

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE EDUCAÇÃO FÍSICA
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS UFSCAR/UNESP

Novo dispositivo de medida de rigidez arterial - pOpmètri® e suas correlações com análises morfométricas e densidade de colágeno em artérias de ratos de diferentes idades

ALUNA: Mayara Florencio Fabricio

ORIENTADORA: Profa. Adj. Sandra Lia do Amaral Cardoso

BAURU
Fevereiro – 2018

Mayara Florencio Fabricio

Novo dispositivo de medida de rigidez arterial - pOpmètri® e suas correlações com análises morfométricas e densidade de colágeno em artérias de ratos de diferentes idades

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos como requisito para o título de **Mestre em Ciências Fisiológicas**

Orientadora: Profa. Adj. Sandra Lia do Amaral Cardoso.

Bauru
Fevereiro– 2018

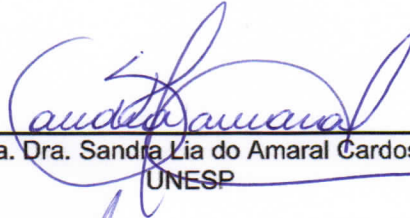


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

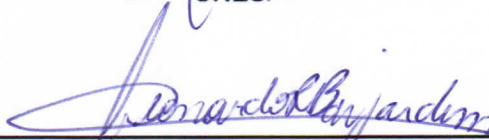
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

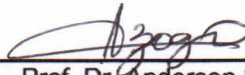
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Mayara Florencio Fabricio, realizada em 16/03/2018:



Profa. Dra. Sandra Lia do Amaral Cardoso
UNESP



Prof. Dr. Leonardo Rigoldi Bonjardim
USP



Prof. Dr. Anderson Saranz Zago
UNESP

Dedicatória:

Dedico esse trabalho aos meus pais, Marcos e Denize, por me ensinarem o que é amor, respeito e persistência.

Agradecimentos:

Agradeço aos meus pais e toda minha família por todo incentivo, apoio e carinho em todos esses anos, mesmo não entendendo nada das minhas “invenções”, amo vocês. Em especial ao Cainho pelas hospedagens.

Agradeço a Prof. Dra. Maria Tereza, pela parceria, disponibilidade e por todo conhecimento trocado;

Agradeço a Prof. Dra. Lisete C. Michelin do Instituto de Ciências Biomédicas da USP - São Paulo, por abrir as portas do seu laboratório e contribuir para a realização desse trabalho;

Agradeço ao Prof. Dr. Andre Shinohara e Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo, da FOB/USP - Bauru, por disponibilizar a utilização do microscópio do laboratório de anatomia e contribuir significativamente com as análises desse projeto.

Agradeço também a Dra. Tania da Histologia FO/USP pelo auxílio na calibração e cálculos de morfometria.

Agradeço a todo laboratório de bioquímica da FOB/USP - Bauru da Prof. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf e Prof Rodrigo Cardoso de Oliveira, juntamente com a Mileni, por abrir as portas e permitir a utilização do mesmo.

Agradeço também ao Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini por me deixar usar seu laboratório e ao Mario, Thales, Mateus, Diego e Maira por toda paciência, dedicação e torcida nos experimentos.

Agradeço imensamente aos meus companheiros de laboratório, por toda experiência trocada diariamente, por toda paciência e cumplicidade nesses mais de 2 anos juntos. Por ficarem lado a lado em todas as fases desse projeto. Muito obrigada André Krug, Anderson Macedo, Naiara, Francine, Vinicius, Lidieli, Danyelli e Melissa.

Agradeço também a toooooo suporte, incentivo (mesmo antes de ter entrado) e ombro amigo nas horas difíceis de todos meus amigos Andressa, Samia, Rudney, Ana Beatriz, Evandro, Laura, Lidieli, Andreza, Juliana, Henrique, Renata, Leonardo, Amauri, Juliana, Beatriz, Caio, Carol, Diego e Sarah.

Aos meus companheiros de entrada no mestrado, Camilla, Emilson, Gabriel, Lucas, Karine, Rafael e Wilson por compartilharem de toda ansiedade, noites de estudos, dúvidas tiradas e por toda experiência nos meus 3 meses em Araraquara.

Agradeço as de sempre, Aline, Amanda, Nayara e Daiane, pelo suporte durante a maior parte da minha vida ! Em especial a Aline pelos 3 meses de hospedagem com o maior carinho do mundo !

Não posso deixar de agradecer esse pessoal que chegou no último ano mas foi essencial nessa fase final. Muito Obrigada Larissa, Barbara, Fernanda, Marcela, Camila e Maira.

Agradeço também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo auxílio nesses 2 anos.

Um obrigada especial também ao meu “tio” pelos fretes de lâminas, pela torcida e por deixar minhas idas a São Paulo mais divertidas.

Por último, mas não menos importante, agradeço a minha orientadora, Prof. Dra. Sandra Lia por responder meu e-mail (mesmo eu achando que foi por engano), por toda paciência, dedicação e parceria nesses mais de 3 anos de laboratório. Por muitas vezes acreditar mais em mim do que eu mesmo e por enfrentar todos os perrengues comigo, muito obrigada, teacher.

Resumo:

A medida da rigidez arterial, avaliada pela velocidade da onda de pulso (VOP) vem sendo considerada um importante precursor de doenças cardiovasculares (DCV). Dentre os principais fatores que podem alterar a rigidez arterial estão as alterações na geometria dos vasos arteriais, bem como na quantidade de colágeno e elastina. Para uma melhor compreensão dos fatores que alteram a VOP, torna-se imprescindível a análise dos vasos arteriais, no sentido de realizar investigações histológicas, enzimáticas, proteicas e gênicas que possam auxiliar na compreensão da redução da complacência dos vasos. Recentemente, uma técnica de medida de VOP rápida, cômoda e não invasiva foi desenvolvida para uso em humanos e animais de pequeno porte, no entanto, foi validada somente em humanos. Portanto, o objetivo do presente estudo foi verificar a validade, a fidedignidade e a objetividade do equipamento de medida da velocidade da onda de pulso (pOpmètri® 1.0) em ratos. Este estudo correlacionou, no mesmo animal, as medidas da VOP com os resultados de morfometria e da densidade de colágeno na túnica média das artérias aorta, carótida, renal e femoral em ratos jovens de 1 mês, adultos de 4 meses e idosos de 1 ano. 42 ratos wistar foram divididos em 3 grupos: G1: jovens (1 mês, n=16), G2: adultos (4 meses, n=16) e G3: idosos (1 ano, n=10), que foram submetidos à análise da VOP pelo dispositivo recentemente lançado para animais de pequeno porte (pOpmètri® 1.0). Os animais anestesiados foram colocados em decúbito dorsal sobre uma placa aquecedora, com um dos sensores posicionados no membro torácico e o outro no membro pélvico do animal. Foi avaliada a diferença da onda de pulso entre membros superiores e inferiores, analisada pelo software pOpmètri® 1.0, ajustado de acordo com a distância medida entre os sensores. Após as medidas funcionais, as artérias carótida, aorta, renal e femoral foram retiradas e utilizadas para análises morfométricas das artérias (área de secção transversa, AST, espessura da parede, razão parede/luz) e histoquímica com picrosirius red, para avaliar o percentual (%) de colágeno. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. Foi usada ANOVA de um caminho, com post-hoc de Tukey. A VOP foi correlacionada com os dados morfométricos e densidade de colágeno, no mesmo rato, pelo teste de correlação de Pearson ($p < 0,05$). ASTe e ASTi aumentaram significativamente com as idades (ASTe: aorta: 151%, carótida: 94%, femoral: 62% e renal: 251% e ASTi: aorta: 129%, carótida: 119%, femoral: 1136% e renal: 387%) e correlacionaram-se com a VOP (ASTe: aorta: $r=0,5642$, carótida: $r=0,6854$, femoral: $r=0,6642$ e renal: $r=0,7817$ e ASTi: aorta: $r=0,5774$, carótida: $r=0,5429$, femoral: $r=0,6860$ e renal: $r=0,8809$). A espessura da parede não apresentou diferença significativa entre os grupos e não se correlacionou com a VOP. A % de colágeno aumentou significativamente em todas as artérias (aorta: 276%, carótida: 290% e femoral: 243%) e correlacionou-se com os dados de VOP (aorta: $r=0,8854$, carótida: $r=0,9031$ e femoral: $r=0,9051$). Os resultados do presente estudo nos permitem sugerir que a medida de VOP, feita pelo novo equipamento pOpmètri® 1.0 para animais de pequeno porte, apresentou-se sensível em detectar alterações que podem influenciar a VOP, uma vez que se correlacionou significativamente com as alterações morfométricas e de colágeno presentes nas artérias de ratos de diferentes idades, as quais contribuem para a redução da complacência dos vasos e aumento da rigidez arterial. O aparelho também se mostrou fidedigno por meio das análises de fidedignidade demonstrando consistência interna, objetividade e estabilidade.

Palavras chaves: pOpmètri® 1.0, colágeno, elastina, doenças cardiovasculares

Abstract:

Arterial stiffness measurement, evaluated by pulse wave velocity (PWV), is a predictor of cardiovascular events. Among the main factors that affect arterial stiffness are cross-sectional area, medial wall thickening, wall-to-lumen ratio and collagen density. Recently, a device using finger-toe pulse wave velocity was validated for humans study, but to better understand the mechanisms that change arterial stiffness, it is necessary to use the arterial vessel for genetic, proteomic and histological analysis. Therefore, a new device – popmètre® – was designed for measurements of PWV in animals and it was not validated yet. The aim of this study was to evaluate the validity, reliability and objectivity of a new device pOpmètri® 1.0 for animal studies. Forty-two Wistar rats were allocated into 3 groups of different ages: Young: 1 month; Adult: 4 months and Older: 12 months. Two photodiodes were positioned on the right thoracic and pelvic members for PWV measurement, on anesthetized rats. Then, aorta, carotid, femoral and renal arteries were extracted and prepared for morphometric and histological analysis (cross sectional area – CSA, wall thickness and collagen density). Results of PWV and vessel structure were then correlated using Pearson correlation test ($p < 0.05$). As expected, PWV was 46% higher in adult rats compared with young rats and 20% higher in aged rats compared with adult ones. Cross sectional area was significantly higher in aged rats compared with young rats in aorta (+151%), carotid (+94%), femoral (+62%) and renal (251%) arteries. Wall thickness was not altered among groups. Also, collagen density was higher in aged rats compared with young rats in (aorta: 276%; femoral: 290% and carotid: 234%). A significant correlation was observed between CSA and PWV in all arteries: aorta ($r=0.5642$; $p < 0.001$); carotid ($r=0.6854$ $p < 0.001$); femoral ($r=0.6642$ $p < 0.001$) and renal ($r=0.7817$; $p < 0.0001$). Wall thickness did not correlate with PWV. In addition, collagen density correlated with PWV in aorta ($r=0,8854$), femoral ($r=0,9031$) and carotid ($r=0,9051$). The results of this present study allow us to suggest that PWV measurement, obtained by a new device pOpmètri® for small animals, was able to detect age-related vessel structure in rats. The device was approved of tests of validity, reliability and objectivity.

Keywords: pOpmètri® 1.0, collagen, elastin, cardiovascular diseases

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Correlação entre o tempo de trânsito das artérias carótida e femoral e a idade, em humanos. (ALIVON et al., 2015).....8
- Figura 2:** Imagem do software pòpmetri@1.0 e posicionamento correto dos sensores nas patas do animal anestesiado.....15
- Figura 3:** Imagem da delimitação de perímetro interno (superior, amarelo) e perímetro externo (inferior, amarelo) em pixels pelo software Image J.....18
- Figura 4:** Valores de Peso corporal do grupo jovem (n=16), do grupo adulto (n=16) e do grupo idoso (n=10). Significância: + vs adulto, * vs jovem. $p < 0,05$21
- Figura 5:** Valores calculados da velocidade da onda de pulso (VOP) do grupo jovem (n=16), do grupo adulto (n=16) e do grupo idoso (n=10). Significância: + vs adulto, * vs jovem. $p < 0,05$22
- Figura 6:** Fotos de cortes transversais histológicos (10 μm) corados com HE, obtidos a partir de fragmentos da artéria aorta de 1 rato de cada grupo (superior: jovem; central: adulto e inferior: idoso). Objetiva de 4X.....23
- Figura 7:** Fotos de cortes transversais histológicos (10 μm) corados com HE, obtidos a partir de fragmentos da carótida comum de 1 rato de cada grupo (superior: jovem; central: adulto e inferior: idoso). Objetiva de 10X.....26
- Figura 8:** Fotos de cortes transversais histológicos (10 μm) corados com HE, obtidos a partir de fragmentos da artéria femoral de 1 rato de cada grupo (superior: jovem; central: adulto e inferior: idoso). Objetiva de 10X.....28
- Figura 9:** Fotos de cortes transversais histológicos (10 μm) corados com HE, obtidos a partir de fragmentos da artéria renal de 1 rato de cada grupo (superior: jovem; central: adulto e inferior: idoso). Objetiva de 10X.....30
- Figura 10:** Desenho ilustrativo, baseado nas recomendações de Mulvany (1996), resultante das alterações ocorridas nos vasos com o passar da idade, entre jovens, adultos e idosos.....31

Figura 11: Fotos de cortes transversais histológicos (5 µm) corados com Picrosirius Red, obtidos a partir de fragmentos da artéria aorta de 1 rato de cada grupo (Superior: jovem, central: adulto e inferior: idoso).....32

Figura 12: Percentual de colágeno na camada média da artéria aorta dos grupos jovem (n=4), adulto (n=5) e idoso (n=5). Significância: + vs adulto, * vs jovem. $p < 0,05$33

Figura 13: Fotos de cortes transversais histológicos (5 µm) corados com Picrosirius Red, obtidos a partir de fragmentos da artéria carótida de 1 rato de cada grupo. (Superior: jovem, central: adulto e inferior: idoso).....34

Figura 14: Percentual de colágeno na camada média da artéria carótida do grupo jovem (n=4), do grupo adulto (n=5) e do grupo idoso (n=4). Significância: + vs adulto, * vs jovem. $p < 0,05$35

Figura 15: Fotos de cortes transversais histológicos (5 µm) corados com Picrosirius Red, obtidos a partir de fragmentos da artéria femoral de 1 rato de cada grupo. (Superior: jovem, central: adulto e inferior: idoso).....36

Figura 16: Gráfico da artéria femoral do percentual de colágeno do grupo jovem (n=5), do grupo adulto (n=5) e do grupo idoso (n=5). Significância: + vs adulto, * vs jovem. $P < 0,05$37

Figura 17: Correlação entre a medida de área de secção transversa externa da artéria aorta, $r=0,5642$ (A), carótida comum, $r=0,6854$ (B), femoral, $r=0,6642$ (C) e renal, $r=0,7817$ (D) com a velocidade da onda de pulso (VOP) em todos os grupos. Significância: * $p < 0,05$38

Figura 18: Correlação entre a medida de área de secção transversa interna da artéria aorta, $r=0,5774$ (A), carótida comum, $r=0,5429$ (B), femoral, $r=0,6860$ (C) e renal, $r=0,8809$ (D) com a velocidade da onda de pulso (VOP) em todos os grupos. Significância: * $p < 0,05$39

Figura 19: Correlação entre a medida de parede da artéria aorta, $r=0,2744$ (A), carótida comum, $r=0,1909$ (B), femoral, $r=0,1969$ (C) e renal, $r=0,3185$ (D) com a velocidade da onda de pulso (VOP) em todos os grupos. Significância: $p > 0,05$40

Figura 20: Correlação entre a medida de razão parede/luz da artéria aorta, $r=0,6054$ (A), carótida comum, $r=0,4369$ (B), femoral, $r=0,4752$ (C) e renal, $r=0,5702$ (D) com a velocidade da onda de pulso (VOP) em todos os grupos. Significância: * $p < 0,05$41

Figura 21: Correlação entre percentual de colágeno na camada média da artéria aorta com a velocidade da onda de pulso (VOP) em todos os grupos. Significância: $r = 0,8854$, * $p < 0,05$42

Figura 22: Correlação entre percentual de colágeno na camada média da artéria carótida com a velocidade da onda de pulso (VOP) em todos os grupos. Significância: $r = 0,9031$, * $p < 0,05$42

Figura 23: Correlação entre percentual de colágeno na camada média da artéria femoral com a velocidade da onda de pulso (VOP) em todos os grupos. Significância: $r = 0,9051$, * $p < 0,05$43

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Análise morfométrica da artéria Aorta torácica nos grupos jovem (J), adulto (A) e idoso (I).....24
- Tabela 2:** Análise morfométrica da artéria carótida comum dos grupos jovem (J), adulto (A) e idoso (I) em todos os grupos analisados.....27
- Tabela 3:** Análise morfométrica da artéria femoral dos grupos jovem (J), adulto (A) e idoso (I).....29
- Tabela 4:** Análise morfométrica da artéria renal dos grupos jovem (J), adulto (A) e idoso (I).....31
- Tabela 5:** Resultado das análises de fidegnidade (consistência interna e estabilidade) e objetividade entre avaliadores nas medidas de VOP45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO/REVISÃO DE LITERATURA	7
2. OBJETIVO	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1 ANÁLISE DO ENRIJECIMENTO ARTERIAL	14
3.2 PREPARAÇÃO DOS TECIDOS PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA	16
3.3 MORFOMETRIA DA AORTA TORÁCICA, ARTÉRIA CARÓTIDA COMUM, ARTÉRIA RENAL E ARTÉRIA FEMORAL	17
3.4 QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENO	19
3.5 ANÁLISE DE FIDEDGNIDADE (OBJETIVIDADE) E CONSISTÊNCIA INTERNA	20
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
4. RESULTADOS	22
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	52

1. INTRODUÇÃO/REVISÃO DE LITERATURA

O ramo arterial exerce importantes funções dentro do sistema circulatório. Em especial, as artérias de grande calibre como a aorta, que são consideradas vasos de condutância e as artérias carótida, femoral e renal, que são comumente chamadas de vasos de resistência, que encaminham e distribuem o fluxo sanguíneo para diferentes tecidos (AIRES, 2011).

Em resposta à pressão exercida pelo fluxo, essas artérias têm a capacidade mecânica de expandir o seu diâmetro devido ao aumento de volume, o que é chamado de complacência. Isso ocorre devido às propriedades elásticas contidas nas camadas do vaso e ao músculo liso. Esses elementos estão dispostos nas paredes dos vasos formando três camadas distintas: a túnica íntima, que é constituída pelo endotélio e por tecido subendotelial, túnica média, que é constituída na sua maior parte por músculo liso e a túnica adventícia, que é constituída principalmente por colágeno e elastina (AIRES, 2011).

Em situações basais, ocorre um equilíbrio entre essas substâncias, o qual permite a distensibilidade dos vasos, no entanto, alguns fatores podem alterar essa propriedade, ocasionando um enrijecimento arterial (ou rigidez arterial), que é caracterizado pela diminuição da complacência arterial mediante ao aumento de pressão.

Tais alterações podem ocorrer por aspectos estruturais, como hipertrofia do músculo liso, diminuição na produção de elastina ou também aumento na produção de colágeno (BRASSELET et al., 2005). Porém, os aspectos funcionais também podem contribuir para uma maior rigidez arterial como é o caso da disfunção endotelial. Neste caso, pode estar ocorrendo um desbalanço entre substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras derivadas do endotélio, as quais contribuem para aumentar ou reduzir a força de contração dos vasos, dependente de endotélio (CARVALHO et al., 2001).

Um importante fator irreversível que promove alterações na estrutura dos vasos e, conseqüentemente, compromete a complacência arterial, é o envelhecimento, que tem como característica o aumento da rigidez arterial (AVOLIO et al., 1983). Com o passar dos anos, ocorre um desbalanço entre os componentes da matrix extracelular, que pode ser determinado por um aumento de deposição de colágeno e/ou uma degradação de fibras de elastina, que podem contribuir para o aumento da rigidez arterial independente da calcificação (NIEDERHOFFER et al., 1996). Neste sentido, o estudo de Diazotero et al. (2015) demonstrou que camundongos idosos apresentam um aumento da deposição de colágeno na artéria cerebral quando comparados aos camundongos jovens. Esta alteração, dependente da idade, pode ocorrer independente nos níveis pressóricos, como demonstrado por Lindesay et al., (2016). Neste estudo, ratos normotensos e ratos espontaneamente hipertensos, adultos e idosos, mostraram um aumento gradual da rigidez arterial relacionado à idade. O mesmo acontece em humanos, como mostra Alivon et al., (2015), que correlacionaram a rigidez arterial com a idade em 86 indivíduos e constataram um aumento progressivo (Fig.1).

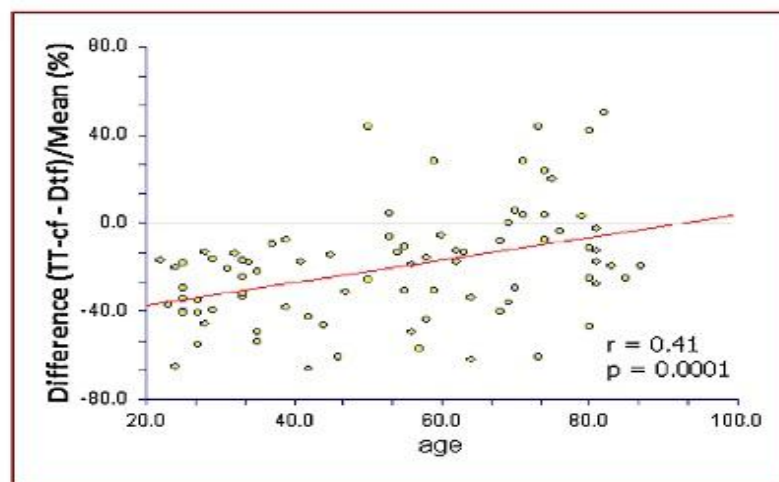


Figura 1: Correlação entre o tempo de trânsito das artérias carótida e femoral e a idade, em humanos (ALIVON et al., 2015).

A rigidez arterial vem ganhando relevância por ser considerada um precursor de diversas patologias, como doença renal (GUÉRIN et al., 2000),

obesidade (FU et al., 2013) e doenças cardiovasculares (DCV), as quais têm como principal fator de risco a hipertensão arterial (FRANKLIN et al., 2008). Essa rigidez arterial torna-se ainda mais importante por ser um fator de risco que atinge todas as etnias (GEPNER et al., 2014).

Doenças cardiovasculares ainda são consideradas a maior causa de mortalidade no mundo. Segundo a OMS, só no Brasil, em média 32% dos adultos são hipertensos. Já nos idosos, esta prevalência chega a mais de 50%, para pessoas com idade entre 60 a 69 anos e 75%, em idosos com mais de 75 anos (OMS,2016, 7° Diretriz Brasileira de Hipertensão). Tem sido sugerido que ocorre um aumento da pressão arterial sistólica (PAS), associado a um aumento da rigidez arterial em adultos com idade média de 50 anos ou mais (WALLACE et al., 2007). Concomitante com o aumento da PAS ocorre uma diminuição da pressão arterial diastólica (PAD), tornando essa resposta um grave fator associado a riscos cardiovasculares envolvidos com o processo de envelhecimento.

A pressão de pulso (PP) também é um potente marcador de riscos cardiovasculares, principalmente para infarto do miocárdio e afeta tanto indivíduos hipertensos como normotensos (BENETOS et al.,2002). Tem sido demonstrado que indivíduos que apresentam um índice de massa corpórea alto, bem como maior índice de circunferência abdominal, apresentam um aumento na pressão de pulso central (FU et al., 2013) e o enrijecimento arterial vem sendo considerado um fator determinante tanto para PAS como para PP, independente de morbidade e mortalidade cardiovascular.

Pacientes com doença renal em estado terminal apresentam uma rigidez arterial aumentada, a qual está altamente correlacionada com a calcificação das artérias (GUÉRIN et al., 2000).

Uma vez que a rigidez arterial vem sendo considerada um importante preditor de doenças cardiovasculares e estas têm alto índice de mortalidade mundialmente, é necessário compreender os possíveis mecanismos que causam o enrijecimento arterial, na tentativa de se encontrar estratégias eficazes de avaliação da rigidez.

A partir disso, técnicas foram criadas há mais de um século, segundo Pizzi et al., (2006), para diagnosticar o nível de distensibilidade arterial por meio da velocidade da onda de pulso (VOP), onde:

$$VOP = \frac{\text{Enrijecimento}}{\text{Complacência+elasticidade}}$$

Em humanos, um método amplamente utilizado para análise e registro da VOP é o sistema automático computadorizado Complior® (Complior, Colson, GargerLesGenosse, France- Createch Industrie). Nesta técnica coloca-se o indivíduo na posição supina, e são colocados dois transdutores sensíveis à pressão sobre a pele das partes mais proeminentes das artérias carótida comum direita e femoral direita. O sistema mensura o intervalo de tempo entre o início da onda na carótida e o início da onda femoral, obtendo o dado de velocidade, onde a velocidade de registro é, em média, de 150 mm/s. A medida de distância, em centímetros, entre os transdutores é multiplicada pela velocidade gerando a VOP aórtica.(PIZZI et al.,2006).

Outras técnicas também são utilizadas para analisar a VOP, as quais usam a mesma base de análise, porém com dispositivos distintos, como a ressonância magnética, que funciona com sequencias diferentes de algoritmos de um processo de sinal (GROTHENHUIS et al.,2009), bem como o mapeamento de fluxo Doppler colorido, que atua como uma espécie de ultrassom (HOZUMI et at, 1998). Apesar de eficientes, ambas as técnicas têm um alto custo, demoram muito tempo, necessitam de um profissional altamente treinado e acabam se tornando inviáveis para um exame de rotina.

Na tentativa de otimizar essa análise foi lançado um novo equipamento capaz de mensurar a VOP em humanos, com o mesmo nível de veracidade nos resultados, no entanto, mais rápido, mais prático e ainda menos desconfortável, o que proporciona a obtenção da medida de VOP de maneira simples e eficiente no meio clínico. O novo software chamado de pOpmètri® 1.0, utiliza dos mesmos padrões das técnicas anteriores, calculando o tempo de trânsito do fluxo entre as artérias. Para esta técnica, o indivíduo permanece na posição sentada e são colocados dois sensores, um no dedo indicador da mão direita e outro no dedão do pé direito. Em apenas 20s a velocidade da onda de pulso pode ser mensurada e são obtidas as variáveis tempo de trânsito (TT) e velocidade (V) em m/s (ALIVON et al., 2015). Assim, por ser

uma informação de extrema importância em tão curto tempo, possibilita diagnósticos rápidos e diretos sobre o comportamento do sistema vascular.

Esse aparelho foi validado por Alivon et al., 2015, utilizando teste de comparação com outro equipamento chamado sphygmocor®, um outro teste chamado “teste pressor frio” onde a mão do paciente era exposta a baixas temperaturas e a VOP era mensurada pelo novo dispositivo pOpmétri e pelo já conhecido complior system® e um terceiro teste onde eram feitas 2 medidas no mesmo paciente com 5 minutos de intervalo com o novo dispositivo.

Atualmente, vários autores vêm demonstrando a importância da medida da VOP em humanos, no sentido de correlacioná-la com diferentes doenças e buscar tratamentos mais eficazes. No entanto, estudo em humanos não permitem a avaliação dos possíveis mecanismos que podem influenciar as características dos vasos e, conseqüentemente, a rigidez arterial. Neste sentido, torna-se indispensável a utilização de uma estratégia não invasiva e de equivalente eficiência para animais, para que, após as medidas funcionais, possam ser realizadas investigações histológicas, enzimáticas, proteicas e gênicas nos diferentes vasos.

Em animais, as técnicas utilizadas são baseadas em cálculos matemáticos, os quais utilizam o ciclo cardíaco e a distensibilidade do vaso, contudo é necessário que seja realizada uma canulação do vaso, o que torna um processo invasivo e demorado, além de impedir a utilização do animal ou do vaso para outras análises, seja ela genética, histoquímica ou proteica. (LINDSAY et al., 2016; CANTINI et al., 2011).

Recentemente foi comercializado um aparelho de medida de VOP para animais de pequeno porte, nos mesmos moldes daquele utilizado em humanos, ou seja, rápido, eficiente e não invasivo. No entanto, este equipamento está validado para humanos e torna-se essencial a validação desse equipamento nos animais de pequeno porte.

A enorme vantagem de ter uma técnica não invasiva em animais é poder utilizar o mesmo animal para duas ou mais análises complementares que irão nortear, com maior esclarecimento, as descobertas dos mecanismos e ainda diminuir significativamente o número de animais, sem prejudicar a pesquisa.

Neste sentido, este projeto foi pensado para verificar a correlação do equipamento de medida da velocidade da onda de pulso (pOpmètri® 1.0) em ratos de diferentes idades, nos quais já é sabido que o processo de envelhecimento determina alterações importantes na estrutura dos vasos, as quais podem determinar alterações na VOP (BOUTOUYREE, P. & VERMEERSCH S.J., 2010). A hipótese do trabalho foi que as medidas funcionais se correlacionam com as alterações encontradas na parede dos vasos, o que permite a conclusão de que o aparelho de medida de VOP é confiável.

2. OBJETIVO

Verificar a validade, a fidedignidade e a objetividade do equipamento de medida da velocidade da onda de pulso (pOpmètri® 1.0) em ratos.

2.1 Objetivos específicos:

2.1.1 Correlacionar, no mesmo animal, as medidas da velocidade da onda de pulso (VOP) com os resultados de morfometria das artérias aorta, carótida, renal e femoral em ratos jovens de 1 mês, adultos de 4 meses e idosos de 1 ano (Validade de Critério).

2.1.2 Correlacionar as medidas da velocidade da onda de pulso (VOP) com os resultados da densidade de colágeno na túnica média das artérias aorta, carótida e femoral em ratos jovens de 1 mês, adultos de 4 meses e idosos de 1 ano (Validade de Critério).

2.1.3 Comparar as medidas de VOP obtidas entre dois avaliadores diferentes (fidedignidade – objetividade);

2.1.4 Avaliar se as medidas se mantêm após sucessivas aplicações sobre um mesmo rato no mesmo dia e em dias diferentes (consistência interna e estabilidade, respectivamente).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 48 ratos (Wistar) divididos em 3 grupos: Grupo 1: ratos de 1 mês de idade (Jovens, 100g, n=16); grupo 2: ratos com 4 meses de idade (Adultos, 300 - 350g, n=22) e grupo 3: ratos de 1 ano de idade (Idosos, 500 - 600g, n=10). Todos os animais foram provenientes do Centro de Pesquisa e Produção de animais da UNESP-Botucatu, S.P. Durante o protocolo experimental os animais foram alojados em gaiolas com 2 a 5 animais cada, dependendo do tamanho dos animais, no Biotério de Manutenção da Faculdade de Ciências da UNESP, campus de Bauru, em ciclo claro escuro de 12:12 horas e temperatura controlada de 22°C. Ração e água filtrada foram fornecidas *ad libitum*. Esse projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências de Bauru, da Universidade Estadual Paulista- UNESP, processo nº1098/2016 Vol.1 CEUA/FC (ANEXO 1).

3.1 ANÁLISE DO ENRIJECIMENTO ARTERIAL

Os animais foram pesados e anestesiados com ANASEDAN[®] (cloridrato de xilasina, 10 mg/Kg) e DOPALEN[®] (cloridrato de quetamina, 50 mg/Kg), VETBRANDS do Brasil e posicionados em decúbito ventral sobre uma placa aquecedora (45° C, Bonther, Ribeirão Preto, SP). Em seguida, os sensores para avaliar a VOP foram posicionados no membro torácico e o outro no membro pélvico do animal, como demonstrado na Figura 2 (painel superior): Posteriormente foi medida a distância entre os dois sensores (em centímetros) para a calibração do aparelho e iniciada a medição. A Figura 2 (painel inferior) ilustra o sinal das ondas de pulso dos membros superiores (preto) e inferiores (verde). A diferença entre a base da onda de fluxo do membro torácico e a base da onda de fluxo do membro pélvico é determinada e calculada a VOP (m/s). Estas medidas foram realizadas pelo dispositivo recentemente lançado para animais de pequeno porte. A velocidade da onda de pulso foi analisada em 10 segundos, utilizando-se o software pOpmètri[®] 1.0 (TousDroits reserves[®], Axelife SAS 2013). Foram realizadas 10 medidas por animal.

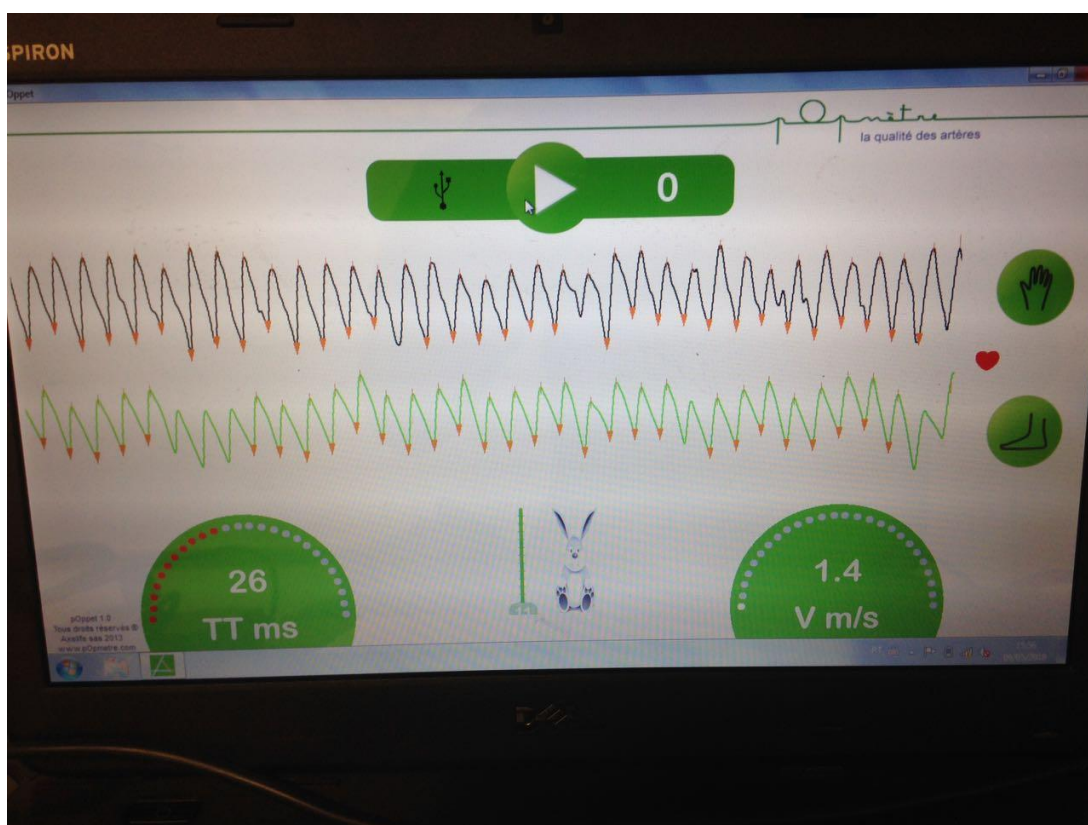


Figura 2: Painel superior: posicionamento correto dos sensores nos membros torácico e pélvico do animal anestesiado, colocado sobre a cama aquecedora. Painel inferior: Imagem da onda de pulso, capturada pelo software pôpmetri®1.0, após 10s de análise, para o cálculo da velocidade da onda de pulso (VOP).

3.2 PREPARAÇÃO DOS TECIDOS PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA

Após 48 horas do experimento funcional (VOP), os ratos foram pesados novamente e profundamente anestesiados com ANASEDAN[®] (cloridrato de xilasina, 20 mg/Kg) e DOPALEN[®] (cloridrato de quetamina, 160 mg/Kg), VETBRANDS do Brasil. Imediatamente após a parada respiratória, foi realizada uma incisão ventral, na linha mediana da região torácica, com abertura do tórax, expondo o coração para que os animais fossem perfundidos. A perfusão foi realizada utilizando uma bomba peristáltica (Milan). A mangueira que passa pela bomba tem uma agulha na ponta, a qual foi inserida no ápice do ventrículo esquerdo. Após realizar um pequeno corte no átrio direito para escoamento do sangue, foi iniciada a perfusão, com solução salina estéril (para retirada do sangue) e, posteriormente, a perfusão foi realizada com ~200 mL de solução paraformaldeído a 4%, tamponado em PBS (em capela com exaustão)¹. Em seguida, foi realizada a retirada dos vasos: aorta torácica, artéria carótida comum esquerda, artéria renal esquerda, e artéria femoral esquerda. Foi utilizado o segmento descendente da aorta torácica, de aproximadamente 5 mm, retirado a partir do ápice do arco da aorta. Também foi retirado um segmento de 5 mm da artéria femoral esquerda, a partir da região inguinal. O segmento da artéria carótida comum esquerda (3 mm) foi retirado abaixo da bifurcação, evitando-se a coleta do seio carotídeo. A artéria renal esquerda, cerca de aproximadamente 3 mm, foi coletada a partir da aorta abdominal antes da penetração no rim. Após a remoção, os segmentos arteriais foram pós-fixados em solução de paraformaldeído 4%, tamponado com PBS.

Após aproximadamente um mês, os vasos foram cortados ao meio, lavados em água corrente e divididos em duas análises. Uma parte passou por um processo de desidratação em álcool 70% e emblocagem, como descrito anteriormente (SAFAR et al, 2001). Em resumo, o processo de desidratação seguiu as etapas: os vasos permaneceram por 15 minutos no álcool 90% (2x), 15 min no álcool 95% (2x), 15 min no álcool 100% (3x) e 20 min em xilol (3X) concluindo o processo de desidratação. Imediatamente após, deu-se início o processo de emblocagem dos vasos, utilizando paraplast (Paraplast Plus[®]

¹ Esta etapa foi realizada em colaboração com a Profa. Maria Tereza Jordão, no laboratório da profa Lisete Michelini, no Instituto de Ciências Biomédicas, USP/SP.

McCormick Scientific), dentro de uma estufa, aquecida a 60°C, conforme as seguintes etapas: 20 minutos em paraplast I, paraplast II e paraplast III e por fim, os vasos foram emblocados em formas de gelo, de maneira horizontal, com paraplast de emblocar.

Na sequência, foram feitos cortes transversais em micrótomo (10 µm), os quais foram colocados em lâminas (média de 7 cortes por lâmina, 2 lâminas por animal, totalizando uma média de 14 cortes por rato).

A outra parte dos vasos foi emblocada em *tissue-tek O.C.T.*, mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenada em freezer a -80°C. Posteriormente foram realizados 10 cortes transversais por vaso, no criostato (5 µm) os quais foram agrupados em 1 lâminas por rato.

3.3 MORFOMETRIA DA AORTA TORÁCICA, ARTÉRIA CARÓTIDA COMUM, ARTÉRIA RENAL E ARTÉRIA FEMORAL

Todos os cortes colocados nas lâminas foram corados com a técnica de Hematoxilina e Eosina (HE), como descrito anteriormente (HERRERA et al, 2016) e cobertos com lamínulas, utilizando *entellan mounting medium*. Em seguida, as imagens foram capturadas em imagens de 4080 x 3072 µm² pelo microscópio de luz Olympus Bx50, utilizando o programa DP Controller (DP70), com objetiva de 10x para artérias carótida, femoral e renal e objetiva de 4x para artéria aorta, de acordo com o tamanho do vaso, garantindo uma boa e completa visualização dos cortes.

Os cortes com ranhuras, dobras ou bolhas foram excluídos, de forma que foram utilizadas de oito a dez imagens por rato, de cada vaso.

Posteriormente, foram realizadas as medidas morfométricas dos diferentes vasos, utilizando o programa *Image J*. A Figura 3 ilustra como as medidas foram realizadas. Inicialmente foram feitas as medidas de perímetro interno (Figura 3, parte superior) e externo (Figura 3, parte inferior) com unidades em pixels e, por meio de calibração, foram transformados em micrômetros (µm). A partir dos resultados de perímetro em µm, foram calculados os valores de área ($A = \pi \cdot r^2$), raios interno e externo ($R = P/2\pi$) e diâmetros interno e externo ($D=2 \cdot r$).

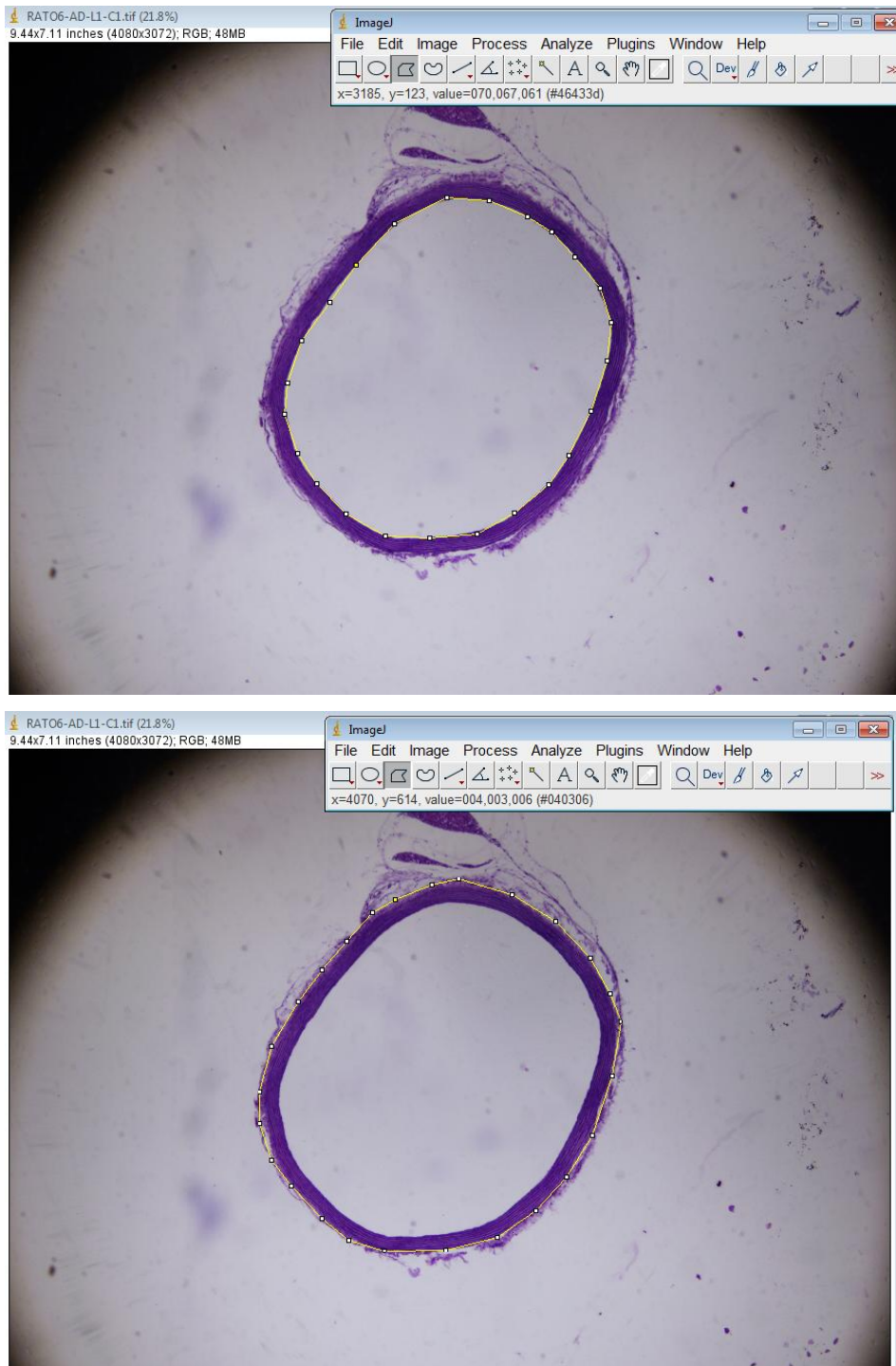


Figura 3: Imagem da delimitação de perímetro interno (superior, amarelo) e perímetro externo (inferior, amarelo) em pixels pelo software Image J.

A partir dos valores de diâmetros foram calculadas as seguintes medidas: área de secção transversa externa (ASTe) e área de secção transversa interna (ASTi). Ainda utilizando os valores de diâmetro, foi calculada a espessura da parede do vaso $[(D. \text{ externo} - D. \text{ interno}) / 2]$ e razão parede/luz (Parede / D.

interno). Todas as medidas morfométricas foram expressas em micrômetros (μm) ou micrômetros ao quadrado (μm^2).

3.4 QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENO

Outro grupo de animais foi perfundido transcárdicamente, da mesma forma que descrito anteriormente, mas os vasos foram protegidos com *tissue tek* e imediatamente congelados a -80°C . Foram realizados cortes histológicos de 5 μm em criostato gelado e coradas com a técnica de Picrosirius Red, como descrito anteriormente (SANTANA et al., 2014) para quantificação de colágeno.

Na sequência, foi realizada uma recuperação antigênica (expondo o antígeno que deseja estudar e facilitando sua ligação ao anticorpo específico). Foi utilizado o método A-B-D (Estreptavidina-Biotina-Peroxidase). O bloqueio de peroxidase endógena foi feito com H_2O_2 a 3%. As artérias foram incubadas a temperatura de 4°C com anticorpos primários (COL IV- Rabbit, Chemicon Internacional®, diluição 1: 300), diluídos em um bloqueador (BSA-Albumina de soro bovino) a 3% por 18H (overnight).

Em seguida foi feita a incubação com o anticorpo secundário (anti-rabbit, Vector®, 1:1000) e seguiu a marcação com estreptavidina conjugada com HRP (Kit Vectastain Elite ABC Universal – Vector Laboratories®). Posteriormente foi realizada a contracoloração com Hematoxilina e a revelação da marcação usando DAB (3,3 diaminobenzidina) como cromógeno (Kit DAB Substrate for Peroxidase – Vector Laboratories®)

Reações de controle negativo foram preparadas omitindo o anticorpo primário em uma fatia para cada vaso (VIEGAS, K. A. S., 2012; SANTANA et al., 2014)

Em seguida, as imagens foram capturadas em imagens de $2048 \times 1532 \mu\text{m}^2$ pelo microscópio de luz Olympus Bx43-SC30, utilizando o programa CellSens standard (2009-2015), com objetiva de 40x para todas as artérias, capturando 1 dos quadrantes da extremidade de cada corte, garantindo uma boa visualização dos cortes.

As partes dos cortes com ranhuras, dobras ou bolhas foram excluídas, de forma que foram utilizadas 4 fotos por vaso e 5 vasos por rato, totalizando 20 fotos por rato de cada grupo.

Posteriormente, foram realizadas as medidas dos diferentes vasos, utilizando o programa *Image J* pela de porcentagem de pixels.

3.5 ANÁLISE DE FIDEDGNIDADE (OBJETIVIDADE) e CONSISTÊNCIA INTERNA

Um grupo extra de animais (n=6) foi utilizado para a realização das análises de fidedignidade. Segundo Thomas, Nelson e Silverman (2011), existem 3 tipos de coeficientes de fidedignidade: **estabilidade** (teste-reteste em dias diferentes), **formas alternadas** (dois testes diferentes) e **consistência interna** (teste-reteste no mesmo dia). Na impossibilidade de realizar dois testes diferentes, o presente trabalho avaliou a estabilidade e a consistência interna dos resultados obtidos pelo software pOpmètri® 1.0. Além disso, foi observada a **objetividade** (fidedignidade entre avaliadores).

Análise 1: Consistência interna: intra-avaliador: o mesmo avaliador executou 10 medidas no mesmo animal (1), retirou os sensores do rato e desconectou o equipamento da tomada de energia. Após 2 minutos, reconectou os sensores e equipamento e realizou mais 10 medidas (re-teste - 2).

Análise 2: Estabilidade: A análise 1 foi realizada novamente no dia seguinte (teste-reteste em dias diferentes)

Análise 3: fidedignidade (objetividade) entre avaliadores: inter-avaliador: dois avaliadores executaram os mesmos procedimentos realizados na análise 1 e 2 e seus resultados foram comparados entre si.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são apresentados em média \pm EPM. Para os dados de peso corporal, velocidade da onda de pulso, análises morfométrica e histoquímica dos vasos foi utilizada análise de variância (ANOVA) de um caminho, com *post-hoc* de Tukey. Os dados funcionais (VOP) foram correlacionados com as medidas morfométricas e histoquímicas utilizando o teste de correlação de Pearson. O programa G*Power 3.1.9.2 foi utilizado para determinar o tamanho do efeito (2,82) e poder de teste (1,0) para os resultados de VOP. Foi usado *test t-student* para análise de validade, fidedignidade e objetividade. Nível de significância considerado para todas as análises foi de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

A Figura 4 mostra os valores de peso corporal (PC) de todos os grupos ao final do protocolo experimental. Pode-se observar que os grupos apresentaram PC diferentes, os quais foram maiores de acordo com as idades ($81 \pm 1,83$ g, $424 \pm 10,89$ g e $566 \pm 15,06$ g, para jovens, adultos e idosos, respectivamente, $p < 0,05$).

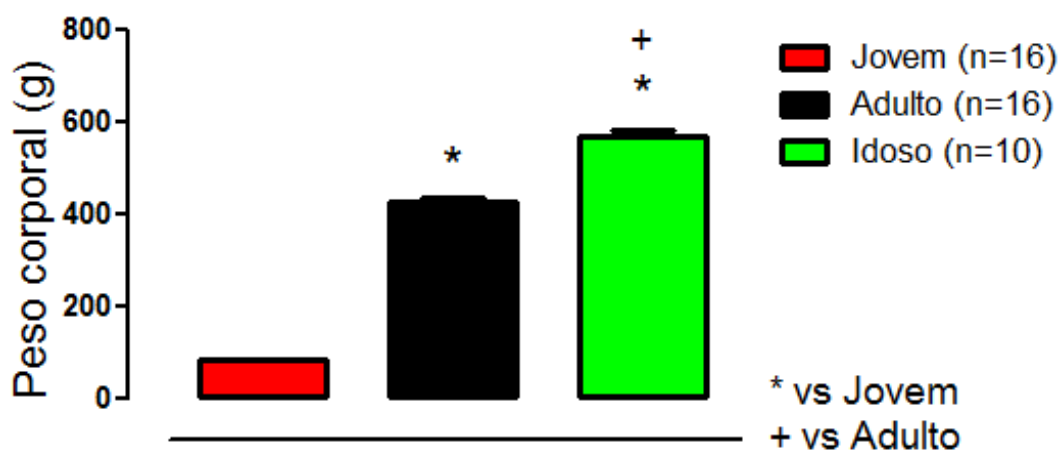


Figura 4: Peso corporal do grupo jovem (n=16), do grupo adulto (n=16) e do grupo idoso (n=10). Significância: + vs adulto, * vs jovem. $p < 0,05$

A figura 5 revela um aumento gradativo da velocidade da onda de pulso (VOP) entre os grupos: o grupo jovem obteve uma média de $1,20 \pm 0,028$ m/s, o grupo adulto de $1,76 \pm 0,065$ m/s e o grupo idoso $2,22 \pm 0,108$ m/s.

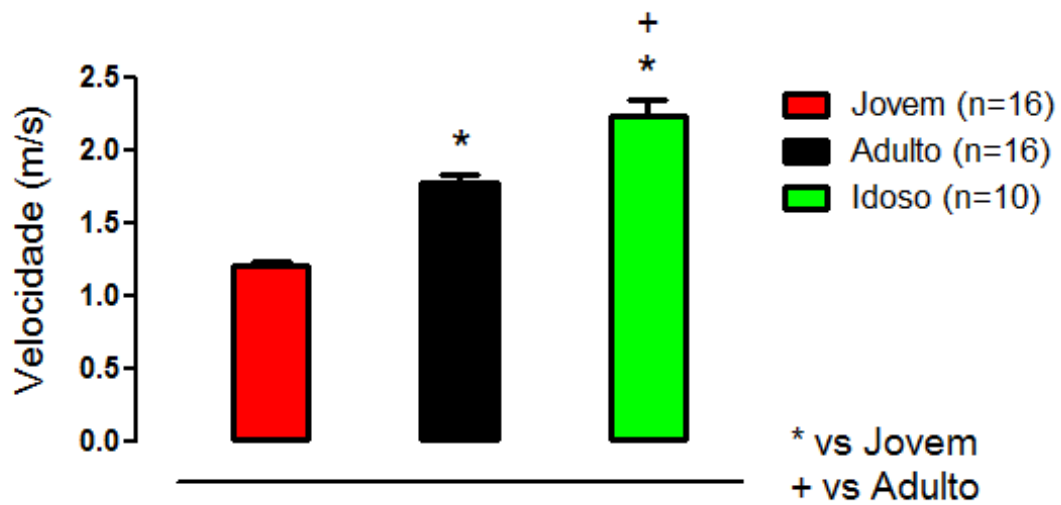


Figura 5: Velocidade da onda de pulso (VOP) do grupo jovem (n=16), do grupo adulto (n=16) e do grupo idoso (n=10). Significância: + vs adulto, * vs jovem. $p < 0,05$

A figura 6 ilustra imagens representativas da artéria aorta (cortes transversais de 10 μm , coradas com HE) dos grupos jovem, adulto e idoso, respectivamente.

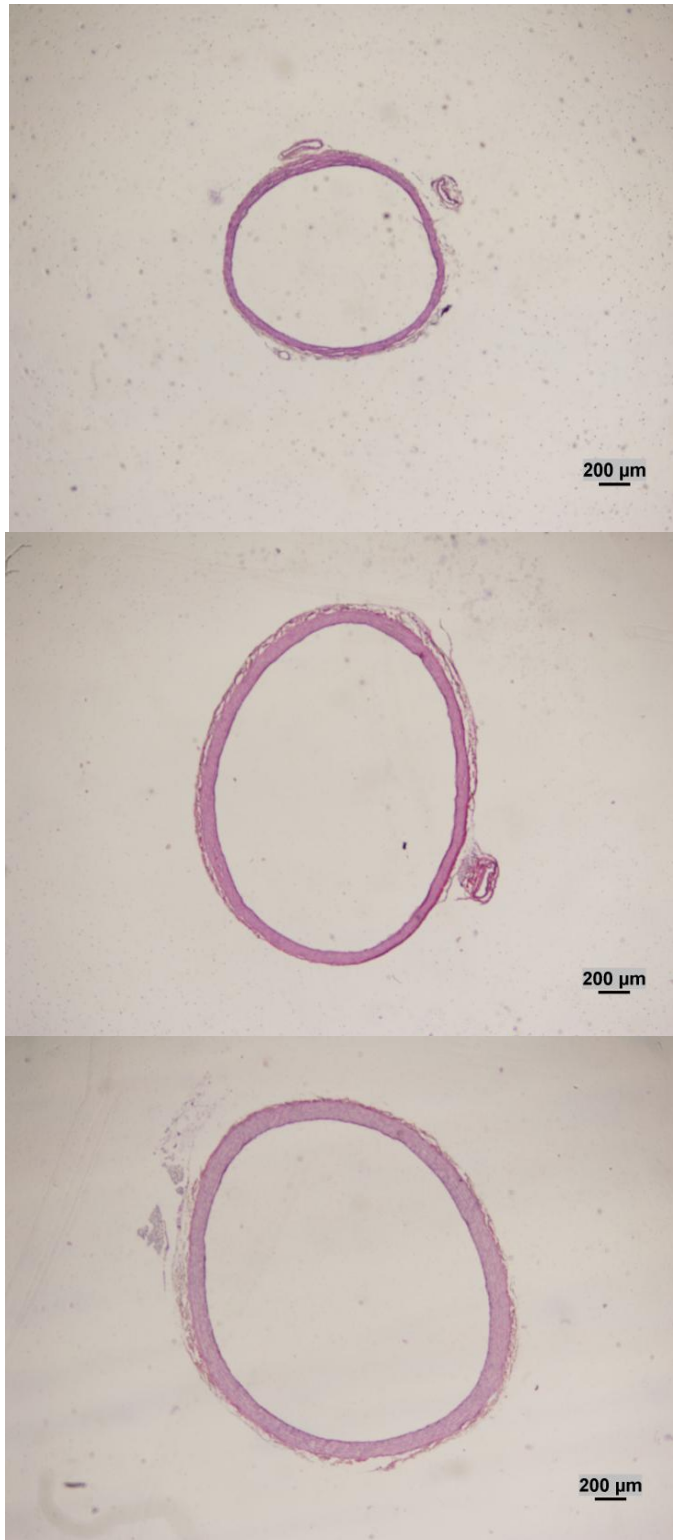


Figura 6: Fotos de cortes transversais histológicos (10 μm) corados com HE, obtidos a partir de fragmentos da artéria aorta de 1 rato de cada grupo (superior: jovem; central: adulto e inferior: idoso). Objetiva de 4X.

A Tabela 1 demonstra os valores de medidas morfométricas na artéria aorta. Como descrito nos métodos, a partir dos valores de perímetro, foi possível calcular as medidas de diâmetro interno, diâmetro externo, espessura da parede do vaso, razão parede/luz, área de secção transversa externa (ASTe) e área de secção transversa interna (ASTi) dos vasos.

Pode-se observar, na Tabela 1, um aumento significativo de 293% no diâmetro interno da artéria aorta do grupo jovem para o grupo idoso, acompanhado de um aumento significativo de 243% do diâmetro externo entre os mesmos grupos. Esta resposta determinou um aumento de 129% da área de secção transversa interna e 151% da área de secção transversa externa que, da mesma forma, foram significativos. Os valores de espessura da parede não se alteraram entre os grupos, no entanto houve uma diminuição significativa da razão parede/luz entre o grupo jovem e idoso.

Tabela 1 – Análise morfométrica da artéria Aorta torácica nos grupos jovem (J), adulto (A) e idoso (I).

	DI (μm)	DE (μm)	PAREDE (μm)	RAZÃO PAREDE / LUZ	ASTe (μm^2)	ASTi (μm^2)
J	1213,96 \pm 27,8	1382,40 \pm 33,9	84,21 \pm 3,4	0,06 \pm 0,0	1508178,8 \pm 75358,8	1162428,7 \pm 54267,8
A	1165,02 \pm 165,6	1291,96 \pm 180,0	63,46 \pm 7,4	0,05 \pm 0,0	1565224,5 \pm 381275,8	1280774,9316344,7
I	1931,68 \pm 22,6*	2143,20 \pm 28,0*	105,75 \pm 5,2	0,05 \pm 0,0*	3609288,1 \pm 95067,9*	2937799,88 \pm 69857,9*

Valores em média \pm EPM. AT= aorta torácica; DI= diâmetro interno; DE= diâmetro externo; parede = espessura da parede; ASTe = área de secção transversa externa; ASTi = área de secção transversa interna; J = jovem; A = Adulto; I = idoso. Significância: * vs jovem, $p < 0,05$.

A figura 7 ilustra imagens representativas da artéria carótida (cortes transversais de 10 μm , coradas com HE) dos grupos jovem, adulto e idoso, respectivamente. Pode observar um aumento gradativo do tamanho dos vasos entre os diferentes grupos.



Figura 7: Fotos de cortes transversais histológicos (10µm) corados com HE, obtidos a partir de fragmentos da carótida comum de 1 rato de cada grupo (superior: jovem; central: adulto e inferior: idoso). Objetiva de 10X.

Da mesma forma, a Tabela 2 mostra o resultado dos cálculos realizados nas imagens da artéria carótida comum. Pode-se observar um aumento

significativo de 48% de diâmetro interno e de 39% de diâmetro externo do grupo jovem para o idoso. Conseqüentemente houve um aumento significativo de 119% da área de secção transversa interna e 94% da área de secção transversa externa. Da mesma forma que o observado na artéria aorta, os valores de espessura da parede não se alteraram significativamente entre os grupos, no entanto, houve uma diminuição significativa da razão parede/luz entre o grupo jovem e idoso.

Tabela 2. Análise morfométrica da artéria carótida comum dos grupos jovem (J), adulto (A) e idoso (I) em todos os grupos analisados.

	DI (μm)	DE (μm)	PAREDE (μm)	RAZÃO PAREDE / LUZ	ASTe (μm^2)	ASTi (μm^2)
J	596,79 \pm 17,1	690,40 \pm 20,1	46,80 \pm 1,8	0,07 \pm 0,0	376862,49 \pm 22149,2	281570,34 \pm 16282,1
A	704,49 \pm 48,0	796,01 \pm 54,8	45,75 \pm 5,1	0,06 \pm 0,0	521299,61 \pm 49546,5	410585,53 \pm 39293,5
I	883,33 \pm 36,6*	963,33 \pm 37,1*	39,99 \pm 1,0	0,04 \pm 0,0*	732094,22 \pm 57314,0*	615996,4 \pm 51995,2*

Valores em média \pm EPM. CC=carótida comum; DI= diâmetro interno; DE= diâmetro externo; Parede: espessura da parede; ASTe = área de secção transversa externa; ASTi =área de secção transversa interna; J = jovem; A = Adulto; I = idoso. Significância: * vs jovem, $p < 0,05$.

A figura 8 ilustra imagens representativas da artéria femoral (cortes transversais de 10 μm , coradas com HE) dos grupos jovem, adulto e idoso, respectivamente. Pode observar um aumento gradativo do tamanho dos vasos entre os diferentes grupos.

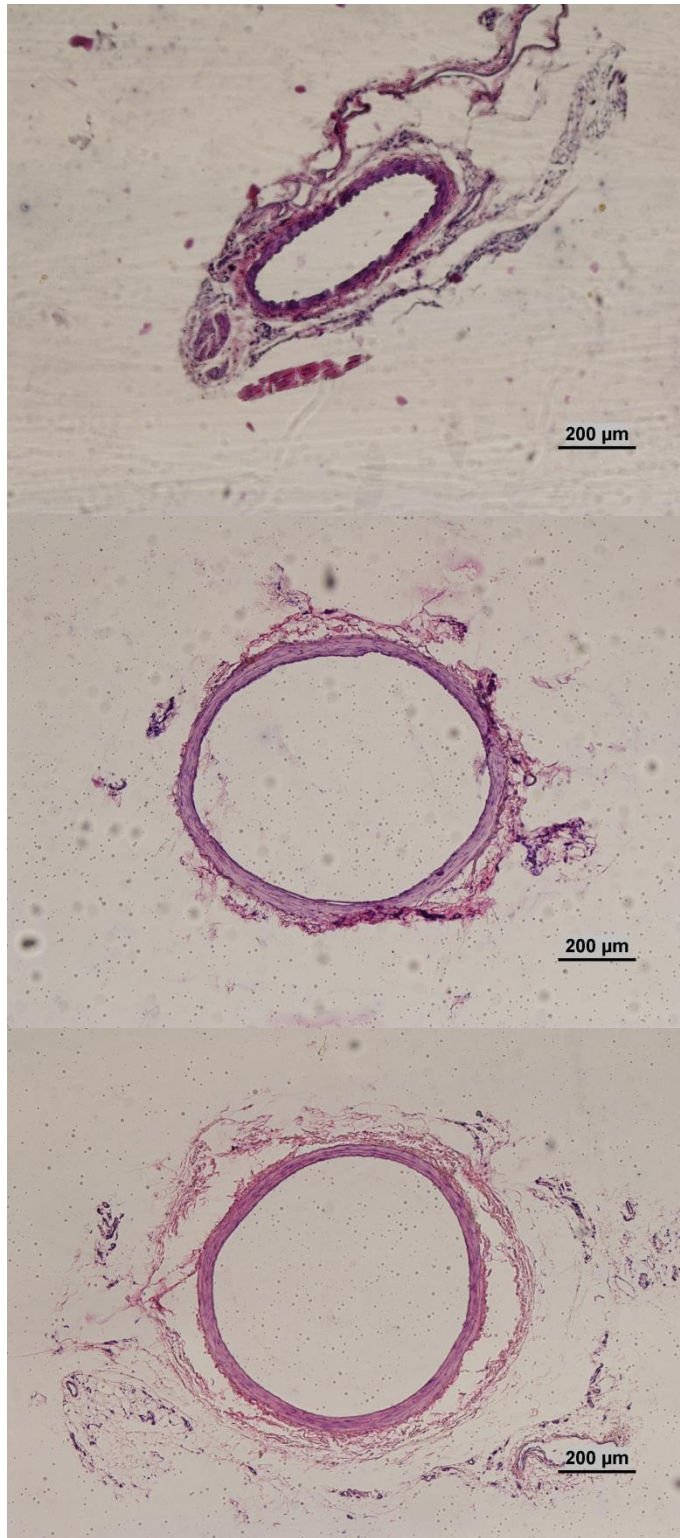


Figura 8: Fotos de cortes transversais histológicos (10 μ m) corados com HE, obtidos a partir de fragmentos da artéria femoral de 1 rato de cada grupo (superior: jovem; central: adulto e inferior: idoso). Objetiva de 10X.

Pode-se observar na Tabela 3 que a artéria femoral também apresentou um aumento em suas medidas entre os grupos analisados, no entanto em uma proporção menor, mas significativa, ou seja, houve 58% de aumento no diâmetro interno e 12% no diâmetro externo. Estes aumentos determinaram um aumento significativo de 1136% da área de secção transversa interna e apenas 62% da área de secção transversa externa. Comparando-se os grupos idoso e jovem, a espessura da parede da artéria femoral permaneceu praticamente igual e a razão parede/luz sofreu uma diminuição significativa do grupo jovem comparado ao idoso.

Tabela 3 – Análise morfométrica da artéria femoral dos grupos jovem (J), adulto (A) e idoso (I).

	DI (μm)	DE (μm)	PAREDE (μm)	RAZÃO PAREDE / LUZ	ASTe (μm^2)	ASTi (μm^2)
J	393,69 \pm 17,7	474,03 \pm 14,2	40,17 \pm 2,3	0,10 \pm 0,0	178350,18 \pm 10525,2	124479,63 \pm 10882,5
A	529,93 \pm 33,7	602,89 \pm 37,2	36,48 \pm 2,7	0,06 \pm 0,0	326155,98 \pm 24349,4	252903,93 \pm 20065,1
I	623,35 \pm 222,3*	532,58 \pm 15,3*	37,34 \pm 5	0,06 \pm 0,0*	290643,14 \pm 19900,4*	1539141,93 \pm 22158,7*

Valores em média \pm EPM. AF= artéria femoral; DI= diâmetro interno; DE= diâmetro externo; parede = espessura da parede; ASTe = área de secção transversa externa; ASTi = área de secção transversa interna; J = jovem; A = Adulto; I = idoso. Significância: * vs jovem, $p < 0,05$.

A figura 9 ilustra imagens representativas da artéria renal (cortes transversais de 10 μm , coradas com HE) dos grupos jovem, adulto e idoso, respectivamente. Pode observar um aumento gradativo do tamanho dos vasos entre os diferentes grupos.

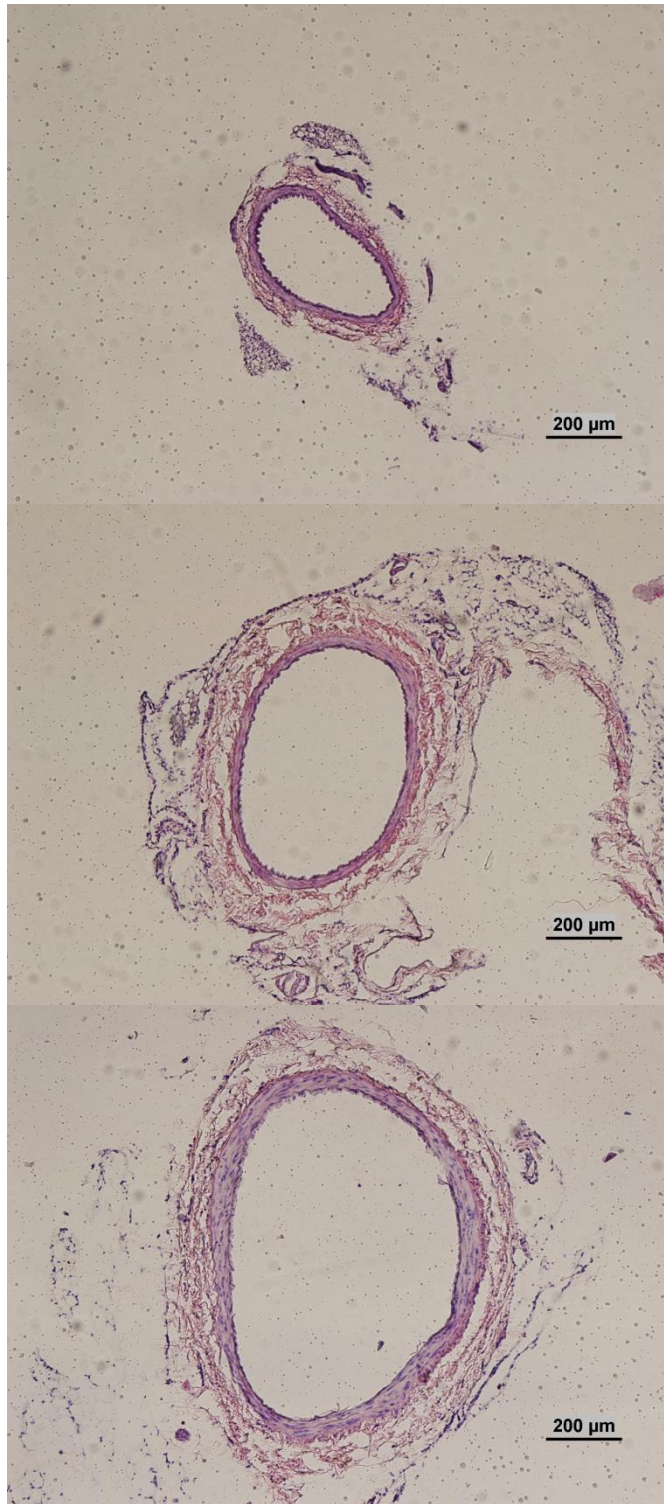


Figura 9: Fotos de cortes transversais histológicos (10 μ m) corados com HE, obtidos a partir de fragmentos da artéria renal de 1 rato de cada grupo (superior: jovem; central: adulto e inferior: idoso). Objetiva de 10X.

Conforme observado nos demais vasos analisados anteriormente, a Tabela 4 demonstra que a artéria renal apresentou um aumento significativo de 134% no diâmetro interno do grupo idoso, quando comparado com o grupo jovem e de 88% no diâmetro externo. Estes valores determinaram um aumento significativo de 387% na área de secção transversa interna e de 251% na área de secção transversa externa. A espessura da parede da artéria renal não apresentou nenhuma diferença entre os grupos, no entanto e a razão parede/luz teve uma queda significativa de 73% do grupo jovem para o idoso.

Tabela 4. Análise morfométrica da artéria renal dos grupos jovem (J), adulto (A) e idoso (I).

	DI (μm)	DE (μm)	PAREDE (μm)	RAZÃO PAREDE / LUZ	ASTe (μm^2)	ASTi (μm^2)
J	266,82 \pm 30,5	370,55 \pm 28,8	51,86 \pm 3,8	0,22 \pm 0,0	110987,57 \pm 16621,5	63158,72 \pm 13474,4
A	544,34 \pm 12,1	642,48 \pm 10,8	44,60 \pm 5,7	0,08 \pm 0,0	326587,59 \pm 11021,0	234820,20 \pm 11186,2
I	623,35 \pm 22,3*	698,08 \pm 15,3*	37,34 \pm 5,6	0,06 \pm 0,0*	390206,98 \pm 19900,4*	307828,38 \pm 22158,7*

Valores em média \pm EPM. AR= artéria renal; DI= diâmetro interno; DE= diâmetro externo; parede: espessura da parede. ASTe= área de secção transversa externa; ASTi = área de secção transversa interna; J = jovem; A = Adulto; I = idoso. Significância: * vs jovem, $p < 0,05$.

A figura 10 foi construída para ilustrar o processo que ocorreu nas artérias avaliadas nos grupos jovens, adultos e idosos, representando um aumento do diâmetro interno e externo, o que resultou em um aumento da área de secção transversa interna e externa. A Figura, baseada nos estudo de Mulvany (1996), demonstra que houve um crescimento do vaso como um todo durante o processo de crescimento/envelhecimento, com manutenção da espessura da parede. Esta Figura ilustra o comportamento observado em todos os vasos avaliados neste presente trabalho.

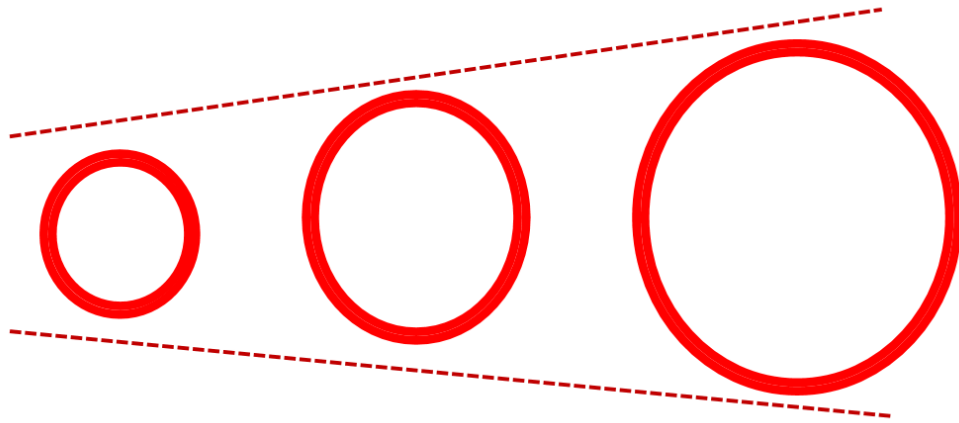


Figura 10: Desenho ilustrativo, baseado nas recomendações de Mulvany (1996), resultante das alterações ocorridas nos vasos com o passar da idade, entre jovens, adultos e idosos.

As Figuras 11, 13 e 15 ilustram os cortes histológicos corados com picrosirius red, representativos de cada grupo, nas artérias aorta, carótida e femoral, respectivamente.

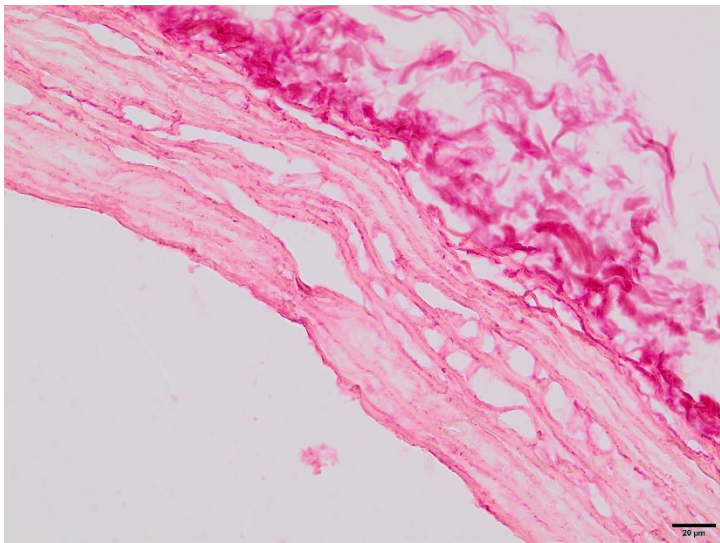
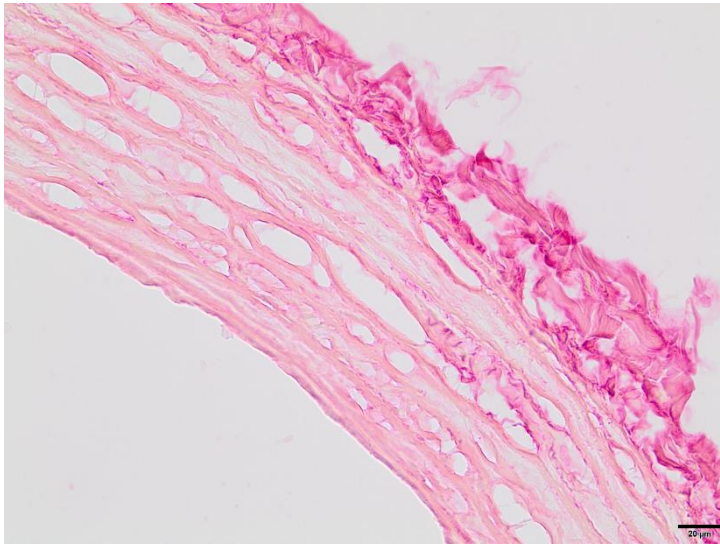
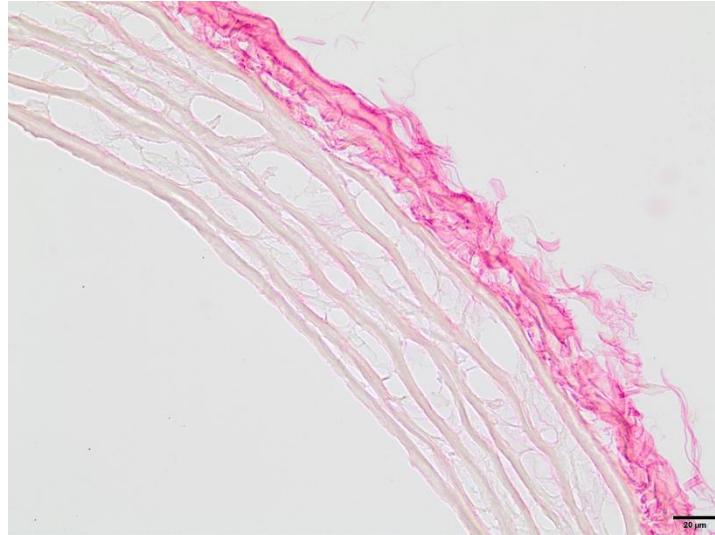


Figura 11: Fotos de cortes transversais histológicos (5 μm) corados com Picrosirius Red, objetiva de 40x, obtidos a partir de fragmentos da artéria aorta de 1 rato de cada grupo (Superior: jovem, central: adulto e inferior: idoso)

A Figura 12 mostra que houve um aumento significativo de 276% na expressão de colágeno na camada média das aortas, entre os grupos jovens e idosos.

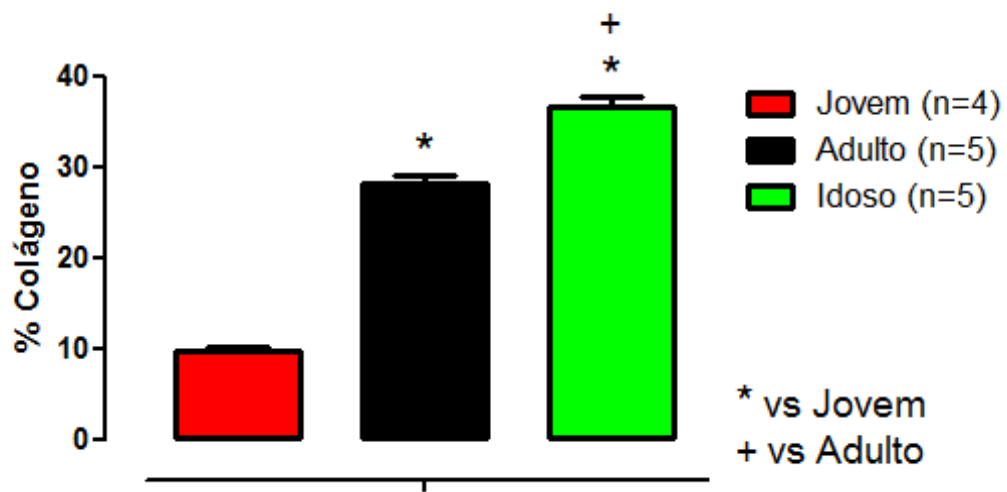


Figura 12: Percentual de colágeno na camada média da artéria aorta dos grupos jovem (n=4), adulto (n=5) e idoso (n=5). Significância: + vs adulto, * vs jovem. $p < 0,05$

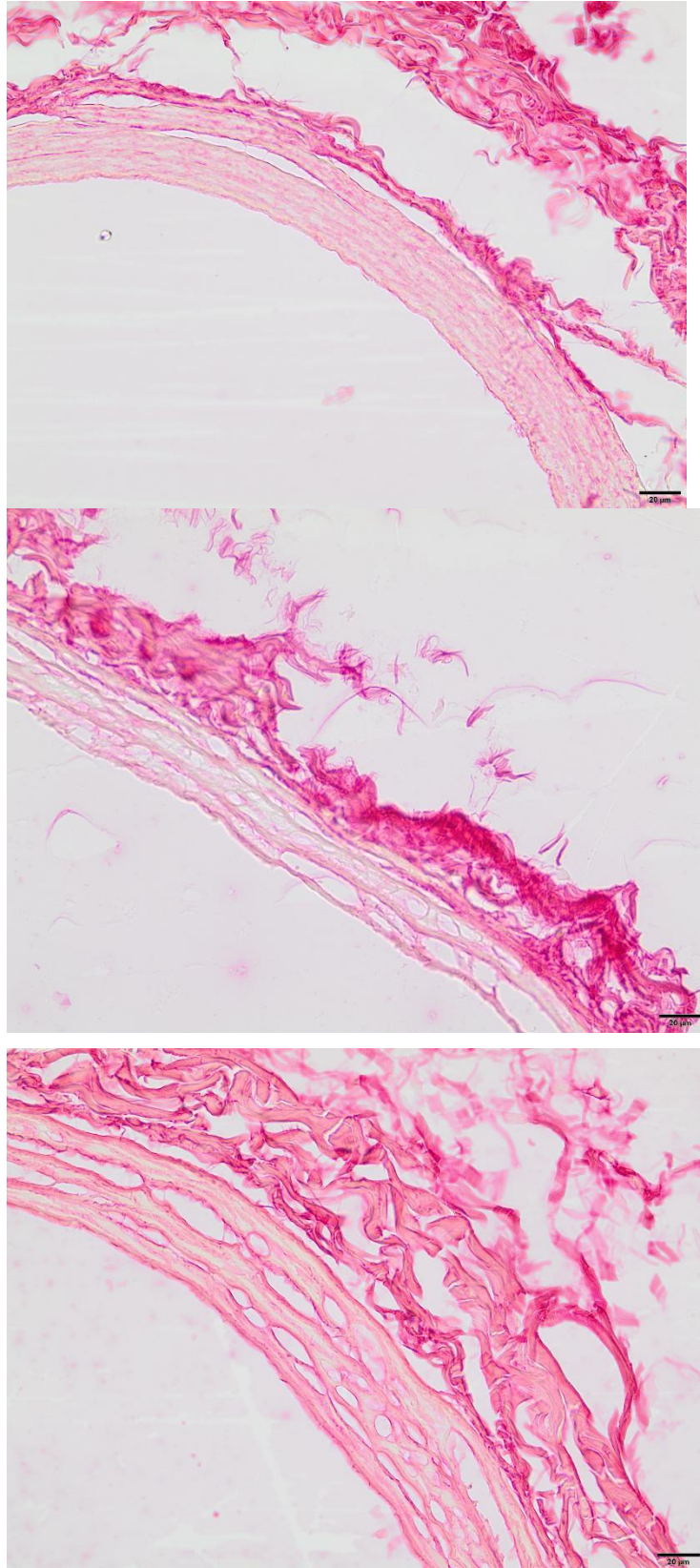


Figura 13: Fotos de cortes transversais histológicos (5 µm) corados com Picrosirius Red, objetiva de 40x, obtidos a partir de fragmentos da artéria carótida de 1 rato de cada grupo. (Superior: jovem, central: adulto e inferior: idoso)

A Figura 14 mostra que houve aumento de 290% na expressão de colágeno na camada média da artéria carótida entre os grupos jovem e idoso.

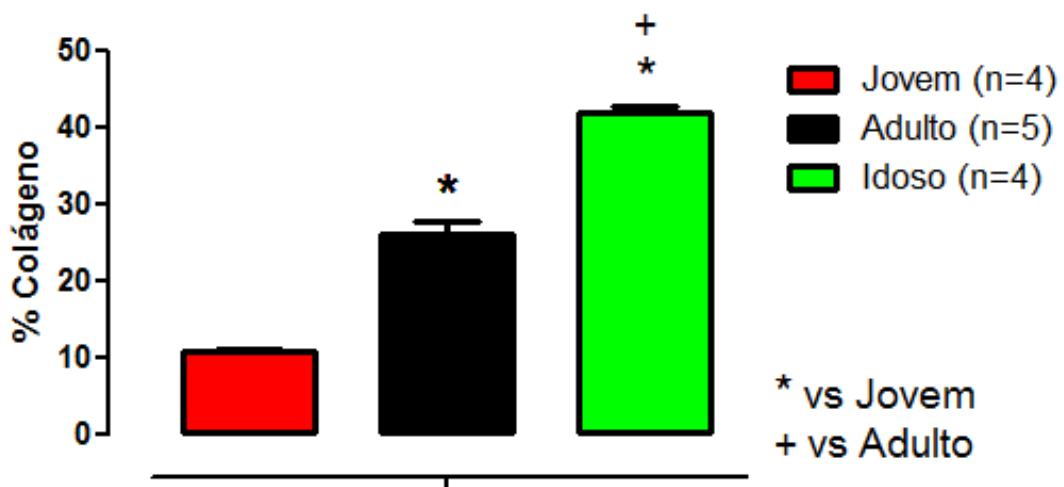


Figura 14: Percentual de colágeno na camada média da artéria carótida do grupo jovem (n=4), do grupo adulto (n=5) e do grupo idoso (n=4). Significância: + vs adulto, * vs jovem. $p < 0,05$

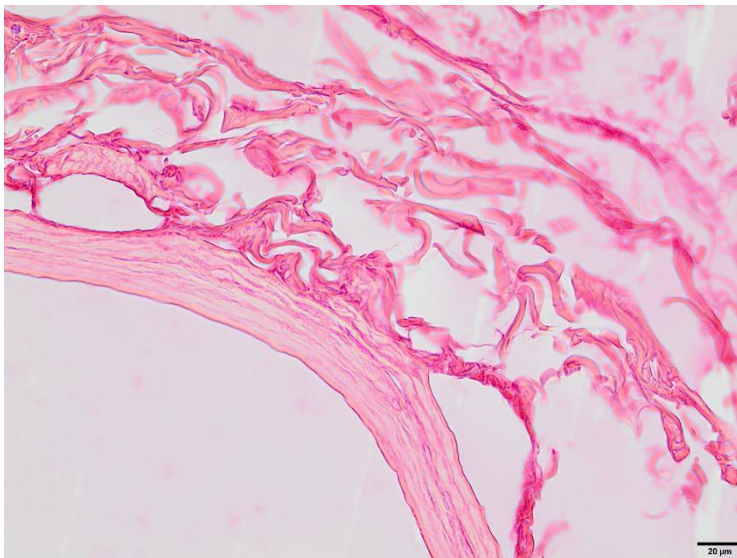
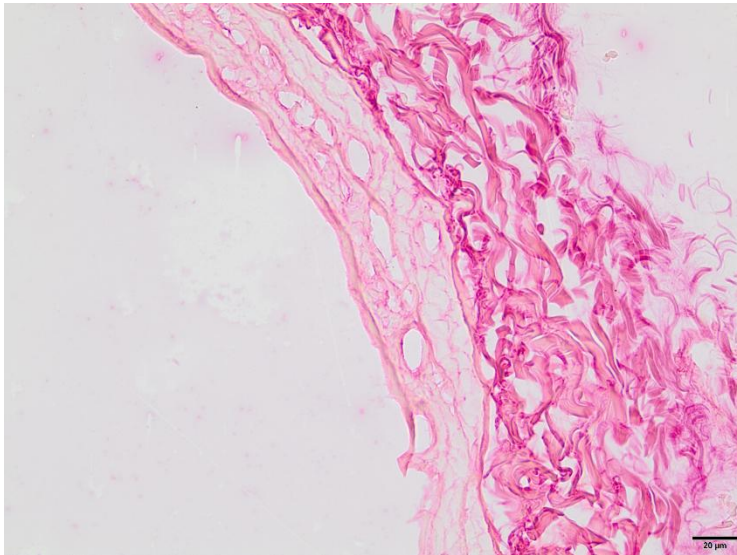
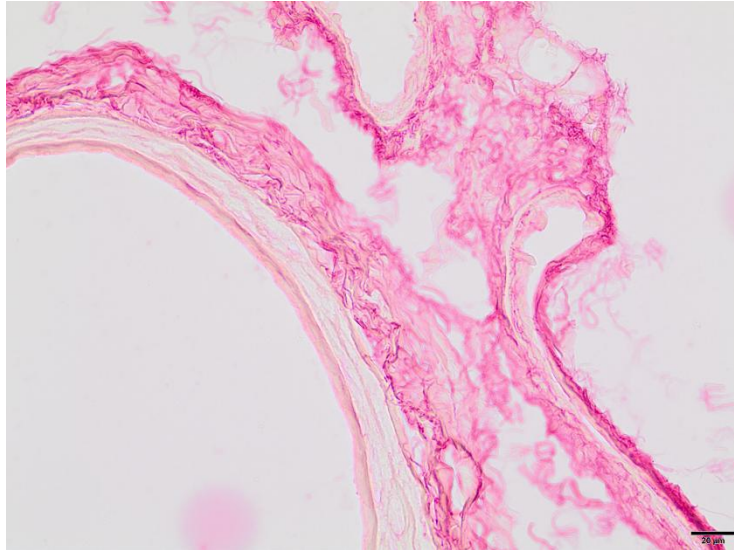


Figura 15: Fotos de cortes transversais histológicos (5 μm) corados com Picrosirius Red, objetiva de 40x, obtidos a partir de fragmentos da artéria femoral de 1 rato de cada grupo. (Superior: jovem, central: adulto e inferior: idoso)

A Figura 16 mostra que houve aumento 234% no percentual de colágeno na camada média da arterial femoral, entre os grupos jovem e idoso.

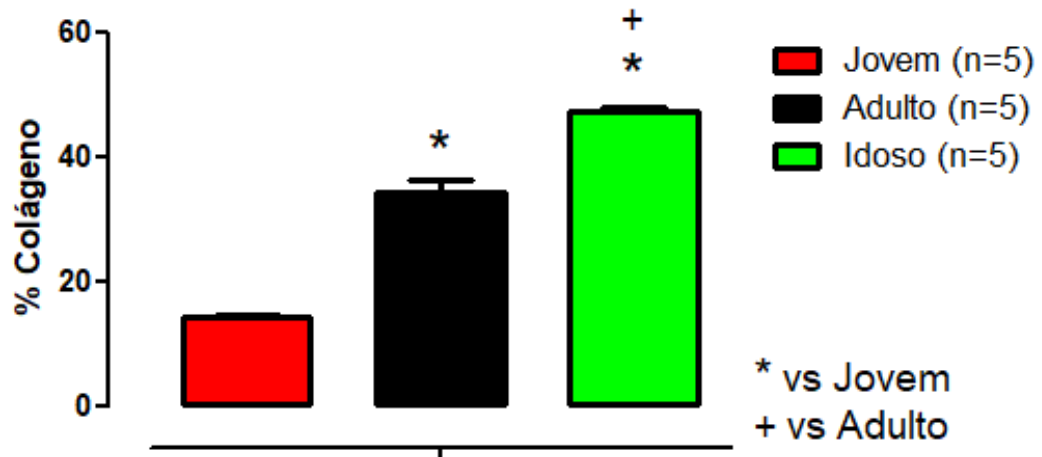


Figura 16: Percentual de colágeno na camada média da artéria femoral do grupo jovem (n=5), do grupo adulto (n=5) e do grupo idoso (n=5). Significância: + vs adulto, * vs jovem. $p < 0,05$

As correlações entre os valores de VOP e as medidas morfométricas de área de secção transversa externa estão apresentadas na Figura 17 (correlação da área de secção transversa externa com a artéria aorta (A), carótida comum (B), artéria femoral (C) e a artéria renal (D)). Pode-se observar que houve correlação positiva e significativa em todos os vasos analisados, sugerindo uma associação entre VOP e AST externa nas diferentes idades.

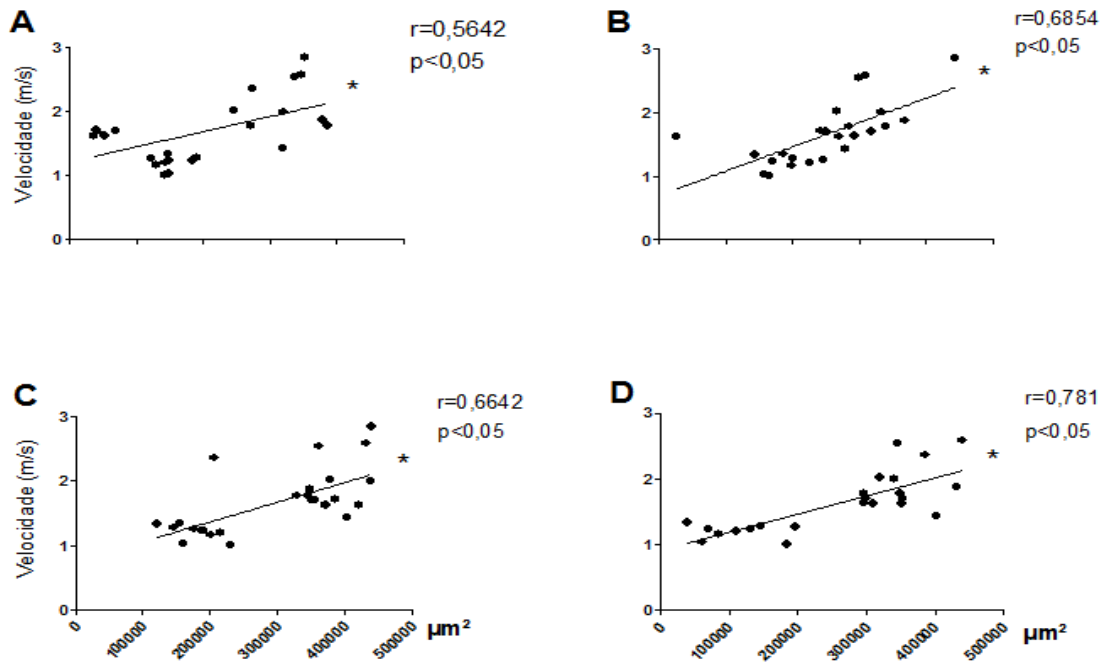


Figura 17: Correlação positiva entre a medida de área de secção transversa externa da artéria aorta, $r=0,5642$ (A), carótida comum, $r=0,6854$ (B), femoral, $r=0,6642$ (C) e renal, $r=0,7817$ (D) com a velocidade da onda de pulso (VOP) em todos os grupos. Significância: * $p < 0,05$

As correlações positivas entre os valores de VOP e as medidas morfométricas de área de secção transversa interna estão apresentadas na Figura 18 (correlação da área de secção transversa interna com a artéria aorta (A), carótida comum (B), artéria femoral (C) e a artéria renal (D)). Pode-se observar que houve correlação positiva e significativa em todos os vasos analisados, sugerindo uma associação entre VOP e AST interna nas diferentes idades.

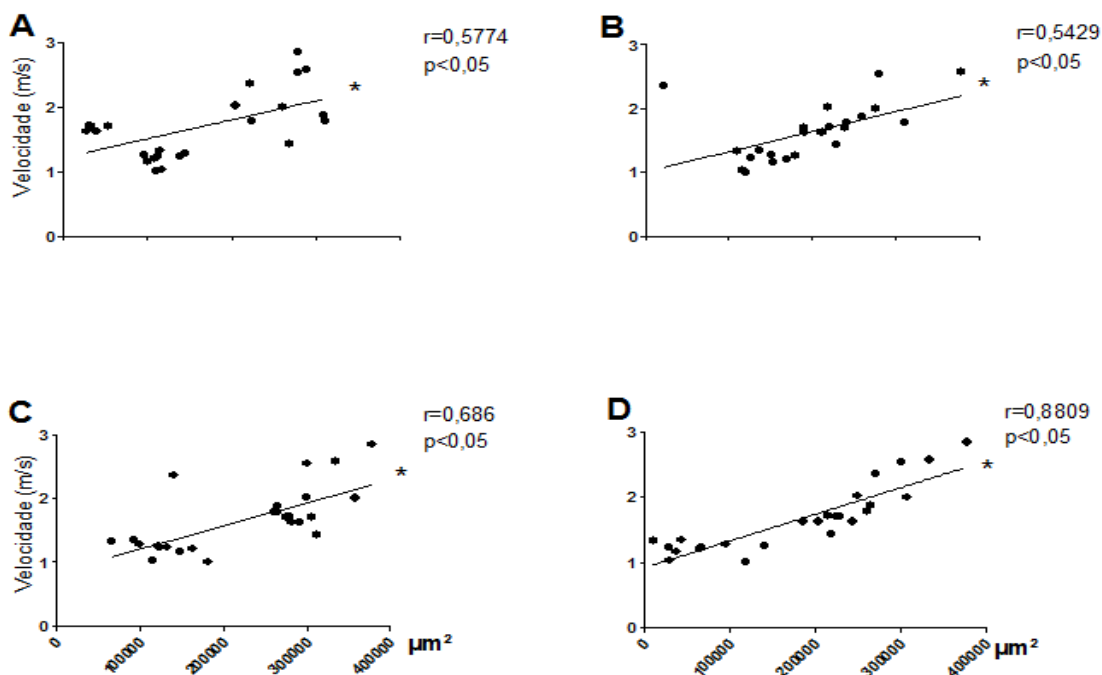


Figura 18: Correlação positiva entre a medida de área de secção transversa interna da artéria aorta, $r=0,5774$ (A), carótida comum, $r=0,5429$ (B), femoral, $r=0,6860$ (C) e renal, $r=0,8809$ (D) com a velocidade da onda de pulso (VOP) em todos os grupos. Significância: * $p < 0,05$

A velocidade da onda de pulso também foi correlacionada com os dados morfométricos de espessura da parede, como mostra a figura 19 (correlação da espessura da parede com a artéria aorta (A), carótida comum (B), artéria femoral (C) e a artéria renal (D)). Pode-se observar que não houve correlação entre VOP e espessura da parede nas diferentes idades.

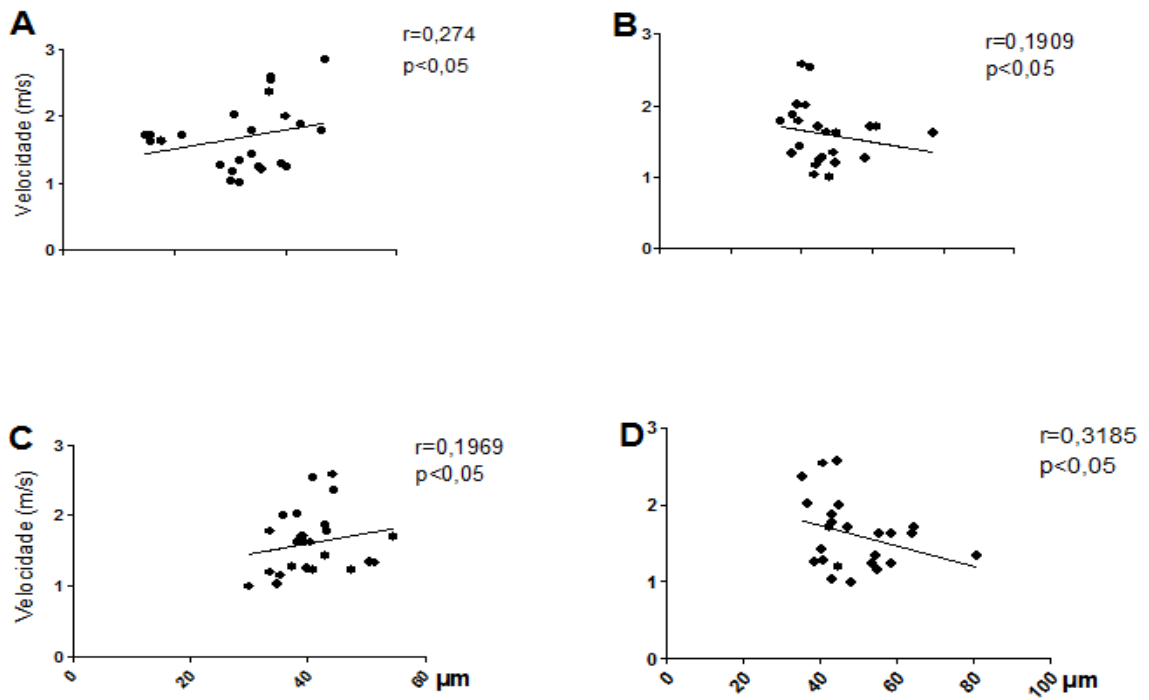


Figura 19: Correlação entre a medida de parede da artéria aorta, $r=0,2744$ (A), carótida comum, $r=0,1909$ (B), femoral, $r=0,1969$ (C) e renal, $r=0,3185$ (D) com a velocidade da onda de pulso (VOP) em todos os grupos.

Por fim, velocidade da onda de pulso também foi correlacionada negativamente com os dados morfométricos de razão parede/luz, como mostra a figura 20 (correlação da razão parede/luz com a artéria aorta (A), carótida comum (B), artéria femoral (C) e a artéria renal (D)).

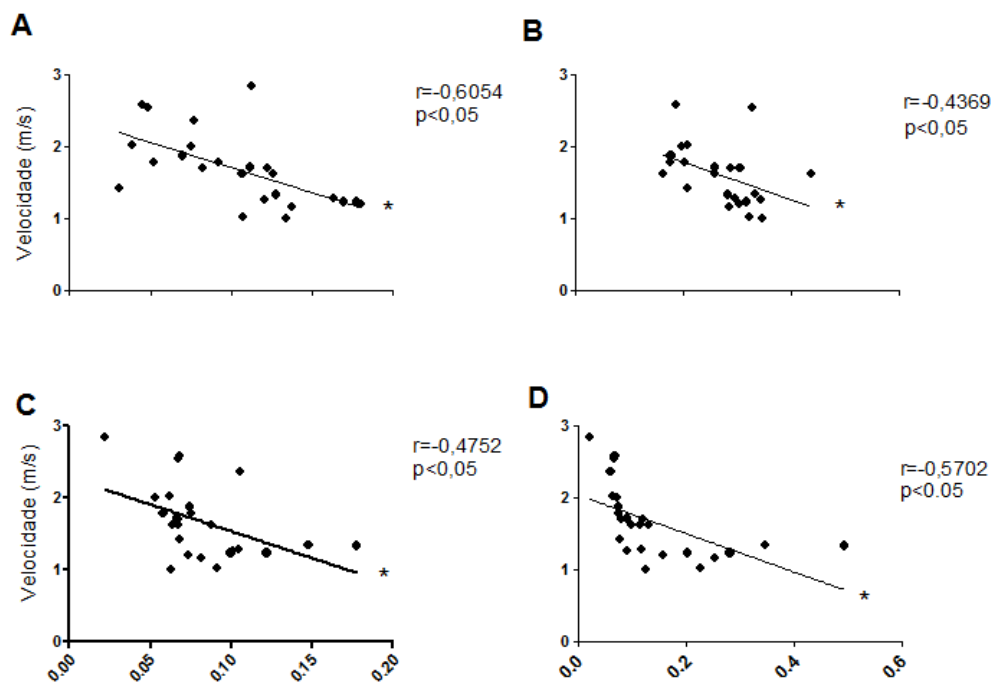


Figura 20: Correlação negativa entre a medida de razão parede/luz da artéria aorta, $r = -0,6054$ (A), carótida comum, $r = -0,4369$ (B), femoral, $r = -0,4752$ (C) e renal, $r = -0,5702$ (D) com a velocidade da onda de pulso (VOP) em todos os grupos. Significância: * $p < 0,05$

As Figuras 21, 22 e 23 ilustram os resultados das correlações positivas entre a porcentagem de colágeno e a VOP a na camada média das artérias aorta, carótida e femoral, respectivamente. Em todas as artérias analisadas houve uma correlação significativa e positiva entre estas variáveis.

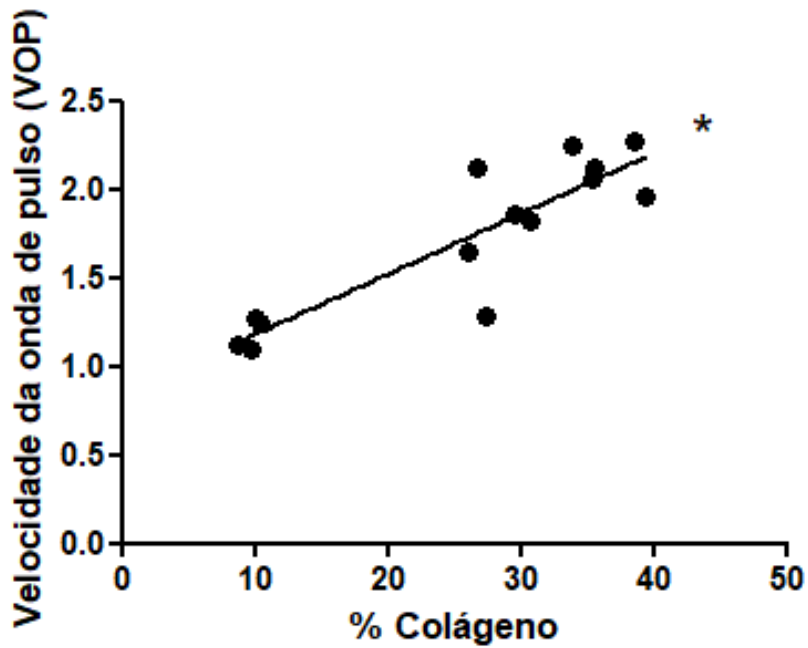


Figura 21: Correlação positiva entre percentual de colágeno na camada média da artéria aorta com a velocidade da onda de pulso (VOP) em todos os grupos. Significância: $r = 0,8854$, * $p < 0,05$

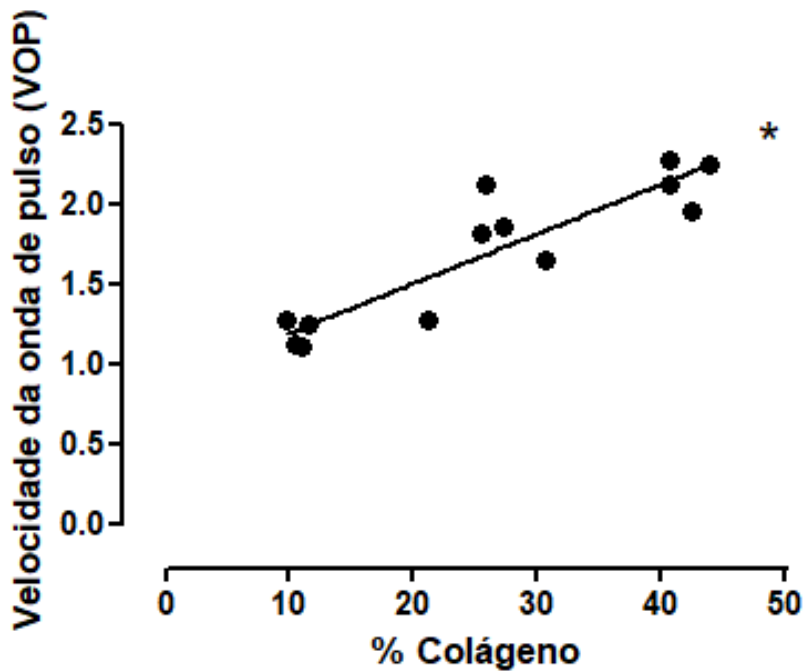


Figura 22: Correlação positiva entre percentual de colágeno na camada média da artéria carótida com a velocidade da onda de pulso (VOP) em todos os grupos. Significância: $r = 0,9031$, * $p < 0,05$

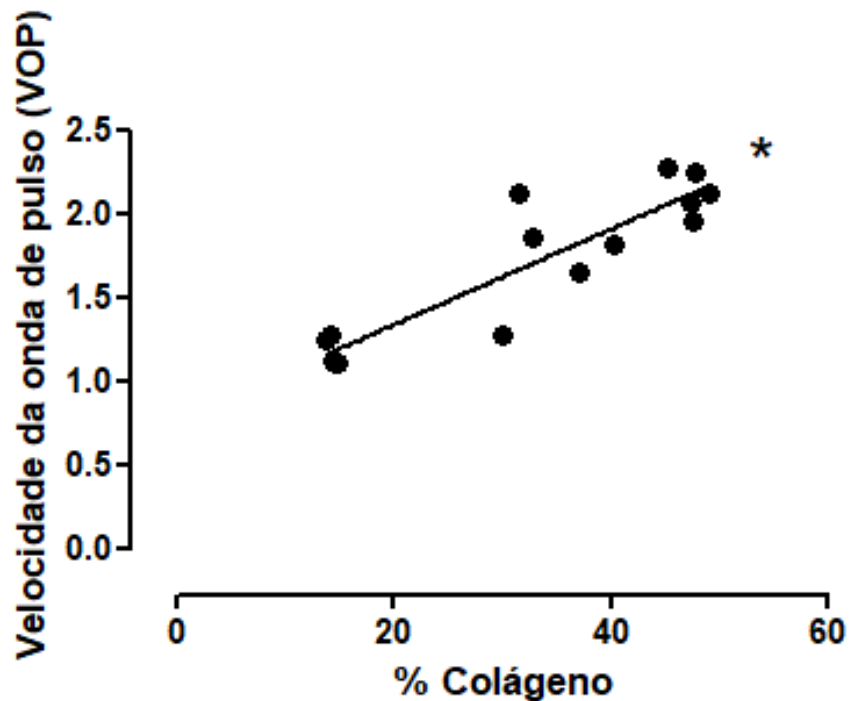


Figura 23: Correlação positiva entre percentual de colágeno na camada média da artéria femoral com a velocidade da onda de pulso (VOP) em todos os grupos. Significância: $r = 0,9051$, * $p < 0,05$

A Tabela 5 demonstra os resultados das análises de fidegnidade (consistência interna e estabilidade) e objetividade entre avaliadores nas medidas de VOP. As diferentes medidas foram representadas por 1 e 2; os diferentes dias foram representados por A e B e os diferentes avaliadores por X e Y. Pode-se observar que nenhuma das análises apresentou diferença significativa.

Tabela 5. Resultado das análises de fidegnidade (consistência interna e estabilidade) e objetividade entre avaliadores nas medidas de VOP.

AVALIAÇÃO	DIA	X	Y	X/Y
1 X 2	A	0,14468	0,20007	
1 X 2	B	0,06155	0,748447	
1 X 1	AXB	0,078234	0,32128	
2 X 2	AXB	0,104023	0,06319	
1 X 1	A			0,66706
2 X 2	A			0,86263
1 X 1	B			0,85579
2 X 2	B			0,26980

Resultados do teste *t-student*. 1 = avaliação 1; 2 = avaliação 2; A = dia 1; B = dia 2; X = um avaliador; Y = outro avaliador. Significância: $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

O principal resultado do presente estudo foi que a medida de VOP, calculada pelo novo equipamento pOpmètri® 1.0, para animais de pequeno porte, se correlacionou significativamente com o aumento de colágeno e alterações morfológicas presentes nos vasos de ratos de diferentes idades. Além disso, os resultados se mostraram fidedignos e objetivos, sugerindo que este equipamento representa com confiança as alterações internas no vaso que determinam a rigidez arterial.

Uma vez que as medidas de VOP estão sendo amplamente utilizadas como preditoras de doenças cardiovasculares e não existe, até o presente momento, nenhuma validação do equipamento pOpmètri® para análises em animais de pequeno porte, a proposta do trabalho foi avaliar a VOP em animais de diferentes idades. Concordando com resultados previamente publicados em humanos (BOUTOURYRUE & VERMEERSCH, 2010 e AVILON et al., 2015), os resultados do presente estudo revelaram que o equipamento pOpmètri® foi eficaz em demonstrar há um aumento da VOP com o envelhecimento, sendo que este aumento foi de 47% entre o grupo adulto comparado com o grupo jovem e de 26% para o grupo idoso comparado com o grupo adulto.

Estes dados concordam com aqueles previamente demonstrados por Lindesay et al. (2016), que mostraram um aumento na VOP em ratos Wistar Kyoto e SHR de 80 semanas quando comparados aos de 20 semanas. Vale ressaltar que estas medidas (LINDESAY et al, 2016) foram obtidas após uma canulação dos vasos, técnica esta diferente do equipamento utilizado no presente estudo.

Estas alterações de VOP podem ser determinadas por alterações na parede dos vasos que determinam a rigidez do vaso. Neste sentido, era importante determinar se o equipamento era confiável em representar as alterações vasculares. Para a realização do teste de validação de critério (verificar se o equipamento mede o que se pretende medir) foi escolhido um modelo de envelhecimento, pois, sabidamente, este processo altera significativamente a rigidez dos vasos.

Tem sido demonstrado que o processo de envelhecimento de vasos não acontece somente com o passar dos anos, mas está presente em diversas patologias, tais como obesidade, diabetes, aterosclerose, hipertensão arterial, entre outras (GUÉRIN et al., 2000; FU et al., 2013; FRANKLIN et al., 2008) e a medida da VOP vem contribuindo de forma eficaz para detecção precoce, bem como prevenção e/ou verificação dos efeitos de tratamento farmacológicos ou não farmacológicos (GIUMMELLY et al., 1999).

Neste sentido, a hipótese do presente estudo era que as alterações observadas na VOP dos animais de diferentes idades estariam associadas com as mudanças estruturais presentes nos vasos e com a deposição de colágeno. Para confirmar esta hipótese, foi feita uma análise morfométrica nas artérias aorta, carótida comum, femoral e renal dos ratos. A partir dos valores das medidas de AST, espessura de parede e razão parede/luz das artérias, pode-se observar que todas as artérias analisadas no presente estudo apresentaram um aumento da área de AST interna (aorta +129%, carótida +119%, renal +387% e femoral 1136%) e da AST externa (aorta +151, carótida +94%, renal +251 e femoral +62%), sem alterações significativas na espessura da parede dos vasos.

Segundo Mulvany (2002), existe uma classificação para o remodelamento de vasos a partir de mudanças no calibre da camada média do vaso (espessura da parede). Este pode reduzir (remodelamento hipotrófico) aumentar (remodelamento hipertrófico) ou permanecer sem alteração (remodelamento eutrófico). Portanto, de acordo com a classificação proposta por este autor, os resultados do presente estudo sugerem que houve um remodelamento eutrófico para fora durante o processo do envelhecimento, como ilustrado na Figura 10.

Resultados semelhantes foram encontrados em camundongos C57 de 3 a 5 meses e 22 a 24 meses. Houve um aumento no diâmetro externo e da AST do lúmen da artéria posterior cerebral, sem alterações na espessura da parede (PADILLA et al, 2016). Da mesma forma, ratos Sprague-Dawley de 4,14 e 44 meses também apresentaram um aumento da AST e do diâmetro interno na artéria cerebral posterior (MANDALA et al, 2012), valores esses que foram associados com a pressão arterial.

Como esperado, as alterações de AST foram correlacionadas positivamente (apesar de serem correlações moderadas) com os valores de VOP.

Esse alargamento dos vasos é esperado, principalmente em artérias elásticas, como a carótida comum e a aorta, e está relacionado, muitas vezes, a uma degradação de fibras de elastina (BOUTOUYRUE et al., 1999). Atualmente, associada à morfometria do vaso, a rigidez arterial vem sendo atribuída principalmente às alterações nos componentes clássicos da matrix extracelular, como elastina e colágeno, além de interações entre essas proteínas e o músculo liso vascular, visto que as artérias respondem a alterações na pressão e fluxo sanguíneos e essas mudanças constantes podem remodelar a sua estrutura (LACOLLEY et al., 2017). Os resultados do presente estudo concordam com os achados da literatura, e demonstram um aumento significativo da deposição de colágeno de 234% na artéria femoral, 276% na artéria aorta e 290% na artéria carótida no grupo idoso quando comparado com o grupo jovem.

Em concordância com os resultados do presente estudo, uma análise feita com ratos WAG/Rij de 10 e 30 meses apresentou um aumento significativo na densidade de colágeno na artéria carótida (SAFAR et al., 2001). Mais recentemente, outro estudo realizado por Hayashi & Hirayamaa (2017) demonstrou que a artéria carótida apresentou um aumento de colágeno com o passar da idade em ratos Wistar de 8,16,32 e 64 meses.

Confirmando, portanto, a hipótese do presente estudo, os valores de valores de VOP se correlacionaram positiva e significativamente com a densidade de colágeno presente nas diferentes artérias (carótida, femoral e aorta) nos diferentes grupos de ratos. Da mesma forma, Cantini, et al (2011) demonstraram um aumento da VOP e um aumento de 95% da AST média da aorta torácica de ratos Wistar-Glaxo/Rijswick de 3 a 30 meses.

Alterações na composição das artérias musculares, como artérias cerebrais e a artéria femoral, também são esperadas com o passar da idade. Diaz-Otero et al., (2016) mostraram um aumento significativo na deposição de

colágeno na artéria posterior cerebral de camundongos C57 do grupo jovem (3 meses) para o grupo idoso (22 meses).

Normalmente, o colágeno tem como função garantir a integridade e fixação de células na matriz extracelular onde se encontra, assim como glicoproteínas, glicosaminoglicanas e proteoglicanas. O colágeno é considerado uma das proteínas mais abundantes em mamíferos e pode ser encontrado na pele, tendão, vasos sanguíneos, ossos, entre outros (ALBERTS et al., 1994). O colágeno é basicamente formado por três cadeias polipeptídicas, conhecidas como cadeias α , que são enroladas umas às outras (ALBERTS et al., 2004). Com as cadeias enroladas em hélice, o colágeno perde a propriedade de estiramento e assim assegura uma resistência à força de tensão. Participam de sua formação a prolina e a glicina, na qual a primeira tem função de estabilizar a cadeia e a segunda tem função de permitir o agrupamento das três cadeias α , de forma que permaneçam fortemente enroladas (ALBERTS et al., 2004, LEHNNGER, 1995).

Uma modificação na composição da parede arterial com o passar da idade já era esperada e pode ocorrer por uma associação de fatores genéticos, metabólicos e inflamatórios (MIKAL et al., 2017). Tem sido demonstrado que uma diminuição na produção de elastina com o passar da idade pode gerar um “espaço” dentro da camada das artérias que, combinado a um aumento da produção de colágeno na camada adventícia e reorganização de suas fibras, perde sua característica ondulatória. Devido a uma diminuição de proteoglicanos, ricos em leucina, que são reguladores dessa organização, estas alterações podem estar contribuindo para comprometer o funcionamento das artérias, determinando aumento da rigidez arterial (FLEENOR et al., 2010; MANDALA et al., 2012; HANSER et al., 2015).

Dentre os mecanismos que podem estar envolvido no aumento da produção de colágeno na camada adventícia está o fator de crescimento TGF- β 1, que tem a função de estimular a produção de superóxido desmutase e, por meio dos fibroblastos, aumenta a produção e o estoque de colágeno. Como ocorre uma degradação das fibras de elastina e elas não são substituídas, a relação colágeno/elastina fica maior, promovendo a perda da complacência do vaso (FLEENOR et al, 2010; HANNA et al, 2014). Além disso, uma queda na proteína Klotho, que é sintetizada nos rins e tem a função de suprimir o

envelhecimento, associada a uma diminuição da proteína AMPK α e eNOs, pode ativar a regulação do sistema NADPH oxidase, aumentando a produção de superóxido e gerando mais colágeno (GAO, et al., 2016). Modificações no músculo liso vascular também são de extrema importância no processo de rigidez arterial com o envelhecimento e estão contribuindo ativamente e concomitantemente com as mudanças na composição do vaso (SEGCEL et al, 2015; LACOLLEY et al, 2017).

As análises de fidedignidade dão um suporte essencial para uma possível validade de uma técnica. Segundo Thomas, Nelson & Silverman (2012), um teste não pode ser validado se não for fidedigno. Como já descrito anteriormente, os critérios que compõe uma análise fidedigna são: Estabilidade, quando é realizado um teste-reteste em dias diferentes; Métodos das formas alternadas, os quais envolvem a construção de dois testes diferentes e Consistência interna, quando é realizado um teste-reteste no mesmo dia. Além disso, o presente estudo também realizou testes de objetividade, que visam avaliar se diferentes avaliadores podem alcançar os mesmos escores nos mesmos sujeitos.

Os resultados no presente estudo mostraram que todos os testes não apresentaram diferenças significativas entre seus resultados, contemplando os critérios de Estabilidade, Consistência interna e objetividade.

6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo nos permitem sugerir que a medida de VOP, feita pelo novo equipamento pOpmètri® 1.0 para animais de pequeno porte, apresentou-se sensível em detectar alterações que podem influenciar a VOP, uma vez que se correlacionou significativamente com as alterações morfológicas e de colágeno presentes nas artérias de ratos de diferentes idades, as quais contribuem para a redução da complacência dos vasos e aumento da rigidez arterial.

O aparelho também se mostrou fidedigno por meio das análises de fidedignidade demonstrando consistência interna, objetividade e estabilidade.

REFERÊNCIAS

AIRES, M. M. Fisiologia. LC m, editor, São Paulo: Guanabara Koogan; 2011.

ALBERTS, B. et al. Junções Celulares, Adesão Celular e Matriz Extracelular. In: **Biologia Molecular da Célula**. 4 e.d. Porto Alegre: Artmed, 2004.

ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**, 3 e.d. New York: Garland, 1994.

ALIVON, M. et al. A novel device for measuring arterial stiffness using finger-toe pulse wave velocity: Validation study of the pOpmètre®. **Archives of Cardiovascular Disease**, 108: 227-234, 2015.

AVOLIO, A. P. et al. Effects of aging on changing arterial compliance and Artery Stiffness The Multiethnic Study of Atherosclerosis. **Stroke**, 45:48-53, 1983.

BENETOS A. et al. Influence of age, risk factors, and cardiovascular and renal disease on arterial stiffness: clinical applications. **American Journal Hypertension**, 15(12):1101-8, 2002.

BOUTOURYRUE, P. & VERMEERSCH. Determinants of pulse wave velocity in healthy people and in the presence of cardiovascular risk factors: establishing normal and reference values'. **European Heart Journal**., 31(9): 2338-2350, 2010.

BOUTOURYRUE, P. et al. Association between local pulse pressure, mean blood pressure, and large-artery remodeling. **Circulation**, 100(13):1387-93, 1999.

BRASSELET, C. et al. Collagen and elastin cross-linking: a mechanism of constrictive remodeling after arterial injury. **American Journal Physiology-Heart Circulatory Physiology**, 289:H2228–H2233, 2005.

CANTINI, C. et al. Aminguanidine and aortic wall mechanics, structure and composition in aged rats. **Hypertension**, 38:943-948, 2001.

CARVALHO, M. H. C. et al. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Revista Brasileira Hipertensão.**, 8:76-88,2001.

DIAZ-OTERO, J. M. et al. Aging is associated with changes to the biomechanical properties of the posterior cerebral artery and parenchymal arterioles. . **American Journal Physiology-Heart Circulatory Physiology.** 310:H365-H375, 2015.

FLEENOR, B. S. et al. Arterial stiffening with ageing is associated with transforming growth factor- β 1-related changes in adventitial collagen: reversal by aerobic exercise. *Journal Physiology* 580.20:3971-3982, 2010.

FRANKLIN, S. S. et al. Beyond blood pressure: Arterial stiffness as a new biomarker of cardiovascular disease. **Journal of the American Society of Hypertension.** 2(3):140-51, 2008.

FU, S. et al. Overall and abdominal obesity indicators had different association with central arterial stiffness and hemodynamics independent of age, sex, blood pressure, glucose, and lipids in Chinese community-dwelling adults. **Clinical interventions in aging.**8:1579-1584, 2013.

GAO, D. et al. Activation of SIRT1 Attenuates Klotho Deficiency-induced Arterial Stiffness and Hypertension by Enhancing AMPK α Activity **Hypertension.** 68(5): 1191–1199, 2016.

GEPNER, A. M. et al. Longitudinal Effects of a Decade of Aging on Carotid-left ventricular load in a northern Chinese urban community. **Circulation.**, 68(1): 50-58, 2014.

GIUMMELLY, P. et al. Effects of aging and antihypertensive treatment on aortic internal diameter in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension.** 34:207-211,1999.

GROTENHUIS, H. B. et al. Validation and reproducibility of aortic pulse wave velocity as assessed with velocity-encoded MRI. **J. Magnetic Resonance Imaging.**, 30(3):512-6, 2009.

GUÉRIN, A. P. et al. Arterial Stiffness and vascular calcifications in end-stage renal disease. **Nephrology Dialysis Transplant.** 15:1014-1021, 2000.

HANSER, M. L. et al. Proteome analysis of human arterial tissue discloses associations between the vascular content of small leucine-rich repeat proteoglycans and pulse wave velocity. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology** 35:1896-1903, 2015.

HERRERA, N. A. et al. Exercise training attenuates dexamethasone-induced hypertension by improving autonomic balance to the heart, sympathetic vascular modulation and skeletal muscle microcirculation. **Hypertension**, 34(10): 1967-76, 2016.

HOZUMI, T. et al. Noninvasive assessment of coronary flow velocity and coronary flow velocity reserve in the left anterior descending coronary artery by Doppler echocardiography: comparison with invasive technique. **Journal American College Cardiology**, 32(5): 1251-9, 1998.

JORDÃO, M.T et al. Exercise training restores hypertension-induced changes in the elastic tissue of the thoracic aorta. **Journal of vascular Research**, 48(6):513-24, 2011.

LACOLLEY, P. et al. Vascular smooth muscle cells and arterial stiffening: relevance in development, aging, and disease. **Physiological Reviews.** 97:1555-1617, 2017.

LEHNINGER, A.L. **Princípios de bioquímica.** 2. ed. São Paulo (SP): Sarvier; 1995.

LINDESAY, G. et al. Age and hypertension strongly induce aortic stiffening in rats at basal and matched blood pressure levels. **Physiological Reports.**,2016

MANDALA, M. et al. Maturation is associated with changes in rat cerebral artery structure, biomechanical properties and tone. **Acta Physiologica.**, 205, 363-371, 2012.

MIKAEL, L. R. et al. Envelhecimento vascular e rigidez arterial. **Arquivo Brasileiro Cardiologia** 109(3): 253-258,2017.

MULVANY, M. J. Small Artery Remodeling in Hypertension. **Current Hypertension Report.**, 4:49-55, 2002.

NIEDERHOFFER, N. et al. Calcification of medial elastic fibers and aortic elasticity. **Hypertension**, 1996.

7º Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. **Arquivos brasileiros de cardiologia.** v. 107, nº3, supl.3, Setembro,2016.

PADILLA, J. et al. Regular exercise reduces endothelial cortical stiffness in western diet-fed female mice. **Hypertension**, 68: 1236-1244, 2016.

PIZZI, O. et al. Velocidade de onda de pulso – o método e suas implicações prognósticas na hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão.** 13(1):59-62, 2006.

SAFAR, M. E. et al. Endothelium-dependent changes in arterial diameter in old normotensive rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 28,371-375, 2001.

SANTANA, et al. Effect of high-fat diet upon inflammatory markers and aortic stiffening in mice. **BioMed Research International.** 2014

SEGCEL, N. L. et al. Augmented vascular smooth muscle cell stiffness and adhesion when hypertension is superimposed on aging. **Nac. Inst. Of Health.** 65(2): 370-377, 2015.

VIEGAS, K. A. S. **Ação da angiotensina II no remodelamento da matrix extracelular perivascular em camundongos.** Dissertação. F111 (Ciências Morfofuncionais), São Paulo, 2012.

WALLACE, S. M. et al. Isolated systolic hypertension is characterized by increased aortic stiffness and endothelial dysfunction. **Hypertension.** 50(1):228-33, 2007.

THOMAS J. R.; NELSON, J. K.; SILVERMAN, S. J. **Métodos de pesquisa em atividade física.** Editora Artmed, 6ª edição, p 213-233, 2012.