações da permeabilidade intimal porém, de valor duvidoso como um marcador absoluto de alterações da permeabilidade, que evidenciem lesão celular. Em outras palavras, podemos ter áreas coradas que são morfologicamente ora alteradas ora normais, e áreas não coradas que também desenvolvem aterosclerose. Entretanto é mais frequente que, quando existem células endoteliais íntegras morfológica e funcionalmente, as áreas não se coram. (Bjorkerud, 1972; Stemerman *et alii*, 1977).

Devemos, portanto dar um valor relativo à coloração pelo azul de Evans como indicador de áreas predispostas à aterogênese. Acreditamos que se o número de animais por nós estudado fosse maior, conseguiríamos demonstrar maior frequência das áreas coradas. Porém, em números absolutos e examinando as colorações

de cada animal separadamente, notamos que as áreas não se repetem em todos os animais. O significado deste dado é importante no sentido de se distinguirem duas possibilidades:

1.^a) se temos áreas coradas estas são realmente mais permeáveis às macromoléculas e podem apresentar ou não lesão morfológica da célula endotelial. Segundo Kjeldsen e Thomsen, em coelhos normais, este aumento da permeabilidade estaria mais relacionado às áreas que apresentam o glicocálice menos espesso e à renovação das células mais acentuada, devida às condições fisiológicas especiais da corrente sanguínea a que estas áreas de curvatura estão submetidas. Se por outro lado, não conseguimos no nosso trabalho, nestas áreas azuis demonstrar alterações morfológicas, pode estar havendo algum distúrbio funcional da célula, não revelável morfológicamente, que leve à maior captação do corante.

2.^a) a ausência de coloração não exclui a possibilidade da área em desenvolver a aterosclerose, pelos agentes aterogênicos.

Portanto, a importância das áreas de captação do azul de Evans para desenvolver a aterosclerose é relativa, apesar de estatisticamente se demonstrar que elas sejam a sede mais frequente de desenvolvimento da aterosclerose.

Explica-se a coincidência de localização das áreas de aterosclerose com as coradas pelo azul de Evans pela relação entre o fluxo sanguíneo e a parede arterial. Os trabalhos de Texon (em 1974) de Bergel *et alii*, 1976, de Nerem e Cornhill, 1980, de Tanimura *et alii*, 1980 e Joris *et alii*, 1982, sobre hemodinâmica e aterogênese demonstram a complexidade das leis físicas que regem o fluxo sanguíneo nas artérias. O difícil conhecimento deste fluxo é devido a inúmeros fatores variáveis: os vasos não são rí-

gidos, variam o seu diâmetro, a velocidade não é contínua, a natureza do fluxo é pulsátil, o calibre progressivamente diminui, existe turbulência, o sangue não é de natureza homogênea, etc. Estes e outros fatores podem interagir resultando um padrão de fluxo extremamente complexo.

Entretanto, segundo Texon (1974) o que existe constantemente, em todos os locais predispostos a desenvolver placas de aterosclerose é uma pressão focalmente diminuída produzida pelas forças geradas pelo fluxo do sangue. Numa figura do citado trabalho, aqui reproduzida (Fig. 32), vemos que num arco, a região da curvatura menor é submetida a uma pressão menor que a da correspondente curvatura maior. Segundo a sua interpretação, esta pressão focalmente reduzida seria o estímulo comum inicial que levaria às respostas biológicas reacionais da parede do vaso. Teríamos portanto, áreas focalmente distribuídas onde haveria pela pressão reduzida associada ao fluxo pulsátil, uma força de sucção de íntima. A íntima submetida a este efeito reagiria de forma diferente de outras regiões. Apesar desta explicação ser principalmente mecânica, não podemos nos esquecer que a parede arterial é um tecido de alta reação e esta pode dar-se em diferentes níveis. Segundo Nerem, em 1980, o fluxo poderia provocar simplesmente lesão mecânica do endotélio, ou influenciar o transporte de substâncias através da parede arterial, promover focos de hipóxia, alterar as reações bioquímicas intra-celulares, ou ainda influenciar algum fator não conhecido.

Outra hipótese, investigada no fim do século passado e muito estudada por Lopes de Faria é o papel da camada média no desenvolvimento das diversas alterações da íntima, que caracterizam a aterosclerose (Lopes de Faria, 1955, 1961, 1962). Segundo os seus trabalhos, após as lesões da camada média, desenvolve-se

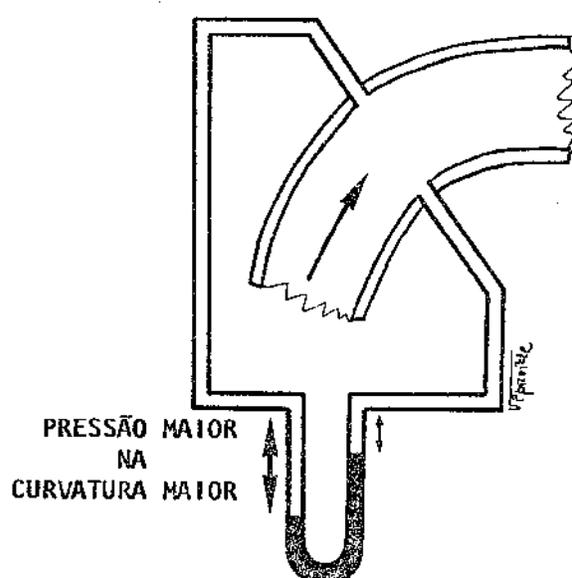


Fig. 32 - Em movimento curvilíneo, a pressão lateral é mais alta ao longo da região mais externa da parede (curvatura maior) e mais baixa na região mais interna (curvatura menor), própria da força centrífuga efetiva. TEXON, M. Med.Clin North Am 58 (2): 257-268, 1974.

o quadro da aterosclerose, que é designada secundária, por ser de causa conhecida (choque, hipóxia). Apesar de ser secundária, as lesões desta aterosclerose são iguais às da aterosclerose primária ou comum.

Todas estas são hipóteses que têm sido investigadas pelos diferentes autores. Acreditamos que, embora não totalmente esclarecida, a interação destes diversos fatores levará a condições especiais de equilíbrio destas áreas nos animais normais e, quando submetidos aos fatores aterogenéticos, sejam mais vulneráveis e apresentem precocemente o desenvolvimento das lesões ateroscleróticas.

Observando os nossos resultados, apesar de serem poucas as áreas coradas pelo azul de Evans na curvatura menor, elas foram mais frequentes do que na curvatura maior. No entanto, não houve diferença em microscopia óptica e eletrônica entre as áreas coradas e as não coradas.

Não fizemos o estudo com a coloração pelo vermelho de Rutênio para os mucopolissacarídeos do revestimento endotelial (glicocálice), mas ou não encontramos alterações em microscopia eletrônica ou encontramos sinais sugestivos de lesão celular focal, em ambas as áreas estudadas. Desta forma concluimos que coelhos adultos normais injetados com azul de Evans mostram raras áreas pouco coradas, localizadas preferencialmente na aorta ascendente e na região da pequena curvatura do arco aórtico. A morfologia destas áreas azuladas na curvatura menor do arco, comparada com a das áreas não coradas desta curvatura e da curvatura maior, não mostrou diferenças expressivas, o que nos leva a concordar com o conceito de Giacomelli e Wiener (1974) de que a diferente permeabilidade ao corante não tem base morfológica nos métodos utilizados e é resultante de um transporte fisiológico e não patológico, específico destas áreas.

2. ASPECTOS MORFOLÓGICOS EM MICROSCOPIA ÓPTICA

A microscopia óptica, em cortes de parafina e em cortes semi-finos da eletrônica, é melhor, pela visão panorâmica, para distinguir a MEI e as áreas de espessamento intimal.

2.1. Membrana elástica interna

Tivemos dificuldades para delimitar a íntima. Por isto, precisamos definir o que é a membrana elástica interna. Um dos poucos trabalhos que definem a membrana elástica interna (MEI) é o de Biering e Kobayasi (1963) e a conceituam como a primeira lamela elástica mais espessa que surge a partir da camada endotelial. Usando este conceito, desde o início notamos que nesta região do arco aórtico, a MEI não era um elemento facilmente distinguível, sendo praticamente indistinta na maioria dos fragmentos, mesmo nas colorações especiais para elástico. Verificamos pelos nossos resultados que uma MEI nítida só pode ser encontrada em 2 dos 10 animais (coelhos nºs 5 e 10). Na maioria das vezes havia dificuldades em reconhecê-la pois nenhuma lamela se destacava entre as outras, de forma contínua.

Na verdade, o que conseguimos observar foram trechos em que havia na espessura da parede, uma primeira camada de elástico mais espessa porém, descontínua, que frequentemente se decompunha, como que se bifurcando em lamelas mais finas (Fig. 4, 8, 12), tornava a apresentar pontos de fusão e, em áreas se perdia totalmente entre as outras lamelas. Se a estes aspectos morfológicos pudermos denominar membrana elástica interna, então concluiremos que no arco aórtico, a MEI se comporta de maneira diferente na sua apresentação, da observada em outros trechos da aorta e nas

artérias musculares. Isto portanto pode ser uma característica peculiar deste segmento inicial da artéria elástica mais calibrosa.

A caracterização da MEI apresentou a mesma dificuldade tanto na região da curvatura menor, quanto na maior do arco aórtico. Nos dois animais onde a MEI foi nítida, também não houve diferença pois a nitidez ocorria em ambos os segmentos.

Estes dados estão de acordo com Benninghoff (1930) ao dizer que na aorta, o limite entre a íntima e a média é difícil de se estabelecer ou pode faltar em certas áreas, por causa da dificuldade em se reconhecer a MEI, que se confunde com as lamelas elásticas da média ou com as da íntima.

Mais recentemente, Stout e Thorpe (1980), estudando a morfologia da aorta em primatas, relatam que uma MEI bem definida não está presente nos segmentos superiores da aorta, tornando-se entretanto evidente ao nível da aorta abdominal.

As dificuldades em reconhecer a MEI podem ser atribuídas ao caráter dinâmico de sua formação. Isto é, com o crescimento da aorta e com a idade, surgiriam para dentro da primeira MEI fibras elásticas mais finas, que aos poucos vão se engrossando até adquirir o caráter de uma nova MEI, enquanto que a mais antiga se incorporaria à camada média. Portanto, no processo de crescimento da aorta haveria o crescimento em comprimento e o em espessura. Este seria feito à custa do chamado espessamento intimal que se transformaria aos poucos em camada média. Esta hipótese, formulada por Lopes de Faria (1965 b), encontra apoio neste trabalho. Realmente, em microscopia óptica é nítido o aparecimento de finas fibras elásticas abaixo da camada endotelial, que vão se espessando cada vez mais até adquirir a grossura de lamelas da média tendo de permeio as fibras musculares lisas. Deste modo, o tecido neoformado na íntima adquire pouco a pouco a estrutura da camada mé-

dia e é desta indistinguível. Assim, compreende-se a mudança de posição da MEI, ora na superfície, ora na profundidade, ora bem formada e distinta, e ora em formação e indistinta.

Por isto, propomos o conceito de membrana elástica interna como estrutura dinâmica e mutável, variável com o crescimento arterial e, ainda não referido na literatura.

2.2. Espessamento intimal difuso

Já está bem estabelecido na literatura que a espessura da íntima da aorta aumenta com o crescimento e com a idade (Lopes de Faria, 1965 b; Geer e Haust, 1972).

Em diferentes espécies animais este espessamento pode começar a surgir muito precocemente, mesmo na vida intra-uterina e segundo Wolkoff, citado por Geer e Haust (1972), quanto maior o porte do animal, tanto mais cedo começa o espessamento intimal.

O espessamento intimal é chamado de difuso porque ocorre em todo o perímetro da artéria mas, é de início focal (Lopes de Faria, 1965 b) e não tem a mesma espessura difusamente (Geer e Haust, 1972).

As áreas de espessamento intimal mais acentuado localizam-se, segundo a literatura, principalmente nos locais submetidos ao maior "stress" pelo fluxo sanguíneo e são frequentemente as áreas de lesões iniciais da aterosclerose (Willens, 1951; Lopes de Faria e Faria, 1971; Bell *et alii*, 1972; Jorgensen *et alii*, 1972).

Portanto, alguns autores passam a considerar tais espessamentos como lesões precursoras da aterosclerose.

Examinando os nossos resultados observamos que nos diferentes animais, o espessamento intimal sempre existiu, nas duas áreas estudadas, em menor ou maior intensidade, apesar do grupo

etário dos animais ser o mesmo.

Também, numa mesma região (curvatura menor ou maior) de um dado animal, podíamos encontrar espessamentos irregulares da íntima.

Voltando aos dados da tabela 1, notamos que as áreas da íntima mais espessas se distribuíram da seguinte forma: em 3 animais ocorreram na região da curvatura menor do arco aórtico, em outros 3 na curvatura maior e em 4 animais a espessura era semelhante em ambas as áreas estudadas. Esta distribuição do espessamento intimal mais acentuado, em animais adultos normais, não mostra entre as áreas estudadas, nenhuma prevalência. Estes nos dados estão de acordo com o trabalho de Stout e Thorpe, de 1980, que também não encontram predominância de áreas de maior esspessamento em nenhuma região particular da aorta.

Concordamos com os autores que afirmam que o esspessamento intimal em si não deve ser uma lesão precursora da aterosclerose e sim, deve fazer parte do desenvolvimento normal da parede da artéria (Lopes de Faria, 1965 b; Geer e Haust, 1972; Woolf, 1978, Restrepo *et alii*, 1979).

Como os espessamentos da íntima são irregulares, admite-se que haja um estado de adaptação da parede da artéria, nestes diferentes locais, às condições próprias do fluxo. É interessante que possa ocorrer o mesmo espessamento em condições patológicas, após a lesão da camada média como demonstram os diversos trabalhos de Lopes de Faria, realizados no coelho (1955, 1962) e no homem (1961, 1963, 1965 b). O interesse dos seus trabalhos está justamente em chamar atenção para o espessamento da íntima secundário às lesões da camada média e seu papel na aterogênese. Neste caso, tal espessamento é portanto patológico, como indicam os dados experimentais, em oposição ao espessamento difuso fisiológico.

Na literatura não se faz distinção entre um e outro espessamento.

Não verificamos que a curvatura menor do arco aórtico, área que apresentou depósitos lipídicos precoces (Lopes de Faria e Faria, 1971) seja mais espessa que a curvatura maior.

Desta forma, as duas áreas são morfologicamente muito semelhantes e a explicação para o depósito ter ocorrido mais precocemente na curvatura menor, não tem base morfológica neste estudo.

Um trabalho interessante de Subiah, Deitemeyer e Yunker, de 1981, estudando a susceptibilidade regional da aorta em desenvolver a aterosclerose, encontra em pombos uma área de espessamento intimal congênito, que nunca progride para lesão aterosclerótica. Estuda bioquimicamente esta área em relação a outras e encontra diferenças quanto às concentrações de prostaglandinas. Deste trabalho concluímos que o espessamento intimal sozinho não é fator causal ou desencadeante do depósito aterosclerótico e há necessidade de fatores adicionais para que ocorra.

3. DADOS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA

3.1. Aspectos gerais

A apresentação conjunta dos resultados a nível de microscopia eletrônica já demonstra claramente a semelhança dos achados em ambas as áreas estudadas.

Não conseguimos verificar, pelo exame minucioso das múltiplas fotos de microscopia eletrônica, sinais que distinguissem esta ou aquela região.

Os trabalhos que estudam animais normais, sempre fazem a comparação das áreas coradas pelo azul de Evans com as áreas

não coradas e acham diferenças morfológicas mais ou menos acentuadas, a nível ultraestrutural, entre as regiões coradas e não coradas. Dentre eles, destaca-se o trabalho de Gerrity *et alii*, em 1977, que nas áreas coradas de suínos normais encontra: variação da forma da célula endotelial, glicocálice menos espesso, configuração menos complexa das junções, espaço subendotelial mais espesso e mais edematoso e várias outras alterações relacionadas com lesão da célula endotelial.

Kjeldsen e Thomsen, em 1981, estudando coelhos normais também encontra algumas alterações entre as áreas coradas e não coradas, porém não tão pronunciadas quanto às descritas por Gerrity. Salientam que não encontraram diferenças nas junções de ambas as áreas e que a lâmina basal do endotélio era cerca de duas a três vezes mais espessa nas regiões não coradas. Comentam também, apoiando os nossos resultados, que uma demarcação morfológica nítida não ocorre entre as áreas coradas e não coradas, pois aspectos morfológicos encontrados nas áreas coradas também foram observados nas não coradas e vice-versa.

Imai *et alii*, em 1982, estudando a captação do azul de Evans e a ultra-estrutura da aorta abdominal de suínos normais e ateroscleróticos, encontraram apenas diferenças quanto à continuidade da lâmina basal, que se apresentou mais descontínua e menos desenvolvida nas áreas azuis e nas áreas com lesão aterosclerótica.

No nosso trabalho, como raramente as áreas foram coradas, comparamos a morfologia da curvatura menor com a da maior do arco aórtico, independente delas se apresentarem coradas ou não. Desta forma fica difícil compararmos o nosso resultado com de outros autores, que estudaram especificamente área corada *versus* não corada.

Entre os diferentes componentes da íntima estudados, apenas observamos na comparação das duas áreas entre si (curvatura menor e maior do arco aórtico), uma certa predominância de maiores espessamentos da lâmina basal, na região da curvatura maior do arco aórtico. A membrana ou lâmina basal sempre se apresentou nos 2 segmentos como uma estrutura descontínua, de espessura irregular, com espessamentos focais mais pronunciados. Em 3 dos 10 animais a maior espessura da lâmina basal ocorreu na região da curvatura menor; em 5 deles, predominou na curvatura maior e nos outros 2, a espessura era semelhante nas duas áreas estudadas. Se este maior espessamento da lâmina basal focalmente possa interferir com os processos de menor permeabilidade regional, não podemos inferir, mas é um dado que deve ser mais investigado.

Os outros aspectos da ultra-estrutura ocorreram igualmente nas duas regiões estudadas e merecem discussão quanto ao seu significado ou interpretação.

3.2. Endotélio

As células endoteliais apresentaram-se achatadas, leve ou moderadamente proeminentes na luz, com a forma mais alongada ou mais cubóide. Na superfície luminal frequentemente observamos prolongamentos digitiformes para a luz (Fig. 15, 30). Estas pequenas variações da forma da célula foram atribuídas a diferente estado de contração celular, que poderia ocorrer em condições normais ou também como alteração pelo fixador perfundido (Majno e Joris, 1978).

Membranas citoplasmáticas soltas na luz e mais raramente figuras mielínicas foram encontradas e podem tanto significar sinal de lesão celular (Joris *et alii*, 1982), como ser decorrentes de artefatos pelo processo de fixação (Clark e Glagov, 1979 ;

Garbarsh *et alii*, 1982).

O endotélio apresentou-se geralmente íntegro, sem alterações importantes. Em alguns animais havia áreas focais sem endotélio ou com arrancamentos parciais da célula endotelial, sem que esta demonstrasse qualquer sinal de sofrimento celular ou qualquer adesão plaquetária na superfície. Portanto, estas imagens foram interpretadas como artefatos decorrentes das várias fases do processamento do material (Junqueira e Salles, 1975).

Foram considerados sinais indicadores de lesão da célula endotelial: mitocôndrias tumefeitas e dilatação acentuada do retículo endoplasmático rugoso (Kjeldsen e Thomsen, 1975; Ghadially, 1977). Em apenas dois animais (coelhos n^os 1 e 3) observamos tais alterações e, talvez coincidentemente, foram os que apresentaram um processo difícil de anestesia, reagindo bastante. Interpretamos estes sinais de lesão endotelial como consequentes ao curto período de sofrimento do animal, antes da fase de perfusão do fixador. Algum grau menor de dilatação do retículo endoplasmático rugoso existiu com frequência nos diferentes animais, porém sem outras alterações importantes, e portanto isto não foi por nós considerado como sinal de lesão celular.

Um sinal frequentemente visto no nosso material e de significado não esclarecido foram áreas de menor densidade do citoplasma endotelial, mais comumente localizadas na base ou na região para-juncional da célula (Fig. 15, 16). Svendsen e Jorgensen, em 1978, relatam áreas de maior ou menor densidade eletrônica relacionando-as à lesão da célula endotelial. Interrogamos se no nosso material, isto seria decorrente da perda focal de organelas por lesão celular ou consequente à contração dos filamentos do citoesqueleto, com afastamento das estruturas contidas nesta região. Como foi um achado frequente, sem outros indícios de lesão, acre-

ditamos mais na segunda hipótese.

Outro achado que chamou a atenção foi a raridade do encontro dos corpos de Weibel-Palade em nosso material. Conseguimos identificar esta organela em poucas células endoteliais, quando esperávamos encontrá-la frequentemente, pois é descrita como característica de célula endotelial (Ghadially, 1977, Jellinek *et alii*, 1982; Simionescu, e Simionescu, 1984). Entretanto, segundo Majno e Joris (1978), ainda há muitas controvérsias sobre esta organela, que não se distribui igualmente nas células endoteliais de diferentes vasos do mesmo animal ou de espécies diferentes. Conforme Escoubet e Dosne (1979), os corpúsculos de Weibel-Palade são mais frequentes nos vasos da circulação pulmonar do que na sistêmica.

Quanto aos prolongamentos citoplasmáticos do endotélio para espaço subendotelial, podemos interpretá-los como decorrentes de contração celular (Stetz *et alii*, 1979) e promotores da íntima aproximação das células endoteliais com as células do subendotélio. Geer e Haust (1972), porém também os consideram como resultantes de artefato por contração do vaso pelo fixador.

3.3. Junções intercelulares

Sabemos que o transporte de substâncias através de parede do vaso se faz por duas vias, conforme a natureza do material a ser transportado: 1º) através da própria célula endotelial, por pinocitose; 2º) através das junções (Huttner *et alii*; 1973; Ghadially, 1977; Majno e Joris, 1978).

Alguns trabalhos mostram variados tipos juncionais normais ou lesão a nível das junções, em áreas distintas da aorta de animais normais, tentando correlacionar estes dados com a maior

permeabilidade endotelial (Gerrity *et alii*, 1977). Outros autores entretanto, também estudando animais normais, não conseguem demonstrar alteração nas junções, em diferentes áreas da aorta (Kjeldsen e Thomsen, 1981; Imai *et alii*, 1982).

Em nosso material, as junções entre as células endoteliais apresentaram tipo variado, mas o mais frequente foi a prega interdigitada, de complexidade variável, onde se distingue nitidamente um espaço intercelular. Encontramos frequentemente, junções muito complexas, com imagens em "dedos de luva", demonstrando a extensa superfície de adesão entre estas células e consequentemente tornando a camada endotelial uma estrutura fortemente coesa.

As junções comunicantes ("gap"), que resultam de uma diminuição do espaço intercelular e as junções oclusivas ("tight") onde há fusão dos folhetos externos das membranas celulares (Escoubet e Dosne, 1979; Simionescu e Simionescu, 1984), também foram observadas mas, focalmente e muito menos frequentemente. Em todos os animais as junções estavam íntegras, sem sinais de lesão e não houve diferenças nas duas áreas estudadas. Segundo diferentes autores, a frequência dos tipos juncionais é variável conforme estamos estudando capilares, veias ou artérias (Escoubet e Dosne 1979; Simionescu, 1984).

A predominância de junções do tipo pregas interdigitadas complexas caracterizou o nosso material e podemos concluir que nesta região do arco aórtico normal, este é o tipo juncional mais frequente. Interpretamos este dado da seguinte forma: a complexidade das junções aumentaria a superfície de troca entre as células endoteliais, bem como manteria uma boa adesividade entre elas aumentando a resistência ao forte jato de sangue lançado pelo coração na aorta. O espaço intercelular mais largo facilitaria a en

trada de nutrientes do sangue para o espaço subendotelial, visto que a íntima e parte da camada média não apresentam vasa-vasorum na aorta.

3.4. Espaço subendotelial

O espaço subendotelial (ESE) é a região que fica entre a membrana basal do endotélio e a membrana elástica interna (Legend *et alii*, 1979). Como já dissemos anteriormente, é difícil nas áreas estudadas do arco a distinção da membrana elástica interna e esta dificuldade também existe a nível ultra-estrutural, o que concorda com Moss e Benditt, em 1970. Os fragmentos examinados na microscopia óptica são muito maiores e permitem a observação de maior extensão das lamelas elásticas. Assim, detectamos a membrana elástica interna (MEI) em nível óptico e transferimos este dado para o exame das ultra-fotografias. Não encontramos maior espessura do espaço subendotelial em nenhuma das áreas estudadas, diferindo dos trabalhos de Gerrity *et alii* (1977) e de Kjeldsen e Thomsen (1981).

Como já foram discutidas a localização da MEI e as áreas de espessamento intimal em microscopia óptica, comentaremos agora os componentes do espaço subendotelial evidenciados na ultra-estrutura.

Os elementos não celulares do ESE são as fibras colágenas, elásticas, microfibrilas e a substância fundamental onde tais elementos estruturais estão contidos.

As fibras colágenas existem próximas da membrana basal da camada endotelial, das lamelas elásticas e entre as fendas das lamelas, em quantidade variável, de leve a moderada. Não houve diferença no comportamento do colágeno nos segmentos estudados.

A descontinuidade, a bifurcação e a fusão de lamelas elásticas, já descritas na microscopia óptica, são mais detalhadamente observadas na microscopia eletrônica. O que chama muito a atenção é o imbricamento, ou a íntima relação que existe entre as lamelas elásticas e as células musculares lisas do ESE, cujos prolongamentos frequentemente são vistos entre as fendas das lamelas elásticas (Fuzesi *et alii*, 1982; Jellinek *et alii*, 1982). Isso demonstra claramente a capacidade de migração das fibras musculares lisas entre as lamelas elásticas do subendotélio (Fig. 30, 31) e também da média para o espaço subendotelial (Geer e Haust, 1972). Ainda quanto às fibras elásticas, notamos que em alguns animais elas se apresentaram com características mais imaturas do que em outros. Desta forma, o componente microfibrilar evidente, que caracteriza as fibras elásticas jovens (Geer e Haust, 1972), era mais acentuado em alguns animais, em ambas as áreas, embora a idade de todos fosse a mesma. Disto podemos concluir que embora adultos, a neoformação de fibras elásticas prossegue. Somente o estudo de grande número de animais poderá demonstrar as feições mais comuns de cada grupo etário.

As microfibrilas são formadas por finos filamentos densos aos elétrons e estão mais concentrados nas proximidades da célula endotelial, dentro de uma zona pouco densa, considerada como a membrana basal. São vistas também associadas às lamelas elásticas, e menos densamente dispostas e dispersas em todo o espaço subendotelial. Segundo Escoubet e Dosne (1979) as microfibrilas são resistentes à colagenase mas, atacadas por proteases como a quimotripsina e, estudos histoquímicos evidenciam a sua natureza glicoproteica. Como constituinte de membrana basal do endotélio, encontramos áreas de espessamentos focais irregulares que, predominaram um pouco mais na curvatura maior do arco aórtico, como já

descrevemos. Também este material microfibrilar finamente disperso é melhor evidenciado nos animais onde encontramos um maior afastamento das estruturas do espaço subendotelial e designado no nosso trabalho como edema ou aspecto edematoso. Acreditamos que nestes casos, possa ou não existir um real aumento da quantidade das microfibrilas dispersas no espaço subendotelial. Entretanto é melhor a caracterização deste componente, devido ao maior contraste entre a substância fundamental de fundo, menos densa aos elétrons e as microfibrilas.

A substância de fundo que separa os elementos fibrosos e celulares do espaço subendotelial, não é demonstrada pelos métodos habituais de coloração em microscopia eletrônica e é manifestada pelo espaço claro, onde tais componentes estão dispersos. Corresponde à substância metacromática demonstrável em microscopia óptica pela coloração do azul de toluidina. É constituída de proteoglicanas, evidenciadas histoquimicamente (Legrand *et alii*, 1979). Sua quantidade varia de animal para animal. Denominamos aspecto edematoso ou edema, à qualidade mais clara e com evidente afastamento das estruturas do espaço subendotelial. Este edema foi graduado subjetivamente em leve, moderado ou intenso. Como apresentamos na tabela 1 houve animais que foram considerados sem edema (coelhos n^os 6, 7 e 10). Outros, em que o edema variava de leve a intenso no mesmo animal ou, em diferentes regiões de um dado animal. Na maioria dos casos, a variação era de leve a moderado e somente nos coelhos n^os 1 e 3 encontramos focalmente áreas de edema intenso. Como já referimos, estes mesmos animais apresentaram outros sinais de lesão (retículo endoplasmático rugoso muito dilatado e mitocôndrias tumefeitas) e portanto, acreditamos que este grau acentuado de edema do espaço subendotelial deva ser consequência de lesão celular, com maior entrada de água para o espaço

subendotelial, onde focalmente há formação de verdadeiras bolhas subendoteliais, principalmente vistas na região da curvatura maior do coelho nº 1. Este aspecto de edema intenso, formando imagens sugestivas de bolhas também foi descrito por Svendsen e Jorgensen, em 1978, como sinal de lesão. Como já comentamos, nestes dois animais houve dificuldade anestésica e estas lesões provavelmente ocorreram no pequeno período de sofrimento dos animais, que precedeu a fixação por perfusão. Os graus leve ou moderado do edema foram muito frequentes (coelhos nºs 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9) e concluimos que seriam simples variações do normal, encontradas no espaço subendotelial.

Os elementos celulares predominantes no espaço subendotelial são as fibras musculares lisas. Além destas células bem caracterizadas encontramos raríssimos fibroblastos e outras células menos características, ou pouco diferenciadas, de natureza discutível. Estas células pouco diferenciadas podem ser ainda subdivididas em 2 categorias: a) células que lembram as fibras musculares lisas em alguns dos seus aspectos; b) células que se assemelham às da linhagem sanguínea, como monócitos.

Desta forma, verificamos que a fibra muscular lisa não é o único elemento celular identificado no espaço subendotelial, embora seja o principal. Estes dados apoiam o trabalho de Lopes de Faria (1970), que estudando em microscopia óptica a aorta de coelhos após o choque, descreve células indiferenciadas no subendotélio, células musculares imaturas e que aos poucos sofrem diferenciação para fibra muscular lisa característica. Em microscopia eletrônica, vários trabalhos discutem a natureza e a origem das células encontradas na íntima. Imai *et alii*, em 1970, estudando o espessamento intimal conclui que quem se divide é a própria fibra muscular lisa e não uma célula indiferenciada. Poole *et alii* em 1971,

pesquisando a origem das fibras musculares na íntima, nota que a população celular predominante é de fibra muscular lisa típica e interroga se os outros tipos celulares raros seriam diferentes formas de apresentação do mesmo tipo básico da célula. Fala também da provável migração de células de média para a íntima. Geer e Haust (1972), descrevem estas células menos diferenciadas como fibras musculares lisas modificadas, considerando-as como diferentes graus de diferenciação da fibra muscular, implicada nos processos de crescimento de parede arterial. Campbell e Chamley-Campbell (1981), através de estudos com cultura de células musculares lisas arteriais, descrevem duas variedades da célula muscular lisa, decorrentes do que eles chamam de modulação fenotípica: 1º) fibra em estado contrátil (tipo morfológico característico) e 2º) fibra em estado sintético (com alguns elementos que sugerem a natureza muscular, mas com retículo endoplasmático rugoso proeminente, devido à grande capacidade de síntese desta célula). Estas variedades seriam segundo Campbell, adaptações celulares às demandas funcionais necessárias ao crescimento e processos reparativos na parede da artéria.

A variedade denominada sintético, também aparece na literatura com outros nomes: secretório-contrátil, fibra muscular modificada e célula miointimal (Somlyo, 1975). Segundo Ghadially, (1977), deveríamos denominá-la de célula mesenquimatosa multi-funcional, que se assemelha às fibras musculares lisas, termo descritivo, porém, segundo ele, mais adequado a este tipo celular peculiar, que tem potencialidades funcionais muito diferentes de qualquer outra fibra muscular lisa.

Gabbiani *et alii*, em 1981, também propõem que as fibras musculares lisas vasculares sejam células diferentes das outras fibras musculares lisas, pois mostram variação na composição e predominância de certos elementos contráteis e do citoesqueleto.

Kocher *et alii*, em 1984, estudando as fibras musculares lisas da aorta de ratos normais, encontram diferenças entre as fibras musculares da média e as da íntima. Referem em algumas fibras musculares intimais predominância do retículo endoplasmático rugoso, do aparelho de Golgi e menor quantidade de microfilamentos. Pelos seus resultados, eles consideram como fibras musculares estes tipos morfológicos intermediários, que nós chamamos de menos característicos, mas que lembram em alguns de seus aspectos as fibras musculares lisas.

Desta forma, analisando os nossos resultados em comparação com os de diversos autores, acreditamos que as chamadas células indiferenciadas descritas em microscopia óptica por Scott (1967) e por Lopes de Faria (1970), sejam realmente estas que em microscopia eletrônica são pouco diferenciadas mas mostram alguns elementos que sugerem a sua natureza muscular. Como são células pouco diferenciadas concordamos com Geer e Haust que devam ser as células progenitoras das fibras musculares, ou seja, células ainda não totalmente maduras, em diferente fase de diferenciação, responsáveis por maior síntese, dada a predominância das organelas por elas apresentadas. Se poderiam representar um estado de desdiferenciação de uma fibra muscular madura devido às exigências do meio, como Campbell e Chamley-Campbell sugerem, em 1981, não temos elementos para afirmar.

Podemos ainda admitir que tais células sejam provenientes tanto da própria íntima, como acha Lopes de Faria (1970) como da média pois, de acordo com o nosso material o interrelacionamento das fibras musculares com as lamelas elásticas é evidente. Prolongamentos celulares são vistos frequentemente, como pseudópodos, atravessando as fendas do elástico, comprovando assim, a capacidade de migração desta célula muscular lisa. Estes prolongamentos

celulares são vistos tanto nestas células menos diferenciadas quanto nas fibras musculares lisas típicas, indicando que a diferenciação não é obstáculo à mobilidade celular neste caso. Tais prolongamentos da célula muscular dão origem a imagens variadas de estruturas conhecidas como porções celulares ou corpos fantasmas (Stetz *et alii*, 1979; Fuzesi *et alii*, 1982), pois pela migração, a célula perde parte do seu citoplasma, o qual vai progressivamente sofrer degeneração, até se transformar em detritos celulares e ser absorvido. No nosso material observamos porções celulares com estruturas características de fibras musculares lisas e outros mais degenerados, com restos de organelas ou grandes vacúolos (Fig. 17, 19, 22).

Concluindo, observamos que a íntima da aorta de coelhos adultos normais apresenta uma população celular morfológicamente variada, constituída em sua grande maioria por células musculares lisas típicas, raras células semelhantes a fibroblastos, raríssimas células semelhantes aos monócitos do sangue e por ocasionais células pouco diferenciadas com alguns elementos ultrastruturais que lembram os da fibra muscular lisa.

Acreditamos que os elementos semelhantes aos monócitos vistos num único animal, tenham origem sanguínea, pois foram encontrados muito próximos ao endotélio, como se fosse um evento esporádico na população subendotelial.

As outras células menos diferenciadas representam uma gama de variantes morfológicas que devem ser as precursoras das fibras musculares lisas maduras e talvez também das células semelhantes a fibroblastos. Desta forma poderíamos chamá-las de células mesenquimatosas multifuncionais, como sugere Ghadially, em 1977, entendendo-a como um tipo especial de célula, peculiar à constituição e às necessidades da parede dos vasos.

V - RESUMO E CONCLUSÕES

No estudo da aterosclerose inúmeros trabalhos na literatura têm contribuído para o entendimento desta doença de âmbito mundial, frequente e de grande complexidade. O conhecimento dos aspectos morfológicos normais das diferentes artérias e de seus segmentos é imprescindível para podermos separar as variações fisiológicas daquelas realmente patológicas. Baseando-se nos resultados anteriores do trabalho de Lopes de Faria e Faria (1971) que encontraram os primeiros depósitos lipídicos na curvatura menor do arco aórtico, em coelhos submetidos a leve hipercolesterolemia de curta duração, o objetivo do presente trabalho foi estudar os aspectos morfológicos da íntima da aorta de coelhos adultos normais, na referida região, comparando-os com a íntima da curvatura maior do arco aórtico, que serviu como controle. Procuramos investigar se existiria algum dado morfológico local, no coelho normal, em nível de microscopia óptica e de eletrônica, que pudesse ser responsável por este depósito precoce e localizado. Foram estudados 10 coelhos adultos, da raça Nova Zelândia, machos, com 5 a 6 meses de idade. Destes, 7 receberam injeção intra-venosa do corante azul de Evans, cerca de 3 horas antes do processo de fixação por perfusão. Com esta coloração correlacionamos as áreas de maior permeabilidade (áreas azuis) no arco, com os dados morfológicos. Os nossos resultados mostraram uma coloração azulada difusa e mal delimitada da íntima, localizada preferencialmente na aorta ascendente (em 5 dos 7 animais) e na curvatura menor do arco aórtico (em 3 dos 7 animais). Os achados de microscopia óptica demonstraram a dificuldade para se delimitar a camada íntima da média neste segmento da aorta. Isto foi devido à dificuldade em caracte

rizar a membrana elástica interna. Encontramos em microscopia óptica, as mesmas variações morfológicas nas duas áreas estudadas, com espessamentos intimaes difusos e irregulares, sem nenhuma prevalência de tais espessamentos numa ou noutra área. O mesmo obtivemos em microscopia eletrônica, onde os aspectos ultra-estruturais foram muito semelhantes tanto nas áreas coradas comparadas com as não coradas, quanto na região de curvatura menor comparada com a da curvatura maior.

Pelos nossos resultados concluímos que:

1º) a íntima da aorta de coelhos adultos normais na região do arco é composta de endotélio íntegro, espaço subendotelial de espessura variada e da membrana elástica interna, de difícil caracterização;

2º) a diferente permeabilidade da íntima ao corante azul de Evans não tem base morfológica nos métodos por nós utilizados e deve ser fenômeno fisiológico e não patológico, próprio destas áreas;

3º) a ausência de coloração pelo azul de Evans na íntima não exclui a possibilidade de desenvolver nela a aterosclerose pelos agentes aterogênicos;

4º) no arco aórtico, o limite entre a íntima e a média é difícil de se estabelecer pois uma membrana elástica interna nítida só foi encontrada em dois dos 10 animais. Tentamos explicar esta dificuldade propondo o conceito de membrana elástica interna como estrutura dinâmica e mutável, variável com o crescimento arterial, onde o espessamento intimal difuso contribuiria para o crescimento da média em espessura;

5º) o espessamento intimal difuso é um dado constante, embora de espessura variável em cada animal e entre os animais.

Não prevaleceu em nenhuma das áreas estudadas. Não deve ser visto como lesão precursora da aterosclerose e sim, fazer parte do desenvolvimento normal da parede da artéria.

6º) o espaço subendotelial é composto de fibras elásticas, fibras colágenas, microfibrilas, substância fundamental e de vários tipos de células. As células musculares lisas são as mais frequentes e as menos frequentes foram identificadas em microscopia eletrônica como fibroblastos, monócitos e células indiferenciadas, que denominamos de células mesenquimatosas multifuncionais.

7º) não há diferenças morfológicas em microscopia óptica e eletrônica entre a estrutura da íntima da curvatura menor e a da curvatura maior do arco aórtico. Portanto, a explicação para depósitos lipídicos ocorrerem mais precocemente na curvatura menor, não tem base morfológica nos métodos por nós utilizados e deve estar mais relacionada às condições funcionais próprias do fluxo sanguíneo nesta área.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, CWM. Permeability in atherosclerosis (an artefact with Evans' blue staining). *Atherosclerosis* 39: 131-132, 1981.

ARMSTRONG, ML; MEGAN, MB; WARNER, ED. The relation of hypercholesterolemic fatty streaks to intimal permeability changes shown by Evans blue. *Atherosclerosis* 31: 443-452, 1978.

ASANO, G; OHKUBO, K; HOSHIINO, M; YAMADA, N; ACHARA, K. Early changes in the arterial endothelium under various pathological conditions: an EM histochemical study with visualization of altered permeability using EM tracers. *Acta Path Jap* 29 (1): 21-34, 1979.

BELL, FP; SOMER, JB; CRAIG, IH; SCHWARTZ, CJ. Patterns of aortic Evans blue uptake in vivo and in vitro. *Atherosclerosis* 16: 369-375, 1972.

_____ ; ADAMSON, IL; SCHWARTZ, CJ. Aortic endothelial permeability to albumin: focal and regional pattern of uptake and transmural distribution of I¹³⁵-albumin in the young pig. *Exp Mol Pathol* 20: 57-68, 1974.

_____ ; GALLUS, AS; SCHWARTZ, CJ. Focal and regional patterns of uptake and transmural distribution of I¹³⁵-fibrinogen in the pig aorta in vivo. *Exp Mol Pathol* 20: 281-292, 1974.

_____ ; DAY, AJ, GENT, M; SCHWARTZ, CJ. Differing patterns of cholesterol accumulation and ^3H -cholesterol influx in areas of cholesterol-fed pig aorta identified by Evans blue dye. *Exp Mol Pathol* 22: 366-375, 1975.

BENNINGHOFF, A; HARTMAN, A; HELLMAN, T. Blutgefäß-und Lymphgefäß apparat Atmungsapparat und innersekretorische Drüsen. Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. Berlin, Verlag von Julius Springer, 1930, Sechster Band.

BERGEL, DH; NEREM, RM; SCHWARTZ, CJ. Fluid dynamic aspect of arterial disease. *Atherosclerosis* 23: 253-261, 1976.

BIERING, F; KOBAYASI, T. Electron microscopy of the normal rabbit aorta. *Acta Path Microbiol Scand* 57: 154-168, 1963.

BJORKERUD, S. Preparative, staining and microscopic techniques for the study of whole artery segments. *Atherosclerosis* 15: 147-152, 1972.

_____ ; BONDJERS, G. Endothelial integrity and viability in the aorta of the normal rabbit and rat as evaluated with dye exclusion tests and interference contrast microscopy. *Atherosclerosis* 15: 285-300, 1972.

_____. Relationship of endothelium to smooth muscle. Overview. *Adv Exp Med Biol* 57: 180-253, 1975.

BUCK, RC. The fine structure of the aortic endothelial lesions in experimental cholesterol atherosclerosis of rabbits. *Am J Path* 34: 897-909, 1958(b).

_____. The fine structure of endothelium of large arteries. *J Biophys Biochem Cytol* 4: 187-195, 1958.

CAMPBELL, GR; CHAMLEY-CAMPBELL, JH. The cellular pathobiology of atherosclerosis (invited review). *Pathology* 13: 423-440, 1981.

CAPLAN, BA; SCHWARTZ, CJ. Increased endothelial cell turnover in areas of in vivo Evans blue uptake in the pig aorta. *Atherosclerosis* 17: 401-417, 1973.

_____; GERRITY, RG; SCHWARTZ, CJ. Endothelial cell morphology in focal areas of in vivo Evans blue uptake in the young pig aorta. I. Quantitative light microscopic findings. *Exp Mol Pathol* 21: 102-117, 1974.

CHOBANIAN, AV. The influence of hypertension and other hemodynamic factors in atherogenesis. *Prog Cardiovasc Dis* XXVI (3): 177-196, 1983.

CHRISTENSEN, BC; CHEMNITZ, J. The importance of the subendothelial connective tissue to the permeability of the neointimal barrier. *Atherosclerosis* 48 (3): 289-293, 1983.

CLARK, JM; GLAGOV, S. Structural integration of the arterial wall. I. Relationships and attachments of medial smooth muscle cells in normally distended and hyperdistended aortas. *Lab Invest* 40 (6): 587-602, 1979.

CONSTANTINIDES, P; ROBINSON, M. Ultrastructural injury of arterial endothelium. I) Effects of pH, osmolarity, anoxia and temperature. *Arch Pathol* 88: 99-105, 1969.

ESCOUBET, B; DOSNE, A.M. L'endothélium vasculaire. *Now Rev Fr Hematol* 21 (4): 419-431, 1979.

FRIEDMAN, M; BYERS, SO. Endothelial permeability in atherosclerosis. *Arch Path* 76: 99-105, 1963.

FÜZESI, S; HARSING, J; JELLINER, H. Characteristic features of the smooth muscle cell migration in vascular wall injury. *Exp Pathol* 21: 94-98, 1982.

GABBIANI, G; ELEMER, G; GUELPA, Ch; VALLOTTON, MB; BADONNEL, C; HÜTTNER, I. Morphologic and functional changes of the aortic intima during experimental hypertension. *Am J Pathol* 96: 399-422, 1979.

_____ ; SCHMID, E; WINTER, S. Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific α -type actin. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 298-302, 1981.

_____ ; GABBIANI, F; LOMBARDI, D; SCHWARTZ, SM. Organization of actin cytoskeleton in normal and regenerating arterial endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2361-2364, 1983.

GAMMAL, E.B; MONTURE, MC. Uptake of Evans blue-bound albumin in the aorta of oestrogen-treated rats. *Br J Exp Path* 60: 58-64, 1979.

GARBARSCHE, Ch; TRANUM-JENSEN, J; van DEURS, B. Scanning and transmission electron microscopy of the normal rabbit aortic endothelium after controlled perfusion fixation. *Acta Anat* 112: 79-91, 1982.

GEER, JC; HAUST, MD. Smooth muscle cells in atherosclerosis. Monographs on atherosclerosis. Basel, S. Karger, 1972, V.2.

GERRITY, RG; CLIFF, WJ. The aortic tunica intima in young and aging rats. *Exp Mol Pathol* 16: 382-402, 1972.

_____ ; RICHARDSON, M; SOMER, JB; BELL, FP; SCHWARTZ, CJ. Endothelial cell morphology in areas of in vivo Evans blue uptake in the aorta of young pigs. *Am J Pathol* 89: 313-334, 1977.

_____ ; SCHWARTZ, CJ. Structural correlates of arterial endothelial permeability in the Evans blue model. *Progr Biochem Pharmacol* 13: 134-137, 1977.

GHADIALLY, FN. Ultrastructural pathology of the cell. London, Butterworths, 1977.

GIACOMELLI, F; WIENER, J. Regional variation in the permeability of rat thoracic aorta. *Am J Pathol* 75: 513-528, 1974.

HAM, AW. Tratado de Histologia. 6^a ed. México, Interamericana, 1970.

HASSLER, O. The origin of the cells constituting arterial intimal thickening. *Lab Invest* 22: 286-293, 1970.

HAUDENSCHILD, CC; PRESCOTT, MF; CHOBANIAN, AV. Aortic endothelial and subendothelial cells in experimental hypertension and aging . *Hypertension* 3 (Supp 1): I-148 - I-154, 1981.

HAUDENSCHILD, C; BAUMGARTNER, HR; STUDER, A. Significance of fixation procedure for preservation of arteries. *Experientia* 28: 828-831, 1972.

HUBER, JD; PARKER, F; ODLAND, GF. A basic fuchsin and alkalized methylene blue rapid stain for epoxy-embedded tissue. *Stain Technol* 43: 283-287, 1968.

HUMPHREY, CD; PITTMAN, FE. A simple methylene blue azure I-basic fuchsin stain for epoxy-embedded tissue sections. *Stain Technol* 49: 9-14, 1974.

HUTTNER, I; BOUTET, M; RONA, G; MORE, RH. Studies on protein passage through arterial endothelium. *Lab Invest* 29: 536-546, 1973.

IMAI, H; LEE, KJ; LEE, SK; LEE, KT; O'NEAL, RM; THOMAS, WA. Ultrastructural features of aortic cells in mitosis in control and cholesterol-fed swine. *Lab Invest* 23: 401-415, 1970.

_____; SCOTT, RF; THOMAS, WA. Evans blue dye - its accumulation in extracellular space in relation to endothelial cell basement membrane in normal and atherosclerotic areas of abdominal aorta. *Arch Pathol Lab Med* 106: 186-191, 1982.

JULLINEK, H; HARSING, J; FÜZESI, S. A new model for arteriosclerosis (an EM study of the lesion induced by i.v administered fat): *Atherosclerosis* 43: 7-18, 1982.

JÖRGENSEN, L; PACKHAM, MA; ROWSELL, HC; MUSTARD, JF. Deposition of formed elements of blood on the intima and signs of intimal injury in the aorta of rabbit, pig and man. *Lab Invest* 27: 341-350, 1972.

JORIS, I; ZAND, T; MAJNO, G. Hydrodynamic injury of the endothelium in acute aortic stenosis. *Am J Pathol* 106 (3): 394-408, 1982.

JUNQUEIRA, LCU, SALLES, LMM. Artefatos em microscopia eletrônica aplicada a material biológico. *Ciência e Cultura* 27(5): 461-471, 1975.

KARNOVSKY, MJ. A formaldehyde fixative high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27: 137A, 1965.

KJELDSSEN, K; THOMSEN, HK. The effect of hypoxia on the fine structure of the aortic intima in rabbits. *Lab Invest* 33(5): 533-543, 1975.

_____ ; THOMSEN, HK. Ultrastructure of the aortic intima in focal areas of intravital Evans blue uptake in the rabbit. *Acta Path Microbiol Scand [A]* 89: 1-8, 1981.

KOCHER, O; SKALLI, O; BLOOM, WS; GABBIANI, G. Cytoskeleton of rat aortic smooth muscle cells. Normal conditions and experimental intimal thickening. *Lab Invest* 50 (6): 645-652, 1984.

KOJIMARA, M; SEKIYA, K; OONEDA, G. Studies on the healing of arterial lesions in experimental hypertension. II. An EM study on the origin of intimal smooth muscle cells in the intima with marked dysoria. *Virchows Arch [Pathol Anat]* 354: 161-168, 1971.

LEGRAND, Y; COURILLON, A; FAUVEL, F; BARIETY, J. Subendothelial structures of the arterial wall: anatomy, biochemistry and functions. *Nouv Rev Fr Hematol* 21 (4): 403-417, 1979.

LOPES DE FARIA, J. Medionekrose der großen und mittelgroßen Arterien nach orthostatischem Kollaps der Kaninchens. *Beitr path Anat* 115: 373-404, 1955.

_____. Aortenmedionekrose mit sekundärer Arteriosklerose bei den kongenitalen zyanotischen Herzkrankheiten. *Beitr path Anat* 125: 129-147, 1961.

_____. Histopathological changes in the coronary arteries of rabbits after orthostatic collapse with arteriosclerotic features. *Path microbiol* 25: 1-12, 1962.

_____. Histopathological changes in the coronary arteries following shock or hypotension in man. *Path Microbiol* 26: 385-398, 1963.

_____. Role of medial changes in the pathogenesis of the diffuse intimal thickening and in atherogenesis. *J Atheroscl Res* 5: 509-515, 1965(a).

_____. Über die Rolle der Mediaveränderungen für die Pathogenese der Intimasklerose sowie die Begrenzung der Arteriosclerose in der Aorta ascendens des Menschen. *Beitr path Anat* 132: 114-128, 1965(b).

_____. Role of wall factors in the pathogenesis of coronary atherosclerosis. *J Atheroscl Res* 8: 291-302, 1968.

_____. On the origin of smooth muscle cells in the intimal thickening of rabbit aorta following orthostatic collapse. *Beitr path Anat* 140: 333-344, 1970.

_____; FARIA, LL. Predisposing effect of spontaneous mesenchymal intimal thickening of rabbit aorta to early lipid deposition. *Virchows Arch [Pathol Anat]* 353: 1-9, 1971.

LUFT, JH. Fine structure of the vascular wall. In: JONES, RJ ed. *Evolution of the atherosclerotic plaque*. Chicago, University of Chicago Press, 1963.

LUGINBÜHL, H; ROSSI, GL; RATCLIFFE, HL. Comparative atherosclerosis. *Adv Vet Sci Comp Med* 21: 421-448, 1977.

MAC GILL JR, HC et alii. General findings of the International atherosclerosis project. *Lab Invest* 18: 498-502, 1968.

MAJNO, G; JORIS, I. Endothelium 1977: A review. *Adv Exp Med Biol* 104: 169-225, 1978.

MINICK, CR; STEMERMAN, MB; INSULL, WJR. Role of endothelium and hypercholesterolemia in intimal thickening and lipid accumulation. *Am J Pathol* 95 (1): 131-158, 1979.

MONTENEGRO, MR; IABUKI, K. A aterosclerose em São Paulo. III-Comparação de São Paulo com outras cidades. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 11: 203-213, 1969.

MOSS, NS, BENDITT, EP. Spontaneous and experimentally - induced arterial lesions in chicken. I. An ultrastructural survey of the normal chicken aorta. *Lab Invest* 22: 166-183, 1970.

_____ ; BENDITT, EP. The ultrastructure of spontaneous and experimentally induced arterial lesions. II. The spontaneous plaque in the chicken. *Lab Invest* 23: 231-245, 1970.

NEREM, RM; CORNHILL, JF. Hemodynamics and atherogenesis. *Atherosclerosis* 36: 151-157, 1980.

_____ ; CORNHILL, JF. The role of fluid mechanics in atherogenesis. *J Biochem Eng* 102: 181-189, 1980.

NIEWIAROWISKI, S; RAO, AK. Contribution of thrombogenic factors to the pathogenesis of atherosclerosis. *Prog Cardiovasc Dis* XXVI (3): 197-222, 1983.

OLLIVETTI, G; MELISSARI, M; MARCHETTI, G; ANVERSA, P. Quantitative structural changes of the rat thoracic aorta in early spontaneous hypertension. *Circ Res* 51: 19-26, 1982.

- PARKER, F. An electron microscopic study of experimental atherosclerosis. *Am J Pathol* 36: 19-53, 1960.
- PEASE, DC; PAULE, WJ. Electron microscopy of elastic arteries: the thoracic aorta of the rat. *J Ultrastruct Res* 3: 469-483, 1960.
- POOLE, JCF; CROMWELL, SB; BENDITT, EP. Behavior of smooth muscle cells and formation of extracellular structure in the reaction of arterial walls to injury. *Am J Pathol* 62: 391-404, 1971.
- RESTREPO, C; STRONG, JP; GUSMAN, MA; TEJADA, C. Geographic comparisons of diffuse intimal thickening of the aorta. *Atherosclerosis* 32: 177-193, 1979.
- RHODIN, JAG. Fine structure of vascular walls in mammals (with special reference to smooth muscle component). *Physiol Rev.* 42 (suppl 5): 48-81, 1962.
- ROBERT, B; SZIGETI, M; DEROVETTE, JC, ROBERT, L. Studies on the nature of the microfibrillar component of elastic fibers. *Eur J Biochem* 21: 507-516, 1971.
- ROSS, R; GLOMSET, J. The pathogenesis of atherosclerosis. *New Eng J Med* 295: 369-377, 1976.
- _____ ; GLOMSET, J. The pathogenesis of atherosclerosis II. *New Eng J Med* 295: 420-425, 1976.
- _____ ; GLOMSET, J; HARKER, L. Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol* 86: 675-684, 1977.
- _____. The arterial wall and atherosclerosis. *Ann Rev Med* 30: 1-15, 1979.

RUCKER, RB; TINKER, D. Structure and metabolism of arterial elastin. *Int Rev Exp Pathol* 17: 1-47, 1977.

SCHENK, EA; GAMAN, E; FEIGENBAUM, AS. Spontaneous aortic lesion in rabbits. I. Morphologic characteristics. *Circ Res* 19: 80-88, 1966.

SCHNEEBERGER, EE; LYNCH, RD. Tight junctions: their structure, composition and function. *Circ Res* 55 (6): 723-733, 1984.

SCOTT, RF; JONES, R; DAOUD, AS; ZUMBO, O; COULTON, F; THOMAS, WA. Experimental atherosclerosis in rhesus monkeys. *Exp mol pathol* 7: 34-43, 1967.

_____ ; THOMAS, WA; LEE, WM; REINER, JM; FLORENTIN, RA. Distribution of intimal smooth muscle cell masses and their relationship to early atherosclerosis in the abdominal aortas of young swine. *Atherosclerosis* 34 (3): 291-301, 1979.

SIMIONESCU, M; SIMIONESCU, H. Ultrastructure of the microvascular wall: functional correlation. In: RENKIN, EM; MICHEL, CC, GEIGER, SR; ed. *Handbook of Physiology*. Bethesda, Am Physiol Soc, 1984, v IV, sec 2, chap 3: 41-101.

SOMER, JB; SCHWARTZ, CI. Focal H^3 -Cholesterol in the pig aorta. *Atherosclerosis* 13: 293-304, 1971.

_____, SCHWARTZ, CI. Focal H^3 -cholesterol uptake in the pig aorta (Part 2). *Atherosclerosis* 16: 377-388, 1972.

SOMLYO, AP. Structural characteristics, mechanisms of contraction, innervation and proliferation of smooth muscle cells - ultrastructure and function of vascular smooth muscle. *Adv Exp Med Biol* 57: 1-79, 1975.

SPAET, TH; GAYNOR, E; STEMERMAN, MB. Thrombosis, atherosclerosis and endothelium. *Am Heart J* 87: 661-668, 1974.

_____ ; STEMERMAN, MB; VEITH, FJ; LEJNIE KS, I. Intimal injury and regrowth in the rabbit aorta. *Circ Res* 36: 58-70, 1975.

STEHBENS, WE. Endothelial permeability in experimental aneurysms and arteriovenous fistulas in rabbits as demonstrated by the uptake of Evans blue. *Atherosclerosis* 30: 343-349, 1978.

STEMERMAN, MB; ROSS, R. Experimental atherosclerosis. I. Fibrous plaque in primates, an EM study. *J Exp Med* 136: 769-789, 1972.

_____ ; SPAET, TH; PITLICK, F; CINTRON, J; LEJNIEKS, J; TIELL, ML. Intimal healing: the pattern of reendothelialization and intimal thickening. *Am J Pathol* 87: 125-142, 1977.

STETZ, EM; MAJNO, G; JORIS, I. Cellular pathology of the rat aorta. Pseudo-vacuoles and myo-endothelial hernia. *Virchows Arch [Pathol Anat]* 383: 135-148, 1979.

STOUT, LC; THORPE, LW. Histology of normal aorta in non-human primates with emphasis on diffuse intimal thickening. *Atherosclerosis*. 35 (2): 165-180, 1980.

SUBBIAH, MTR; DEITMEYER, D; YUNKER, R. Regional aortic differences in atherosclerosis susceptibility. Relationship to lipid concentration and prostaglandins biosynthesis. *Virchows Arch [Cell Pathol]* 36 (1): 41-46, 1981.

SVENDSEN, E; JORGENSEN, L. Focal "spontaneous" alterations and loss of endothelial cells in rabbit aorta. *Acta path microbiol scand [A]* 86: 1-13, 1978.

_____. Focal endothelial cell injury in rabbit aorta, aggravation of injury by 2 days of cholesterol feeding. *Acta path microbiol scand [A]* 87: 123-130, 1979.

_____; TINDALL, AR. Raised blood pressure and endothelial cell injury in rabbit aorta. *Acta path microbiol scand [A]* 89: 325-334, 1981.

TANIMURA, A; TAKANORI, C; NAKASHIMA, T. Morphologic study on the interaction between the blood vessel wall and the blood flow: the arterial branching ostium and the site of permeability. *Angiology* 31 (8): 558-565, 1980.

TEJADA, C; STRONG, JP; MONTENEGRO, MR, RESTREPO, C; SOLBERG, LA. Distribution of coronary and aortic atherosclerosis by geographic location, race and sex. *Lab Invest* 18: 509-526, 1968.

TEXOM, M. Atherosclerosis, its hemodynamic basis and implications. *Med Clin North Am* 58 (2): 257-268, 1974.

THOMAS, WA; KIM, DN. Atherosclerosis as a hyperplastic and/or neoplastic process. *Lab. Invest* 48: 245-255, 1983.

TRACY, RE; STRONG, JP; TOCA, VT; LOPEZ, CR. Variable pattern of nonatheromatous aortic intimal thickening. *Lab Invest* 41 : 553-559, 1979.

TS'AO CHUANG-HSIN. Graded endothelial injury of the rabbit aorta. *Arch Pathol* 90: 222-229, 1970.

URRY, DW. Molecular perspectives of vascular wall structure and disease: the elastic component. *Perspect Biol Med* 21 (2): 265-295, 1978.

VELICAN, C. Macromolecular changes in atherosclerosis. *Handbuch der Histochemie*. Stuttgart, Verlag, 1974, v VIII.

WEBSTER, WS; BISHOP, SP; GEER, JC. Experimental aortic intimal thickening. I: Morphology and source of intimal cells. *Am J Pathol* 76: 245-264, 1974.

_____ ; BISHOP, SP; GEER, JC. Experimental aortic intimal thickening. Part 2 (endothelialization and permeability). *Am J Pathol* 76: 265-284, 1974.

WILENS, SL. The nature of diffuse intimal thickening of arteries. *Am J Pathol* 27: 825-833, 1951.

WISSELER, RW, appud ARMOSTRONG, ML; MEGAN, MB; WARNER, ED. The relation of hypercholesterolemic fatty streaks to intimal permeability changes shown by Evans blue. *Atherosclerosis* 31: 443-452, 1978.

WOLKOFF, K appud GEER, JC; HAUST, MD. Smooth muscle cells in atherosclerosis. Monographs on atherosclerosis. Basel, S. Karger, 1972, v.2.

WOOLF, N. The origins of atherosclerosis. *Postgrad Med J* 54: 156-161, 1978.

YAMAMOTO, I. An EM study of rabbit arterial wall. *J Electron Microscopy* 11: 212-230, 1962.

YOSHIDA, Y; SUSUKI, K; SHINKAI, H; OONEDA, G. Morphological studies on age changes of arterial walls and progression of atherosclerosis in human aorta and cerebral arteries and effects of lipoprotein on proliferation of monkey aortic smooth muscle cells. *Jpn Circ J* 44 (1): 13-32, 1980.

APÊNDICE

1) Processamento do material para microscopia eletrônica:

A) Fixação:

- em Karnovsky por pelo menos 2 horas, na geladeira
- lavar 2 ou 3 vezes em tampão de cacodilato de sódio
- tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato, por 1,5 h a 2 h na capela
- lavar em solução de acetato de uranila a 0,5%, rapidamente
- acetato de uranila a 0,5% pelo período de 1 noite, na geladeira.

B) Desidratação: em acetona p.a. (Queel), à temperatura ambiente.

- acetona a 30% - 30 minutos
- acetona a 50% - 15 minutos
- acetona a 70% - 15 minutos
- acetona a 90% - 15 minutos
- acetona anidra - 2 passagens de 15 minutos

Obs.: A acetona anidra é conseguida através da adição de sulfato de sódio ao solvente.

C) Embebição e Inclusão:

Composição da resina usada:

- Araldite Cy 205*	11,4g
- Endurecedor DDSA (anidrido dodecenil succínico)**	8,0g
- DMP-30 (tri-dimetil-amino-metil-fenol)**	0,6ml
- dibutil-ftalato**	0,05ml

* Materiais Plásticos Uegama - São Paulo

** Polysciences Inc.

Colocamos o material numa solução composta de resina e acetona anidra na proporção 1:1 e deixamos de 2 a 4 horas girando no rotor.

Em seguida, o material é colocado na resina pura e deixado 1 hora na estufa a 37°C. Incluímos em forminhas e levamos à estufa de 60°C por 3 dias.

2) Fixador de Karnovsky

A) solução de paraformaldeído a 1%

B) solução de glutaraldeído a 3%

C) tampão cacodilato de sódio 0,07M

Ajustar o pH para 7,2 a 7,4.

3) Esquema da ficha de observação das fotos de M. Eletrônica

Coelho nº _____

Curvatura:

Foto nº _____

I) Endotélio

- | | |
|----------------------------|-----------------------|
| 1) membrana citoplasmática | 9) Golgi |
| 2) solução de continuidade | 10) ribossomos livres |
| 3) células salientes | 11) microfilamentos |
| 4) vesículas superficiais | 12) lisossomos |
| 5) vacúolos | 13) Weibel-Palade |
| 6) REL | 14) núcleo |
| 7) RER | 15) membrana nuclear |
| 8) mitocôndrias | 16) glicogênio |

II) Junções

- 1) tipo
- 2) número
- 3) sinais de lesão
- 4) processos alongados para a luz

III) Membrana basal

- 1) espessura
- 2) composição

IV) Espaço subendotelial

- 1) espessura máxima
- 2) edema
- 3) elástico
- 4) colágeno
- 5) microfibrilas
- 6) célula muscular lisa
- 7) camadas de células
- 8) células não musculares
- 9) relação célula x elástico
- 10) processos celulares

V) Membrana elástica interna

- 1) nítida
- 2) indistinta
- 3) segmentada
- 4) duplicada
- 5) relação íntima / média
- 6) células atravessando a MEI

VI) Observações