



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Alyne Souza Félix Fonseca

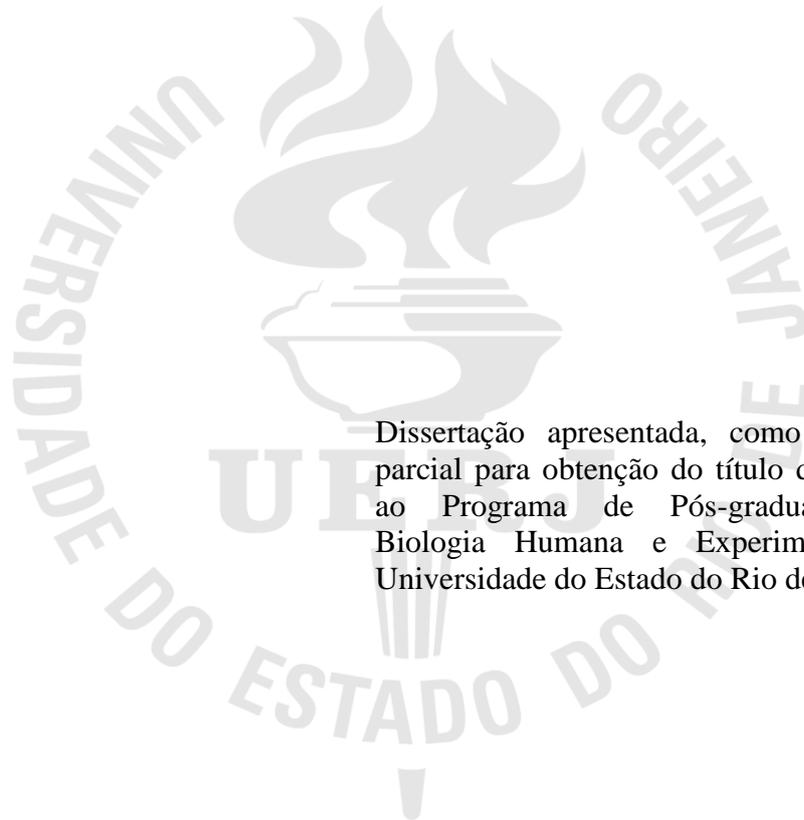
Corpo carotídeo e hipertensão: alterações celulares e da matriz extracelular

Rio de Janeiro

2011

Alyne Souza Felix Fonseca

Corpo carotídeo e hipertensão: alterações celulares e da matriz extracelular



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Jorge José de Carvalho

Rio de Janeiro

2011

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

F676 Fonseca, Alyne Souza Felix.
Corpo carotídeo e hipertensão: alterações celulares e da matriz extracelular
/ Alyne Souza Felix Fonseca. – 2011.
69 f.

Orientador: Jorge José de Carvalho.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro,
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia
Humana e Experimental.

1. Hipertensão arterial - Teses. 2. Matriz extracelular – Teses.
3. Corpo carotídeo. 4. NG – Nitroarginina Metil Éster. I. Carvalho, Jorge José
de. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia
Roberto Alcântara Gomes. III Título.

CDU 616.12-008.331.1

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial
desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Alyne Souza Felix Fonseca

Corpo carotídeo e hipertensão: alterações celulares e da matriz extracelular

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em de fevereiro de 2011.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Jorge José de Carvalho (Orientador)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Tatiana Brunini
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Dra. Suzana Corte Real Faria
Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2011

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a Deus, aos meus pais Oslúzio e Nazaré, à minha irmã Lyria, aos avós queridos pelo amor incondicional, pelo carinho e presença em todos os momentos da minha vida e pelo apoio crucial nessa caminhada.

A todos do Departamento de Histologia e Embriologia, por me receberem com carinho e por proporcionarem um ambiente agradável e sempre descontraído;

A todos os professores da graduação, pelos ensinamentos que enriqueceram minha formação, dentre estes: Profa. Alessandra Thole, Profa. Laís de Carvalho, Profa. Ana Carolina Stumbo;

A todos que, diretamente ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Compartilho o mérito deste trabalho com todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que o objetivo final fosse alcançado.

A Deus, por guiar o meu caminho, minha vida e governar-me com seu amor e sabedoria;

À minha família querida, por ser fonte de amor, união e alegria em minha vida;

In Memoriam do cunhado Marcelo Araújo Silva, com saudades, por nos deixar tão cedo mas que sua luta fez ensinamentos;

Ao Prof. Dr. Jorge José de Carvalho, que conduziu o trabalho com muita sabedoria, sendo um dos responsáveis direto pelo meu crescimento profissional;

Ao sempre presente Fernando Timbó, pelo incentivo, carinho e dedicação de vida, onde em todos momentos, acreditou na certeza de um futuro brilhante para mim;

À Minha afilhada querida, Carolina Jones, pela dádiva de tê-la em minha vida;

À bióloga e amiga Ana Lúcia Rosa Nascimento, pelo companheirismo, dedicação, disponibilidade e apoio em todos os momentos da construção deste trabalho;

Ao colega Vinícius Rocha por ter participado com dedicação neste trabalho;

Aos técnicos: Josefa da Silva, Fábio, Roberto do departamento de Histologia e Embriologia, pela simpatia e pelo auxílio constate durante a realização deste trabalho;

Aos colegas de trabalho do departamento de Histologia e Embriologia, Verônica Matos, Angélica Beatriz, Dalva Lira, Jemima, Milton, Rodrigo Ferreira, Nemesi, Poliana, Thais, Valesca, pelo convívio agradável e animado, e pela grande ajuda e apoio;

Aos colegas de outros departamentos pela ajuda intensa neste trabalho: Jéssica Teixeira, Bruno Félix, Patrícia, Alan Cesar, Jorge Medeiros;

Às amigas de todos os momentos: Ana Bastos, Carla Rocha, Paula Fontoura, Suellen Bernardo, Nathália Ardente, Laís Bessa, Gabriela Neves, Raquel de Paula, Janaína Georgi, pelo carinho, dedicação e paciência;

À amiga de uma vida, Carla Rocha, que esteve presente desde sempre, em todas as ocasiões.

Aos novos amigos, que participarão de um longa jornada : Aline Zani, Ana Luiza, Ana Beatriz, Cristiana Fragoso, Mariana Sibeiro, Rafael Tavares, Amanda, Vicky, Larissa, dentre todas as outras que tiveram principalmente paciência.

Toda minha vida eu me perguntei no que me tornaria quando eu crescesse. Então, há aproximadamente sete anos, eu percebi que eu nunca iria crescer - aquele crescimento é sempre um processo contínuo.

M. Scott Peck

RESUMO

FONSECA, Alyne. *Corpo carotídeo e hipertensão: alterações celulares e da matriz extracelular* 2011. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

O aumento de doenças cardiovasculares possui como fator primordial e, mais comum, o aumento da pressão arterial (PA). Esta, pode gerar complicações em outros órgãos e acarretar diversas patologias, podendo levar a morte. A hipertensão é uma síndrome multifatorial, cuja maior incidência ocorre em indivíduos obesos, sedentários e consumidores em excesso de bebidas alcoólicas e sal. O corpo carotídeo (CC) é um órgão quimiorreceptor localizado na bifurcação da artéria carótida, formado de estruturas básicas chamadas glomus. Cada glomus carotídeo é constituído de células tipo 1 envoltas por células tipo 2 ou sustentaculares. Este trabalho teve como objetivo analisar as alterações morfofuncionais que ocorrem no CC, causada por hipertensão arterial induzida pelo L-NAME, um inibidor da enzima óxido nítrico sintase. Para isso, o estudo utilizou 20 ratos Wistar divididos em dois grupos: controle (C) e L-NAME (LN). Após a administração de 40mg/kg/dia de L-NAME por 45 dias, o CC foi coletado. Observou-se aumento significativo da pressão arterial a partir da segunda semana de administração de L-NAME. Análise quantitativa mostrou uma redução no número de núcleos do glomus carotídeo e o aumento na área total do órgão no grupo LN. Não foi encontrado diferença significativa no número de núcleos totais do corpo carotídeo entre os grupos. Na análise morfológica do grupo LN, observamos a formação de vacúolos nas células tipo 1 do glomus, bem como uma redução do número total de núcleos das células de cada glomus carotídeo. A análise qualitativa sugeriu um aumento no número de fibras colágenas e fibras do sistema elástico na matriz extracelular e grânulos no grupo LN. Imunomarcações com anticorpo anti VEGF e NF- κ B e nNOS mostram-se aumentadas e dispersas por todo CC no grupo LN em relação ao grupo C. Além disso, marcações para Substância-P também foram observadas em maior quantidade nas células tipo 1 do grupo LN. Quanto à marcação para PGP 9.5, houve a redução desta marcação caracterizada dentro do glomus carotídeo grupo LN comparado ao grupo C. O estudo sugere que o corpo carotídeo, em resposta à hipertensão induzida pela inibição da enzima óxido nítrico sintase, gera mudanças morfofisiológicas semelhantes as encontradas em hipóxia.

Palavras-chave: Hipertensão arterial. Corpo carotídeo. L-NAME.

ABSTRACT

The increased cardiovascular disease as the key features and, more common, increasing blood pressure (BP). This can cause complications in other organs and cause various diseases and may lead to death. Hypertension is a multifactorial syndrome, whose incidence is higher in obese, sedentary and consumers in excess alcohol and salt. The carotid body (CC) is a chemoreceptor organ located in bifurcation carotid artery, consisting of basic structures called carotid glomus. Each is made up of carotid glomus type 1 cells surrounded by sustentacular or type 2 cells. This study aimed to analyze the morphological and functional changes that occur in CC, caused by hypertension induced by L-NAME, an inhibitor of nitric oxide synthase. For that, the study used 20 rats divided into two groups: control (C) and L-NAME (LN). After administration of 40mg/kg/day L-NAME for 45 days, the CC was collected. We observed significantly increased blood pressure starting at second week of administration of L-NAME. Quantitative analysis showed a reduction in the number of cells in the carotid glomus and an increase in the total area of the body in the LN group. No significant difference was found in the nuclei total number in carotid body between the groups. In the morphological analysis of the LN group, we observed the formation of vacuoles in type 1 glomus cells, as well as a reduction in the total number of nuclei of cells from each carotid glomus. The qualitative analysis suggested an increase in collagen and elastic system fibers in the extracellular matrix and cytoplasmic granules in LN group. Immunostainings with anti-VEGF and NFkappa- B and nNOS show was increase and dispersed in the LN group than in group C. In addition, appointments for P substance were also obeservado in greater amounts in type 1 cells of the LN group. The marking for PGP 9.5, there was a reduction of this marking characterized in carotid glomus LN group compared with group C. The study suggests that the carotid body, in response to hypertension induced by inhibition of nitric oxide synthase, produces morphophysiological changes similar to those found in hypoxia.

Keywords: Hypertension. Carotid body. L-NAME.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Via de liberação de óxido nítrico.....	20
Figura 2 -	Localização do Corpo carotídeo.....	21
Figura 3 -	Característica de um Glomus carotídeo.....	22
Figura 4 -	Mecanismo de liberação de neurotransmissores nas fibras nervosas do corpo carotídeo.....	23
Figura 5 -	Organização de alguns componentes da matriz extracelular.....	28
Figura 6 –	Caracterização dos grupos experimentais.....	32
Figura 7 –	Fotomicrografias de cortes corados com hematoxilina e eosina....	41
Figura 8 –	Fotomicrografias de CC corado pela técnica de resorcina fucsina de Weigert precedida de oxidação com oxona.....	45
Figura 9 –	Fotomicrografias de cortes corados por Alcian Blue pH 2,5.....	46
Figura 10 (a,b) -	Fotomicrografias de cortes corados por Picro Sirius Red observados em Microscopia de luz transmitida	47
Figura 10 (c,d) –	Fotomicrografias de cortes corados por Picro Sirius Red e observados em Microscopia de Luz Polarizada.....	47
Figura 11-	Eletromicrografias de CC.....	48
Figura 12 –	Fotomicrografias de cortes corados pela técnica de FIF e observados em Microscópio Confocal de Varredura a Laser.....	49
Figura 13 –	Eletromicrografias de CC.....	50
Figura 14 –	Fotomicrografias de cortes imunomarcados com anticorpo anti NFkB.....	51
Figura 15 –	Fotomicrografias de cortes imunomarcados com anticorpo anti SP.....	52
Figura 16 –	Fotomicrografias de cortes imunomarcados com anticorpo anti PGP9.5.....	53
Figura 17 -	Fotomicrografias de cortes imunomarcados com anticorpo anti VEGF.....	54
Figura 18 -	Fotomicrografias de cortes imunomarcados com anticorpo anti NOS 1	55

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Gráfico da pressão arterial sistólica (acima) e da massa corporal durante (abaixo) experimentação.....	39
Gráfico 2	Diferença de área do CC analisada entre os grupos C e LN.....	41
Gráfico 3	Quantificação do número de núcleos totais (estroma + parênquima) entre os grupos C e LN.....	41
Gráfico 4	Quantificação do número de núcleos (núcleos das células tipo 1 e células tipo 2) presentes por glomus carotídeo. C x LN	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estágios da pressão arterial sistólica e diastólica	16
Tabela 2	Características principais das três isoformas das NOS	18

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP-	Adenosina trifosfato
C -	Grupo controle
CC –	Corpo Carotídeo
CO-	Monóxido de carbono
CSN-	Nervo do seio carotídeo
eNOS –	Óxido nítrico sintase endotelial
Fe-	Ferro
FIF -	Indução de fluorescência por formaldeído
GAGs-	Glicosaminoglicanos
GMPC –	Guanosina monofosfato cíclico
iNOS-	Óxido nítrico sintase induzida
IP3 –	Inositol 1,4,5- trifosfato
LN -	Grupo L-NAME
L-NAME –	L-nitro arginina metil-éster
LPS -	Endotoxina lipopolissacarídeo
MEC –	Matriz extracelular
mmHg –	Milímetros de mercúrio
NF-kB –	Fator Nuclear Kappa B
NO –	Òxido Nítrico
NOS –	Óxido Nítrico Sintase
NOS 1 ou nNOS	Òxido Nítrico Sintase Neuronal
PA –	Pressão Arterial
SP –	Substância P
VEGF -	Fator de Crescimento Vascular e Endotelial

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	OBJETIVO	29
1.1	Gerais	29
1.2	Específicos	29
2	MATERIAIS E MÉTODOS	30
2.1	Desenho experimental	30
2.2	Microscopia de luz	31
2.2.1	<u>Técnicas histológicas e histoquímica</u>	32
2.2.2	<u>Imunohistoquímica</u>	32
2.3	Microscopia confocal de varredura a laser	32
2.4	Microscopia eletrônica de transmissão	33
2.5	Morfometria	33
2.5.1	<u>Análise quantitativa</u>	33
2.5.2	<u>Análise qualitativa</u>	37
2.6	Análise estatística	38
3	RESULTADOS	39
4	DISCUSSÃO	54
5	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	58
	ANEXO A Protocolo de coloração Hematoxilina e Eosina.....	63
	ANEXO B Protocolo de coloração pela Técnica Resorcina Fucsina de Weigert precedida de oxidação com oxona.....	64
	ANEXO C- Protocolo de coloração para Picro Sirius Red.....	65
	ANEXO D- Protocolo de coloração Alcian Blue.....	66
	ANEXO E- Protocolo de coloração para Indução de Fluorescência por Formaldeído.....	67
	ANEXO F - Processamento para Microscopia Eletrônica.....	68
	ANEXO G- Aprovação do Comitê de ética e pesquisa para cuidado e uso de animais experimentais, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.....	69

INTRODUÇÃO

Hipertensão arterial

O desenvolvimento de doenças cardiovasculares possui como fator mais comum a elevação da pressão arterial (PA). A hipertensão apresenta custos médicos e socioeconômicos elevados, decorrentes principalmente das suas complicações, tais como: doença cerebrovascular, doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca, insuficiência renal crônica e doenças vasculares de extremidades. A hipertensão é uma síndrome multifatorial, cuja maior incidência ocorre em indivíduos obesos, sedentários e consumidores em excesso de bebidas alcoólicas e sal [1-5].

A hipertensão arterial, considerada uma doença crônica, pode ser influenciada pelo grau de participação do indivíduo portador de tal patologia em relação à fatores como a aceitação da doença, controle e conhecimento da mesma e aparecimento de complicações [2].

De acordo com o VII *Joint National Comittee (VIIJNC)*, são considerados hipertensos pacientes com pressão arterial sistólica maior ou igual a 140 mmHg ou pressão diastólica maior ou igual a 90 mmHg. Neste mesmo estudo, foi introduzida uma nova classificação, com o termo pré-hipertensão, aplicado à indivíduos cujos níveis tensionais sistólicos variam entre 129-139 mmHg e diastólicos entre 80-89 mmHg. Todavia, segundo as VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010) retornou-se a classificação de três diferentes estágios de hipertensão. A pressão limítrofe é aquela com valores sistólicos de 130 a 139 mm Hg e diastólicos de 85 a 89 mm Hg. A normotensão é a pressão arterial sistólica < 130 mmHg e diastólica < 85 mmHg. Neste estudo optou-se por utilizar a classificação do VII *Joint National Comittee*.

Tabela 1 – Estágios da Pressão arterial sistólica e diastólica. (VII JNC, 2003).

Classificação	Pressão Arterial Sistólica (mmHg)	Pressão Arterial Diastólica(mmHg)
Normal	<120	<80
Pré-Hipertenso	120-139	80-89
Hipertensão Estágio 1	140-159	90-99
Hipertensão Estágio 2	≥ 160	≥100

De acordo com as V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, em 2007 houveram 1.157.509 intervenções por doenças cardiovasculares no sistema único de saúde. Estima-se que, no mundo, cerca de um bilhão de pessoas apresentem hipertensão essencial, ou seja, sem uma causa específica, e que aproximadamente 7,1 milhões de mortes sejam atribuídas a esta doença (VII JNC, 2003).

Tanto a hipertensão, como outros fatores de risco convencionais para doença cardiovascular, como hipercolesterolemia, diabetes melitus e tabagismo estão fortemente associadas à disfunção endotelial [6]. A presença de disfunção endotelial em pacientes hipertensos é considerada um marcador de eventos cardiovasculares futuros [7,8].

O endotélio dos vasos sanguíneos desempenha um papel central na regulação do tônus e, conseqüentemente, na regulação da pressão arterial por meio da síntese e liberação de substâncias vasoativas. As células endoteliais regulam as camadas subjacentes de músculo liso pela liberação de fatores relaxantes derivado do endotélio, tais como o óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PGI₂) e Fator hiperpolarizante derivado do endotélio (FHDE) bem como pela liberação de fatores vasoconstrictores [1, 2].

Nas células endoteliais de vasos sanguíneos estão presentes receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 para o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). O VEGF é um dímero protéico sinalizador com ação autócrina e parácrina que ativa receptores em células endoteliais. Esta proteína se caracteriza como um dos membros da superfamília de fatores de crescimento. Em circunstância fisiológicas, novos vasos são formados durante cicatrizações e regenerações do organismo. Ao curso do desenvolvimento de uma patologia, o crescimento anormal de redes vasculares leva ao desenvolvimento de tumores. Estudos demonstraram que a hipertensão pulmonar gera a proliferação de células endoteliais nos vasos sanguíneos e o aumento do VEGF [9]. Estudos em modelos em ratos de hipóxia crônica (10% do oxigênio inspirado, por 4 semanas de experimentação) mostram a marcação intensa de VEGF no

citoplasma das células tipo 1 do glomos carotídeo em relação ao grupo normóxia, tendo assim, um papel parácrino no remodelamento vascular [10].

Nas doenças cardiovasculares, um fator de transcrição é visto como um dos responsáveis pelas mudanças morfológicas ocorridas nestas patologias: o Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B). Este, é um complexo protéico responsável pelo controle da transcrição do DNA, respondendo à estímulos como estresse, radicais livres, LDL oxidado, vírus e bactérias [11]. O NF- κ B é importante na regulação da resposta celular porque ele pertence à categoria de fatores de transcrição primários, ou seja, de ação rápida. Estes fatores estão presentes nas células em um estado inativo e não requerem síntese de novas proteínas para ser ativado, permitindo assim, que o NF- κ B seja um dos primeiros estímulos nocivos para as células. Análises de resultados de experimentos com períodos sucessivos de hipóxia (hipóxia intermitente), mostraram o aumento da transcrição deste fator nos grupos afetados em relação a um grupo controle [12].

Óxido nítrico e L-NAME

A L-arginina, um aminoácido catiônico semi-essencial, é o precursor do óxido nítrico (NO), um gás inorgânico de curta meia vida, envolvido em várias funções fisiológicas, como neurotransmissão e vasodilatação [13]. Este, é liberado por diversos tecidos, dentre eles pela célula endotelial, além de seu papel neurotransmissor e controle hemodinâmico, participando concomitantemente na regulação da proliferação, crescimento celular e como um dos mais potentes vasodilatadores [2-4].

Embora as concentrações intracelulares de L-arginina sejam mais do que suficientes para a produção do óxido nítrico, a entrada de L-arginina extracelular em alguns tipos celulares e doenças parece ser fundamental para a produção de NO, um fenômeno denominado “paradoxo da L-arginina”. Foram descritos em células de mamíferos quatro sistemas do transporte deste aminoácidos catiônicos: y^+ , y^+,L , $B^{0,+}$, $b^{0,+}$, cada uma delas com suas características cinéticas específicas e expressas de forma distinta em diferentes tipos celulares [14,15].

Uma vez no interior da célula, a L-arginina é convertida em L-citrulina e NO pela ação da família de enzimas NO sintase (NOS). A nomenclatura das duas primeiras representa o tecido onde a enzima foi primeiramente descrita e são constitutivas, enquanto que a última é geralmente induzida em doenças: NOS neuronal (nNOS ou NOS 1) , NOS endotelial (eNOS

ou NOS 3) e NOS induzível (iNOS ou NOS 2) [13]. Já foi descrito um novo subtipo de NOS, a NOS mitocondrial, entretanto pouco ainda se sabe sobre esta.

A nNOS é expressa de forma constitutiva difusamente no sistema nervoso central e periférico, mas também pode ser encontrada no músculo esquelético. A eNOS, que também é uma enzima constitutiva, está presente no endotélio vascular, em cardiomiócitos e em plaquetas. A iNOS foi primeiramente descrita em macrófagos, monócitos neutrófilos e músculo liso vascular ativado por citocinas [16]. No entanto, foi mostrada a presença desta isoforma em plaquetas humanas não estimuladas, embora a existência dessa proteína em plaquetas humanas seja ainda controversa [17].

Tabela 2. Características principais das três isoformas das NOS

	nNOS ou NOS 1	iNOS ou NOS 2	eNOS ou NOS 3
Primeira identificação	Neurônios	Macrófagos	Endotélio
Peso molecular(kDa)	160	130	133
Localização cromossomial	12p24.2	17cen-q12	7q35-36
Função principal	Neurotransmissão	imunocitotoxicidade	Relaxamento do músculo liso vascular
Produção de NO	pmoles	Nmoles	Pmoles
Regulação da expressão	Constitutiva Estimulada por hormônios sexuais, lesão do tecido nervoso e hipóxia Inibida por citocinas e endoxina	Preferencialmente induzível Expressão induzida por citocinas e endotoxina	Constitutiva Estimulada por hormônios sexuais e estresse de cisalhamento Inibida por citocinas, endotoxina e hipóxia

As isoformas constitutivas são originalmente encontradas no endotélio e nos neurônios, sendo então denominadas de eNOS (NOS endotelial) e nNOS (NOS neuronal), respectivamente. A isoforma eNOS, está ligada à membrana das células endoteliais. Ambas as isoformas encontram-se presentes nas células e são estimuladas por uma cascata bioquímica

que pode ser dependente ou independente de íons cálcio (Ca^{2+}). Quando ocorre algum estímulo patológico, a isoforma induzível (iNOS) é ativada. Dentre estes agente patológicos, podemos citar como exemplo, os lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), citocinas, incluindo a interleucina-1, endotoxinas e fator de necrose tumoral. Estes são independentes de ions Ca^{2+} [5,18,19].

Esta síntese é estimulada por vários agentes: acetilcolina, bradicinina, endotelina, estresse de cisalhamento, histamina e leucotrieno, entre outros [4].

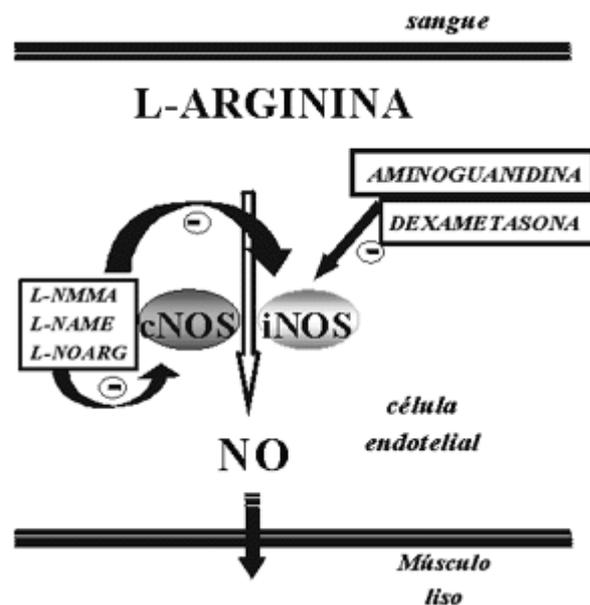


Figura 1 – Via de liberação de óxido nítrico; PIP2 fofatidilinositol 4,5-bifosfato; IP3-inositoltrifostato; ecNOS- óxido nítrico sintase endotelial constitutiva. (Fonte: Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular, Vol 15, Edição 1, jan/Marc 2000)

O óxido nítrico atua através da ativação da enzima guanilato ciclase do músculo liso vascular, aumentando os níveis de GMPc. O GMPc promove a ativação das bombas de cálcio dentro das células musculares lisas, diminuindo as concentrações de cálcio intracelular que promoverá a redução do tônus vascular. Outros mecanismos pelos quais a via NO/GMPc induz vasodilatação incluem inibição da geração de IP3 (na musculatura lisa), desfosforilação da cadeia leve de miosina, inibição do influxo de Ca^{2+} , ativação de proteínas quinases, estimulação da Ca^{2+} -ATPase de membrana e abertura de canais de K^+ [19].

Dentre os mecanismos protetores do NO, podemos citar a ação vasodilatadora, efeito antiagregante plaquetário, efeito antioxidante, inibição da expressão de moléculas de adesão

inibição da mitogênese e proliferação de células musculares lisas e inibição da lipoperoxidação.

A administração aguda de análogos da L-arginina como o L-NAME (hidroclorato de NG-nitro-metil-ester-L-arginina) é capaz de inibir de forma competitiva da isoforma endotelial NOS (eNOS), e conseqüentemente, a biossíntese do óxido nítrico, resultando no bloqueio de seus efeitos vasorrelaxantes e ocasionando um quadro característico de hipertensão. [20-23].

Corpo carotídeo (CC) e hipóxia

O CC é uma pequena estrutura ovóide, de superfície irregular, medindo de 1 a 2 milímetros de diâmetro e intimamente ligado à adventícia das artérias carótidas. É caracterizado como um órgão neuroendócrino derivado da crista neural, localizado na bifurcação dessas artérias.

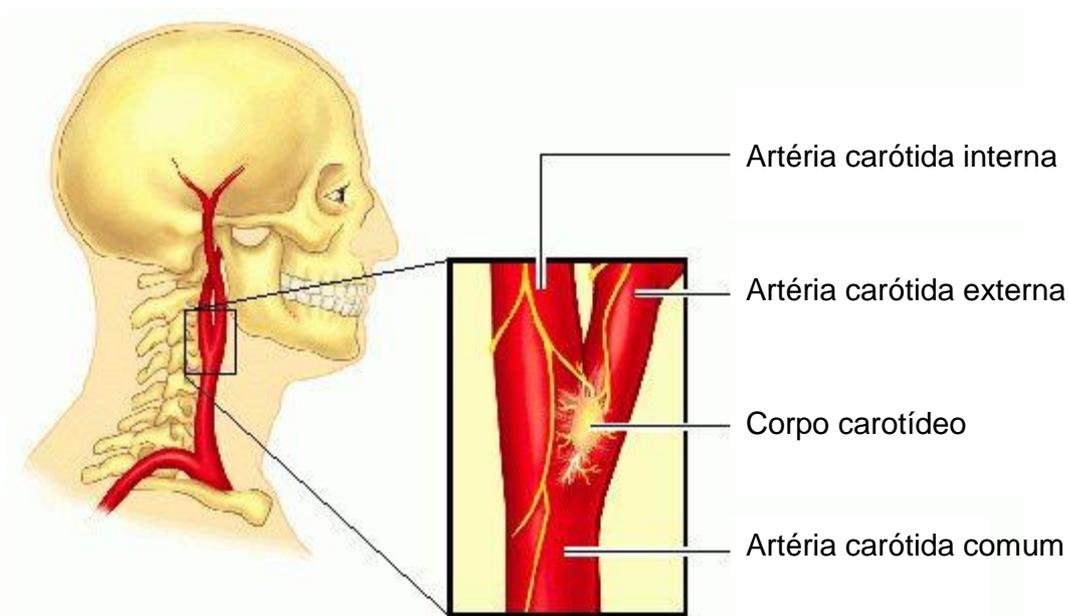


Figura 2. Localização do CC.(fonte: www.medical-dictionary.thefreedictionary.com)

A origem neural do CC pode ser caracterizada pela presença de PGP 9.5, uma hidrolase do carbono terminal da ubiquitina encontrada em tecidos neurais e tecidos neuroendócrinos, que é responsável pelo processo de deubiquitinação. Este processo é importante para que proteínas específicas ligadas à moléculas de ubiquitina não sofram

degradação. A marcação para a degradação de uma proteína é através da sua ligação covalente com a ubiquitina [24].

Embora o PGP 9.5 seja conhecido como um marcador específico para tecido do sistema neuroendócrino, muitos relatos têm indicado que PGP 9.5 é um potencial marcador para determinados tipos de tumores, como câncer de pulmão, cólon e pâncreas [25].

O CC é sensível a mudanças nos níveis de gases sanguíneos e regula a ventilação [19, 26-29]. Ele é composto de agregados celulares intercalados com vasos sanguíneos e feixes nervosos. Cada glomus carotídeo é caracterizador por 4-6 Células tipo 1 ou célula glomos circundados incompletamente por 2-3 Células Tipo 2 ou sustentaculares [29]. Além disso, células progenitoras de células do glomus carotídeo (células claras) estão presentes neste órgão. O nervo do seio carotídeo (CSN), um ramo do nervo glossofaríngeo, é o responsável pela inervação do corpo carotídeo. Este se liga ao tronco cerebral, obtendo a resposta para o estímulo ocorrido.

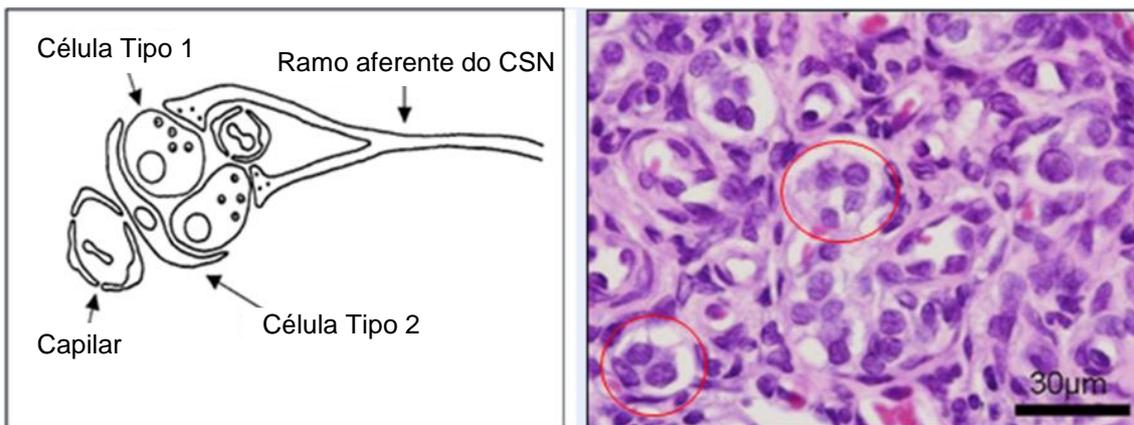


Figura 3. Caracterização de um glomus carotídeo. [30].

A redução dos níveis de oxigênio no sangue arterial (hipóxia), são sentidos pelas células tipo 1 do corpo carotídeo. Essa redução desses níveis fecha canais de potássio sensíveis a mudança de O_2 . Com isso, ocorre a mudança de potencial das células tipo 1 e abre canais de cálcio voltagem dependentes, gerando um efluxo de cálcio. Com isso, vesículas com conteúdo neurotransmissor, são influenciadas a exocitar seu conteúdo vesicular, se aderindo a membrana plasmática da célula e liberando o neurotransmissor na fenda sináptica.

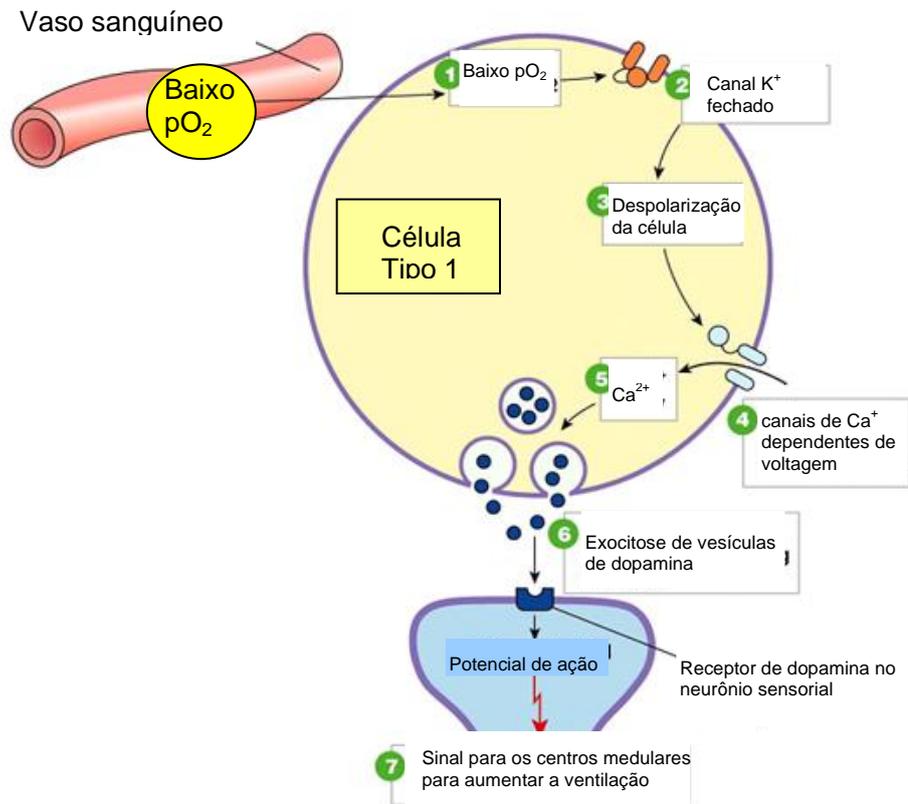


Figura 4. Mecanismo de liberação de neurotransmissores nas fibras nervosas do corpo carotídeo.

As células tipo 1 são caracterizadas pela presença de numerosos grânulos citoplasmáticos contendo aminas biogênicas, em maior quantidade as dopaminas, mais densa na região central, com junções celulares tipo GAP entre essas células [31,32]. As terminações nervosas aferentes fazem contatos sinápticos com uma ou mais destas células [33-35].

As aminas biogênicas são grupos de compostos orgânicos nitrogenados derivadas da descarboxilação enzimática de aminoácidos naturais. Dentre as aminas biogênicas que possuem efeitos fisiológicos encontramos a serotonina e epinefrina. No sistema nervoso central, algumas aminas biogênicas são caracterizadas como neurotransmissores, ou seja, possuem como função enviar quimicamente informações à outras células ou efetuar uma ação final. Dentro deste grupo de aminas biogênicas, temos aquelas que são formada por uma parte de cadeia alifática, a amina, e a outra uma aromática, o catelol, e por isso recebendo o nome de catecolaminas. Dentre as catecolaminas, as mais conhecidas são a dopamina, a noradrenalina e adrenalina. [36,37]. A dopamina é a amina biogênica melhor descrita no corpo carotídeo. Nervos do seio carotídeo possuem receptores dopaminérgicos D1 e D2. D1 está correlacionado à enzima adenilciclase e tem maior afinidade à antagonistas do que a

agonistas dopaminérgicos. Já o receptor D2 não está ligado a adenilciclase e tem alta afinidade tanto por agonistas como por antagonistas. Funções gerais características de neurônios dopaminérgicos parecem ser mediadas por receptores D2. Não foi ainda certamente descrita a função de D1; entretanto supõe-se que os dois receptores atuem interligados, a fim de eliciar uma típica resposta dopaminérgica.

As células tipo 1 do CC são capazes de liberar dopaminas. Estudos mostraram que o aumento da concentração de dopamina na fenda sináptica e inibição dos nervos eferentes do seio carotídeo estão aumentados durante a hipóxia crônica, levando à confirmação da hipótese de que esta inibição seria devido ao autobloqueio de receptores dopaminérgicos presentes nas terminações nervosas e, ao mesmo tempo, atuariam diretamente sobre os autoreceptores D2 nas células tipo 1, aumentando a excitação dos quimiorreceptores e levando a liberação de mais dopamina nas fibras nervosas aferentes [38].

Dentre os neurotransmissores produzidos pelas células tipo 1, o monóxido de carbono (CO) age como tal. O CO é produzido pelas hemi-oxigenases, enzima que converte o anel heme em quantidades equimolares de biliverdina, CO e Fe^{3+} . Esta enzima tem um importante papel fisiológico, regulando os níveis de heme-proteínas e protegendo as células da agressão oxidativa do heme livre e funcionando como um modulador da resposta respiratória do CC. A concentração reduzida de radicais livres no CC mantém os níveis de resposta do órgão baixo, consequentemente sem um aumento desnecessário do volume respiratório. Na hipóxia, o aumento da atividade sensorial é devido à reduzida disponibilidade deste neurotransmissor inibitório na fenda sináptica [39,40].

Dentre os neurotransmissores excitatórios presentes no CC responsáveis pelo controle neural da respiração, temos as taquininas, a junção da substância P (SP) com um L-glutamato. A SP age sobre receptores NK1, um típico receptor ligado a proteína G, presente nas terminações nervosas aferentes do CC. As taquininas são a chave para a resposta do tronco cerebral em decorrência de uma estimulação do corpo carotídeo [41]. Injeções intracerebroventriculares de SP levam ao aumento da pressão arterial sistêmica e ao aumento da ventilação [42]. Além disso, experimentos demonstraram que durante e depois de um período de hipóxia se obteve o aumento de SP no tronco cerebral, a fim de aumentar a ventilação e restaurar os níveis de oxigênio sanguíneo [43,44].

Estudos com animais sobre o transplante de células do CC em neurônios Nigroestriatais em doença de Parkinson, para aumentar a secreção de dopamina, estão em desenvolvimento [45]. No entanto, pouco se sabe sobre a estrutura morfológica do CC, muitas vezes, reduzindo a compreensão dos resultados.

Modelos experimentais comparando o CC de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) com normotensos Wistar Kyoto, mostrou um aumento significativo do volume deste órgão [46]. Além disso, ratos Nova Zelândia geneticamente hipertensos apresentaram uma redução no número de células e uma proliferação da camada íntima da parede vascular [35]. Anormalidades na produção da dopamina têm sido descritas em outros experimentos [47].

Matriz extracelular

A matriz extracelular corresponde aos complexos macromoleculares, formados por moléculas de diferentes naturezas que são produzidas, exportadas e complexadas pelas células, modulando a estrutura, fisiologia e biomecânica dos tecidos. Esta é composta de substância fundamental e de fibras [48-50].

A substância fundamental é composta de glicosaminoglicanos (GAG), proteoglicanos e glicoproteínas adesivas. Estas, interagem umas com as outras e com fibras e células do tecido conjuntivo e do epitélio [51,52].

Os glicosaminoglicanos são polissacarídeos longos, não ramificados, possuidores de carga negativa, compostos de unidades dissacarídicas que se repetem. Um deles, sempre é um aminoaçúcar (N-acetilglicosamina ou N-acetilgalactosamina) e o outro é tipicamente um ácido urônico. Com a sua capacidade de capturar grande quantidade de água, este é um dos responsáveis pela manutenção da fluidez da matriz.

Os proteoglicanos são macromoléculas de GAGs sulfatados que formam ligações covalentes com um eixo protéico. Como os proteoglicanos ocupam grandes volumes, resistem à compressão e retardam o movimento rápido de microorganismos e de células metastáticas. Além disso, em associação com a lâmina basal, formando filtros moleculares com poros de tamanhos variados e com uma distribuição de cargas que selecionam e retardam a passagem de macromoléculas por eles [53, 54].

As glicoproteínas adesivas são macromoléculas que possuem vários domínios, pelo menos um dos quais usualmente se liga à proteínas de superfície celular, as integrinas, fibras de colágeno e proteoglicanos. As principais glicoproteínas adesivas são as fibronectinas, laminina, entactina, tenescina, condronectina e osteonectina. [55].

As fibras da matriz extracelular são divididas em dois sistemas de acordo com sua natureza química, sendo estes, o sistema colagenoso, no qual suas fibras são conhecidas por conter colágeno uma serie de fibras de colágeno e o sistema elástico. O colágeno tem como

função suportar a força tênsil, enquanto a elastina é essencial para a elasticidade da matriz [48].

As fibras colágenas aparecem como feixes espessos e ondulados que quando corados com eosina apresentam coloração rosada, enquanto as fibras reticulares são fibras de espessura fina que se coram em preto quando utilizada a técnica de impregnação com prata. Já as fibras elásticas apresentam-se em forma de fibra ou lamelas coradas em púrpura quando submetidas a técnica de coloração por resorcina-fucsina ou aldeído-fucsina, e são mais resistentes à água quente em contraste com o colágeno que facilmente se transformam em água quente [56].

O colágeno possui dois aminoácidos em sua composição, a hidroxiprolina e a hidroxilisina, que são característicos desta proteína. A síntese do colágeno se inicia no retículo endoplasmático granular, como toda proteína, onde cadeias polipeptídicas (cadeias alfa) são sintetizadas para o interior das cisternas onde ocorre então a hidroxilação da prolina e lisina, sendo importante para esse processo as enzimas prolina hidroxilase e lisina hidroxilase. Cada cadeia alfa é sintetizada com dois peptídeos de registro, um em cada extremidade, que determinam o alinhamento das cadeias protéicas para formar o procolágeno, um precursor do tropocolágeno. No meio extracelular os peptídeos de registro são clivados pela enzima procolágeno peptidase formando então as moléculas de tropocolágeno. As moléculas de tropocolágeno se polimerizam para formar fibrilas de colágeno, onde os resíduos de hidroxiprolina formam pontes de hidrogênio entre as três cadeias alfa para a estabilização da tripla hélice do tropocolágeno. Em alguns tipos de colágenos, principalmente naqueles formadores de fibrilas, as fibrilas se agregam com auxílio de algumas macromoléculas para formar as fibras de colágeno.

As fibras de colágeno são encontradas principalmente em tecidos que sofrem constantemente tração mecânica, como os tendões, ligamentos e pele, e a quantidade e o tipo de colágeno podem variar conforme a necessidade de cada tecido [57-59].

Morfologicamente, distintas redes de fibras elásticas estão presentes na matriz extracelular todos os órgãos, sendo particularmente mais abundante em tecidos que são submetidos periodicamente ao stress. O sistema de fibras elásticas tem papel principal na estrutura e função de órgãos que requerem elasticidade como, por exemplo, as artérias, pulmões e pele [60, 61].

Durante o desenvolvimento das fibras elásticas, inicialmente ocorre a deposição de microfibrilas de modo a formar uma malha e, em seguida, ocorre a deposição gradual de uma substância amorfa entre essa malha de microfibrilas até a completa formação das fibras

elásticas. Essa substância amorfa é a elastina que juntamente com as microfibrilas de fibrilina são os principais constituintes das fibras elásticas [60].

As fibras elásticas fazem parte de um sistema microfibrilar elástico formado pelas fibras elásticas, elaunínicas e oxitalânicas. Ao nível ultra-estrutural as fibras elásticas mostram ser compostas por uma grande quantidade de material amorfo e homogêneo localizado centralmente, cercado por microfibrilas (10-12 nm de diâmetro) que quando cortadas transversalmente apresenta um perfil tubular eletrondenso. Durante o desenvolvimento das fibras elásticas, as microfibrilas são as primeiras estruturas a aparecer, seguidas por um componente amorfo que é gradualmente depositado entre as microfibrilas até a formação das fibras elásticas. Em certas ocasiões, somente a rede de microfibrilas sem o material amorfo (conhecido como fibras oxitalânicas) ocorre em tecidos que, em alguns casos, mesmo após o seu estado maduro, não apresenta fibras elásticas. Em outras ocasiões, tecidos normais de indivíduos adultos demonstram microfibrilas com depósitos dispersos de material amorfo (conhecido como fibras elaunínicas) que também podem não se desenvolver futuramente em fibras elásticas maduras [62].

As fibras do sistema elástico, ou seja, as fibras oxitalânicas, elaunínicas e elásticas podem ser identificadas através de métodos histoquímicos, como através da utilização da técnica do orcinol neo-fucsina, resorcina-fucsina de Weigert sem oxidação e com oxidação e imuno-histoquímicos [63].

As fibras do sistema elástico apresentam características distintas que lhes conferem diferentes propriedades funcionais. As fibras oxitalânicas, por não possuírem elastina na sua composição, apresentam uma maior resistência a força mecânica e pouca elasticidade sendo encontrados em locais que sofrem constante tensão. As fibras elaunínicas apresentam características intermediárias entre as fibras oxitalânicas e elásticas, possuindo resistência a força tênsil e ao mesmo tempo certa elasticidade. E por último, as fibras elásticas que apresentam grande concentração de elastina na sua composição, o que lhes conferem grande capacidade elástica, sendo encontrados em tecidos submetidos à constante distensão, como vasos e pulmão [60,63].

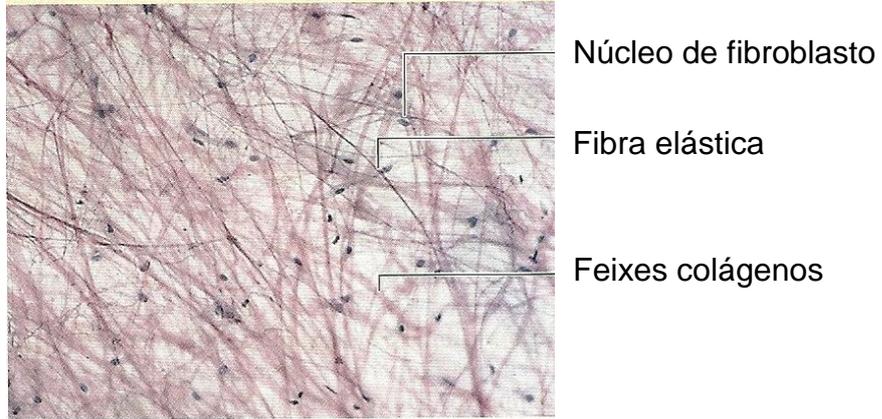


Figura 5. Organização de alguns componentes da matriz extracelular. (Histologia e Biologia Celular, Uma introdução à Patologia. Abraham L. Kierszenbaum, 2ª edição. Editora Elsevier)

Hipótese

Possuiria o CC as mudanças morfofisiológicas na hipertensão arterial sistêmica similares às descritas em hipóxia?

Proposta

Avaliar as possíveis mudanças morfofisiológicas dos componentes celulares e matriz extracelular do corpo carotídeo em decorrência de hipertensão arterial sistêmica.

1 OBJETIVOS

1.1 Gerais

Analisar as mudanças morfofisiológicas do corpo carotídeo gerada pela hipertensão induzida por inibidor da enzima óxido nítrico sintase (L-NAME).

1.2 Específicos

- Observação das alterações dos animais hipertensos;
- Estudo imunohistoquímicos das células do corpo carotídeo;
- Análise ultraestrutural do glomus carotídeo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Vinte ratos Wistar machos jovens, obtido a partir de colônias da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, foram mantidos em condições de habitação normal (21 ± 2 ° C, umidade de $60\% \pm 10$, 12:12 h ciclo claro-escuro) e receberam água e ração padrão para roedores (Nuvilab, Paraná, Brasil), *ad libitum*. Todos os procedimentos foram aprovados e realizados em conformidade com as orientações convencionais de "Cuidado e Uso de Animais de Laboratório" (National Institutes of Health E.U., revista em 1996) e do Comitê de Ética e Pesquisa do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (**protocolo-257/08**).

2.1 Desenho experimental

Dois grupos, cada um composto por dez ratos Wistar foram distribuídos:

O Grupo Controle (C) - Os animais normotensos **não** tratados com L-NAME.

O Grupo L-Name (LN) - animais normotensos que receberam a administração oral de L-NAME (Chemical Sigma-Aldrich) por 45 dias na dosagem 40mg/Kg/Dia [22,23].

Antes de iniciar o experimento os animais passaram por um período de duas semanas de adaptação para se habituarem aos processos de aferição da pressão arterial e massa corporal, sendo as mesmas, verificadas semanalmente durante todo experimento.

Durante todo o experimento, o peso corporal (balança de precisão) e a pressão arterial caudal (método de pletismografia – LETICA LE 5100, Panlab, Spain), foram medidos semanalmente.

Após 45 dias, os ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/kg). O pescoço foi aberto, e o corpo carotídeo (direito e esquerdo) na bifurcação da artéria carótida foi rapidamente isolado, livre de tecido adiposo e tecido conjuntivo aderente.

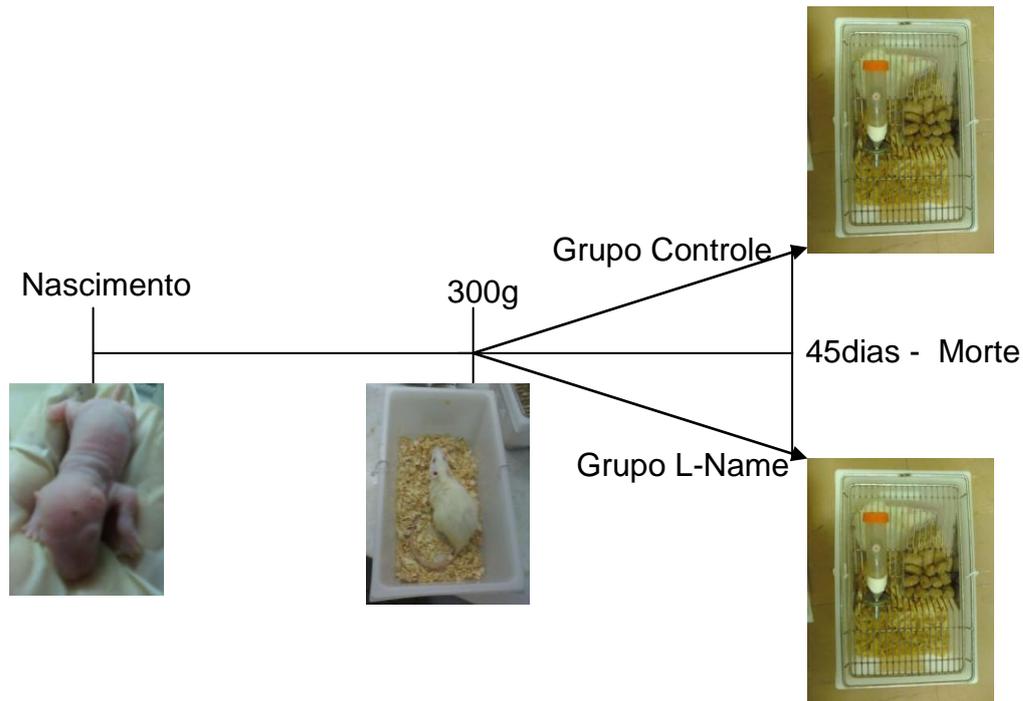


Figura 6. Caracterização da separação dos grupos experimentais

Foram coletadas amostras de ambos os CC e processados para microscopia de luz ($n = 12$) e para microscopia eletrônica de transmissão ($n = 8$). Observa-se que houve o cuidado da separação dos corpos carotídeos direito e esquerdo dos animais para que não fossem utilizados erroneamente juntos para a mesma técnica.

2.2 Microscopia de luz

Doze amostras de corpos carotídeos foram imediatamente fixados em paraformaldeído 4% em 5mM CaCl_2 e glutaraldeído 0,1%, processado em procedimentos de rotina histológica, embebidos em paraplast plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, E.U.A.) e posteriormente seccionados (3 mm).

2.2.1 Técnicas histológicas e histoquímica

- a) Hematoxilina-eosina (HE) para análise do tecido em geral [64]. Anexo A
- b) Resorcina fucsina de Weigert (com pré-oxidação com peroximonosulfato de potássio, oxona), para a visualização das fibras do sistema elástico (Fibras Oxitalânicas, Elaunínicas e Elásticas) [60]. Anexo B;
- c) Picro Sirius Red, para análise das fibras colágenas. Adicionalmente, estas fibras também foram analisadas em microscópio com luz polarizada [65]. Anexo C.
- d) Alcian Blue pH 2,5, para análise de complexos de Glicosaminoglicanos [66]. Anexo D;

2.2.2 Imunohistoquímica

- a) Anti Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF - 1:100, SC7269, Santa Cruz Biotechnology);
- b) Anti Fator nuclear kappa B. (NFk- β 1:100, SC114, Santa Cruz Biotechnology);
- c) Anti Substância P (SP - 1:100 , ab1566, Abcam Inc Chemical);
- d) Anti PGP (PGP 9.5, ab8189, Abcam Inc Chemical);
- e) Anti Oxido nítrico sintase neural (NOS-1 ou nNOS – 1:50, SC648, Santa Cruz Biotechnology).

Estas reações foram amplificadas com o sistema biotina-estreptavidina complexos (K0679, Kit LSAB, Universal DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca), e depois a imunorreatividade foi identificada após incubação com 3,3 'tetracloroeto de diaminobenzidina (K3466, Universal DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) . Cortes foram corados com hematoxilina para a caracterização dos núcleos celulares e após, as lâminas foram montadas e analisadas.

2.3 **Microscopia confocal de varredura a laser**

Seções de corpos carotídeos foram corados pela técnica de fluorescência induzida por formaldeído (FIF) para análise de vesículas com conteúdo de aminas biogênicas e posteriormente analisadas em microscópio óptico confocal de varredura a laser (LSM510 Meta Carl Zeiss). Anexo E.

2.4 Microscopia eletrônica de transmissão

Inclusão em Epon: Anexo F

Corpos carotídeos fixados em solução de glutaraldeído 2,5% (Riedel-de-Haen) em tampão cacodilato 0.1M (pH 7.2) e 0.25% de ácido tânico (Merck) foram a seguir pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% (Sigma), 0.8% de ferrocianeto de potássio em tampão cacodilato 0.1M (pH 7,2) durante uma hora, e posteriormente, desidratados em acetona e incluídos em Epon (Embed-812). Cortes semifinos de um micrômetro (1 μ m) de espessura foram corados com azul de toluidina e observados sob microscopia de luz para selecionar as áreas de interesse e posteriormente, realizar cortes ultrafinos no ultramicrotomo (Leica Ultracut-UCT). Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados em microscópio de transmissão Zeiss EM 906 (Carls Zeiss, OberKöchen, Alemanha) em 80KV.

2.5 Morfometria

Todos os cortes de tecido tiveram suas imagens capturadas sob as mesmas condições (formato TIFF, 36-bit color, 1.280 x 1.024 pixels, com câmera LC Evolution e microscópio Olympus BX51). Analisadas nos programas Image J versão 1,4 (NIH, Bethesda).

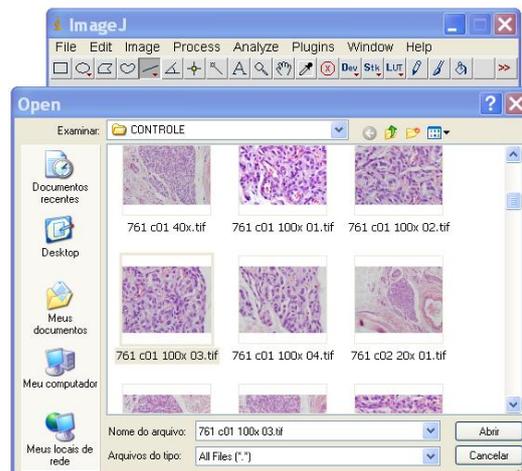
2.5.1 Análise quantitativa

A) Quantificação do número de núcleos totais por área e do número de núcleos por cada glomus carotídeo:

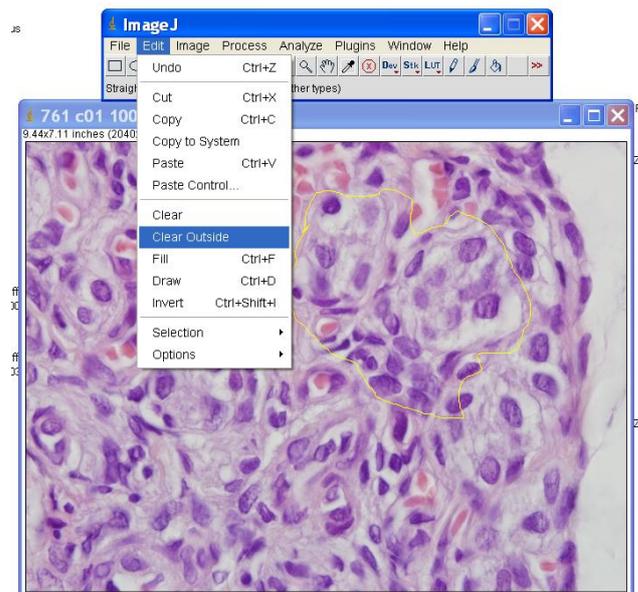
Foram obtidos 5 imagens por animais (7 animais por grupo) do corpo carotídeo coradas com HE, sendo 4 campos analisados em cada imagem, fazendo um total de 20 campos em cada animal, com um total de 140 campos em cada grupo. O número total de células do órgão e de cada glomus foi contado através da ferramenta de "cell counter plugin", utilizando o software Image J versão 1,4 (NIH, Bethesda), carregado com seu plugin "próprio" (<http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/>). Foram assim, analisados a densidade celular obtida

dividindo a quantidade de células pela medição da área da imagem do corpo carotídeo analisados em μm^2 .

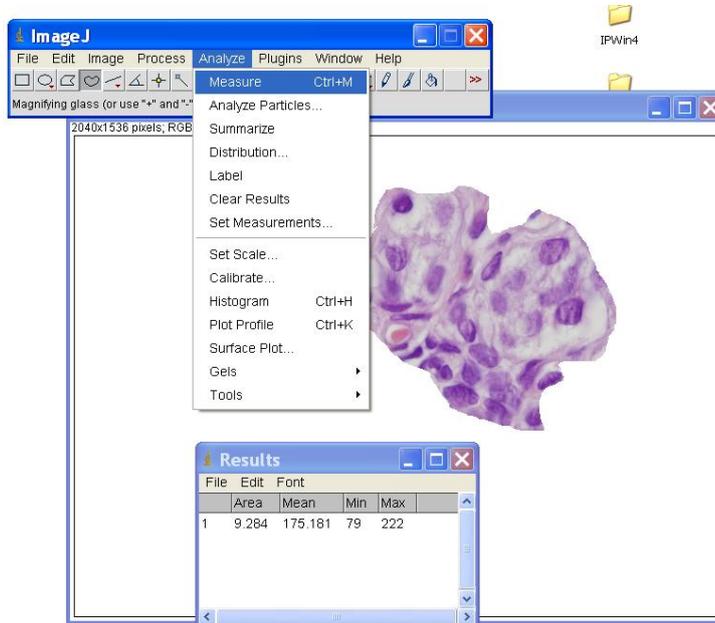
1) Prévia calibração do software e posterior seleção da imagem:



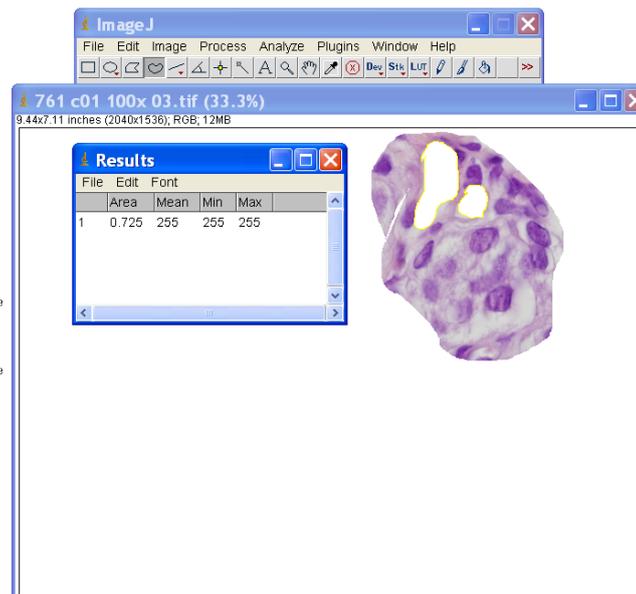
2) Seleção da área escolhida para a mensuração em μm^2 :



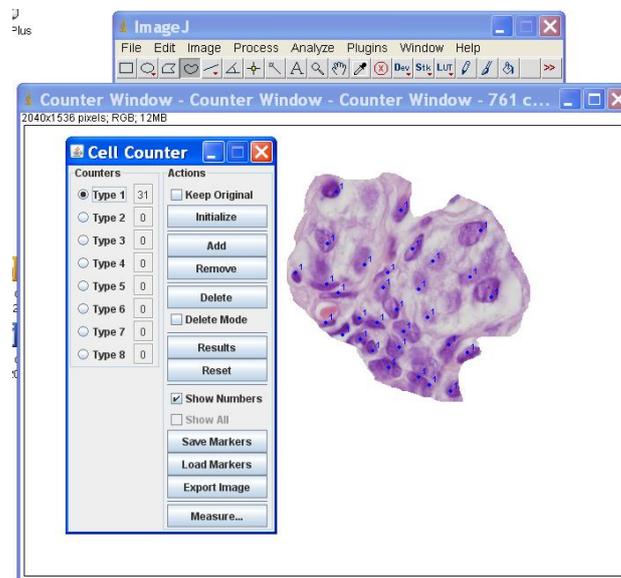
3) Resultado da área escolhida através da ferramenta “ Measure”:



4) Retirar a área dos vasos sanguíneos presentes na área selecionada:



5) Ferramenta “ cell counter” para a quantificação do número de núcleos na região mensurada:



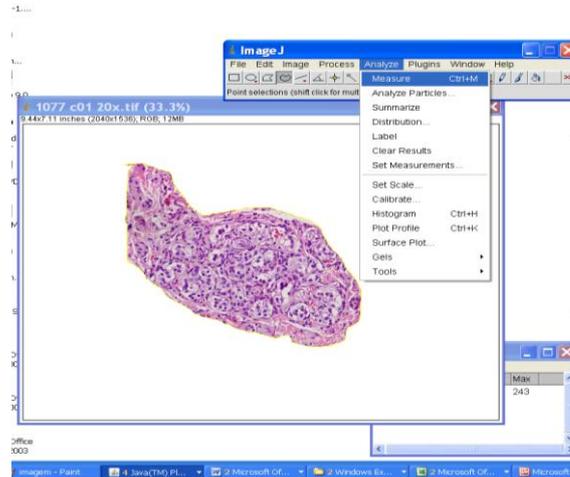
6) Planilha dos resultados para posterior análise no software GraphPad Prism 5.0:

LNAME	Area Fig	Area vaso	AF-AV	n nucleos	nucleo/area	
1						
2	817 c 01	7720,307	-457,809	7270,499	53,000	0,007280
3	817 c 02	7643,296	-346,339	7296,957	39,000	0,005345
4	1074 c 01	2976,741	0,000	2976,741	15,000	0,005039 HE
5	1074 c 02	2868,416	0,000	2868,416	24,000	0,008367
6	1075 c 01	3928,755	0,000	3928,755	17,000	0,004327
7	1077 c 01	4030,238	0,000	4030,238	25,000	0,006203
8	1077 c 02	3862,515	-47,606	3710,119	19,000	0,004952
9	1079 c 01	3253,960	0,000	3253,960	23,000	0,007068
10	1079 c 02	2842,506	0,000	2842,506	14,000	0,004825
11	1080 c 01	2970,075	0,000	2970,075	22,000	0,007407
12	1080 c 02	3095,892	0,000	3095,892	13,000	0,004196
13	1081 c 01	2254,631	0,000	2254,631	13,000	0,005766
14	1081 c 02	2137,301	0,000	2137,301	12,000	0,005615
15						
16						
17						
18						
19	Controle	Area Fig	Area vaso	AF-AV	n nucleos	nucleo/area
20	760 c 01	9240,276	-256,206	8984,070	70,000	0,008879
21	760 c 02	10426,638	-482,946	9943,692	80,000	0,008046
22	761 c 01	8531,633	-785,541	8746,082	80,000	0,009147
23	761 c 02	10072,855	-619,754	9453,101	75,000	0,007934
24	764 c 01	10297,879	-251,051	10046,828	92,000	0,009163
25	764 c 02	9707,650	-136,369	9571,281	71,000	0,008653
26	765 c 01	12794,070	0,000	12794,070	93,000	0,008769
27	765 c 02	8581,999	0,000	8581,999	70,000	0,008157
28	1087 c 01	10325,239	-115,280	10210,059	77,000	0,007542
29	1087 c 02	9773,861	0,000	9773,861	64,000	0,008072
30	1088 c 01	10810,254	-439,605	10370,649	80,000	0,007714
31	760 c 01	10574,540	0,000	10574,540	73,000	0,008903
32	760 c 01 2	7588,715	0,000	7588,715	59,000	0,007775
33	760 c 01 1	10625,845	0,000	10625,845	67,000	0,008325
34	760 c 02 2	8962,573	-256,261	8696,312	54,000	0,006210
35	760 c 01 3	8264,817	-554,191	7710,626	54,000	0,007003
36	761 c 01 1	7457,093	0,000	7457,093	53,000	0,007107
37	761 c 01 2	9617,854	0,000	9617,854	63,000	0,008592
38	761 c 01 1	9951,716	-386,987	9564,729	60,000	0,008916

B) Diferença da área do corpo carotídeo entre os grupos:

7 cortes histológicos de diferentes colorações foram analisados de cada animal (6 animais por grupo), medindo-se o corpo carotídeo (objetiva de 20x para a quantificação da área total visualizada de cada corte. A análise da área foi feito usando a ferramenta "freehand selections" e depois "measure", utilizando o software Image J versão 1.4 (NIH, Bethesda, previamente calibrada para resultado em μm^2).

1) Mensuração da área total do corpo carotídeo de cada corte:



2) Dados expostos em planilha para posterior análise no software GraphPad Prism 5.0:

	LNAME	area PE	area H	Area HE
44	1074-001	25264,519	1074-001	22081,239
45	1075-001	22079,438	1075-001	22670,628
46	1076-001	18079,342	1076-001	14203,458
47	1077-001	13307,878	1077-001	16124,109
48	1078-001	17890,348	1078-001	14241,181
49	1079-001	11613,241	1079-001	13242,211
50	1080-001	19840,384	1080-001	19829,181
51	1080-002	12204,027	1080-002	11953,131
52	1081-001	14223,346	1081-001	17135,292
53	1081-002	19840,388	1081-002	14243,288
54	1081-001	13287,040	1081-001	16091,453
55	1081-002	13961,688		
56				
57	Area media			
58	1074	19754,331		
59	1075	19142,304		
60	1076	14241,304		
61	1077	14241,304		
62	1078	15920,304		
63	1079	14241,304		
64				
65				
66				
67				
68				
69				
70				
71				
72				
73				
74				
75				
76				
77				

2.5.2 Análise qualitativa

a) Análise qualitativa das fibras colágenas, fibras do sistema elástico e proteoglicanos em microscopia de luz:

Dois cortes histológicos de corpo carotídeo (7 animais), totalizando 14 cortes por grupo, foram analisadas. Além disso, as fibras de colágeno foram observadas em microscópio de luz polarizada adicionalmente;

b) Análise qualitativa das imunohistoquímicas em microscopia de Luz e da Técnica da indução de Fluorescência por Formaldeído e Imunofluorescência (anti N-NOS) no microscopio confocal de varredura a laser:

Dois cortes histológicos de CC (7 animais), totalizando 14 cortes por grupo, foram analisadas e qualificadas de acordo com seus diferenciais;

2.6 Análise estatística

Os dados são apresentados como média e SEM (erro padrão de média). Os dados foram testados quanto à normalidade e as diferenças entre os grupos foram analisados segundo o teste T- Student não pareado. Um valor de $P \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo (GraphPad Prism versão 5.00, San Diego, USA).

3 RESULTADOS

A administração de L-NAME correlaciona-se com aumento da pressão arterial e a redução no ganho de peso no grupo LN (**Gráfico 1**). Os níveis de pressão sistólica na última semana de experimento alcançaram uma média de $164,4 \pm 12,15$ mm/Hg no grupo LN, mas apenas $128,9 \pm 5,077$ mm/Hg no grupo C ($p < 0,001$). O aumento da pressão arterial teve início na segunda semana de administração da droga. A massa corporal teve de média ao final da última semana de experimento $329,1g \pm 13,72$ no grupo C e $285,6g \pm 5,82$ no grupo LN.

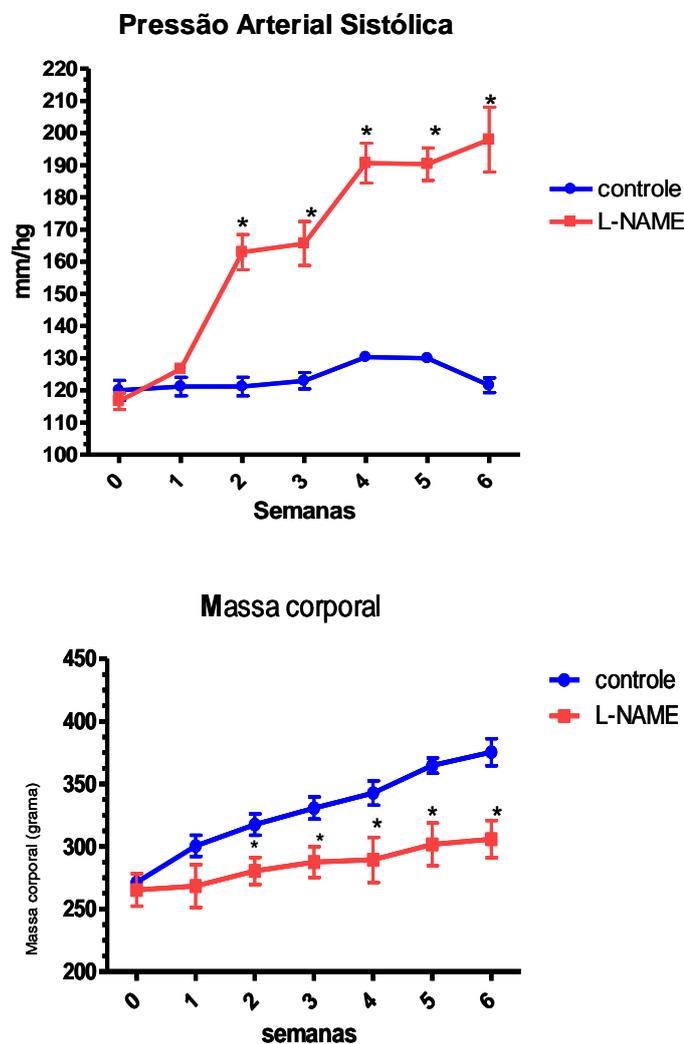


Gráfico 1- Análise da pressão arterial sistólica (acima) e massa corporal (abaixo), durante as 6 semanas de experimento. C x LN ($p < 0,001$).

Na análise morfológica do grupo LN, observou-se a alteração das células do glomus caracterizadas por hipertrofia celular e vacuolização do citoplasma, o que resultou na perda de seu arranjo característico (**Figura 7**)

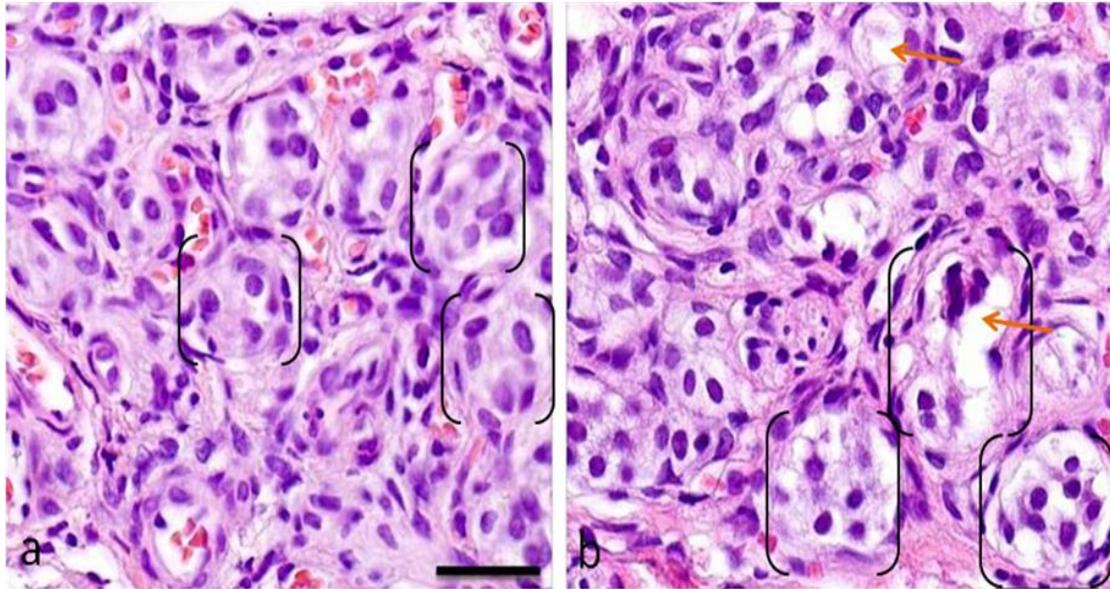


Figura 7- Fotomicrografias de CC corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina. Os colchetes indicam o glomus carotídeo. As setas indicam formação de vacúolos no interior do citoplasma e hipertrofia celular. (a) C; (b) LN. barra =30 μ m

Além disso, observou-se o aumento da área do CC no LN (**Gráfico 2**). Não houve diferença significativa no número total de núcleos por área de CC analisada entre os dois grupos testados (**Gráfico 3**), entretanto a redução do número de núcleos por área de glomus carotídeo foi observado (**Gráfico 4**).

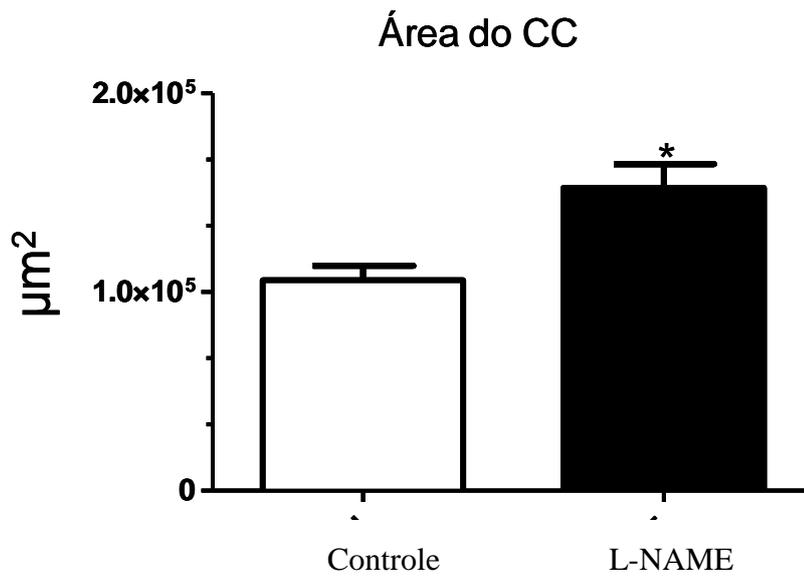


Gráfico 2- Diferença de área do CC analisada entre os grupos C e LN. (* p < 0,05)

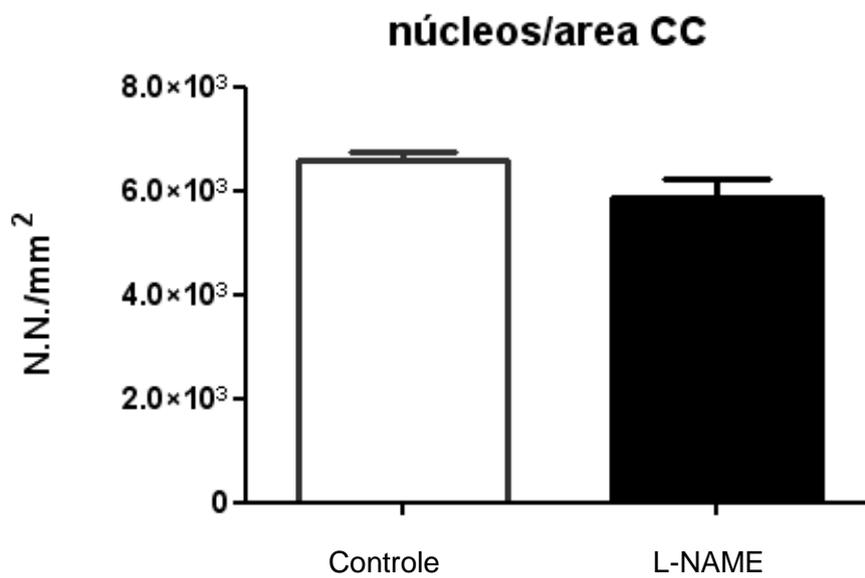


Gráfico 3- Quantificação do número de núcleos totais (estroma + parênquima) entre os grupos C e LN. (*p<0,05)

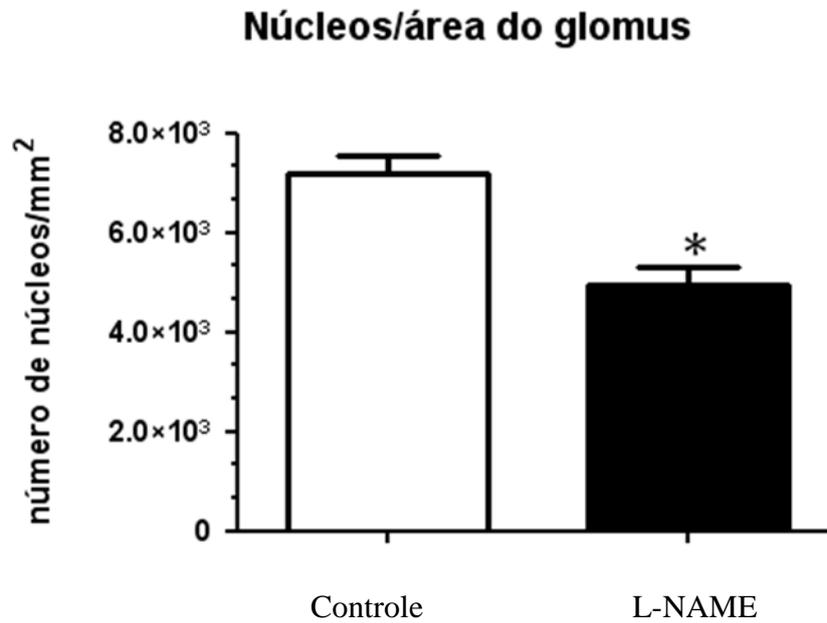


Gráfico 4 - Quantificação do número de núcleos (núcleos das células tipo 1 e células tipo 2) presentes por glomus carotídeo. C x LN. (*p < 0,05).

A análise da coloração com resorcina fucsina de Weigert precedida de oxidação com oxona, mostrou o aumento da coloração das fibras do sistema elástico no grupo LN em relação ao C (**Figura 8**).

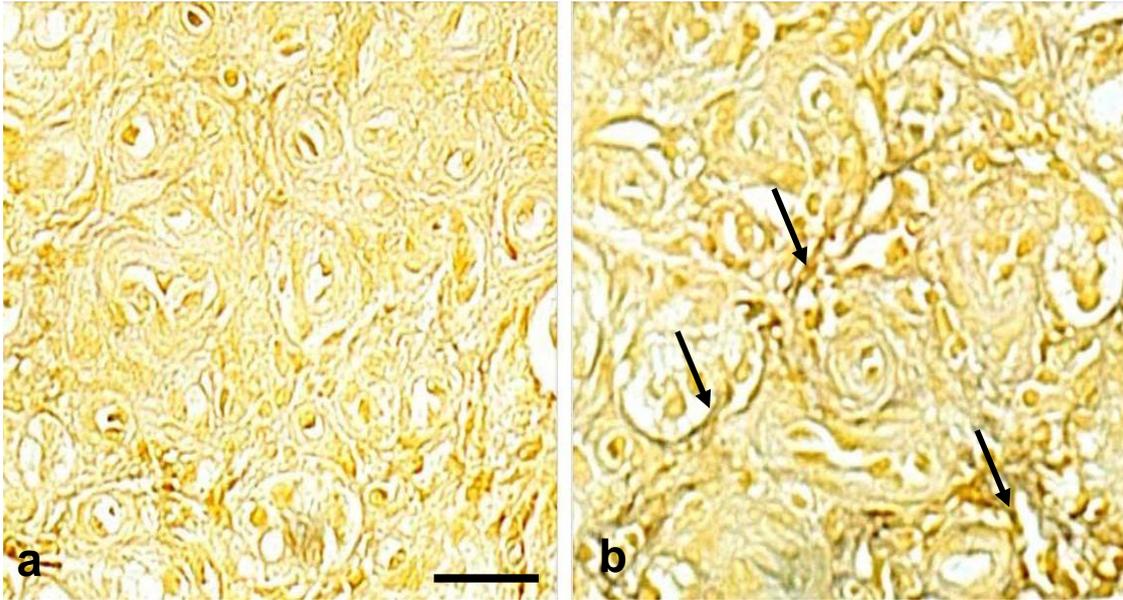


Figura 8- Fotomicrografias de CC corado pela técnica de resorcina fucsina de Weigert precedida de oxidação com oxona. Setas indicam fibras do sistema elástico (fibras oxitalânicas, elaunínicas e elásticas). (a) C; (b) LN. Barra= 30 μ m

A observação da técnica de alcian blue mostrou maior coloração na matriz extracelular e ao redor de vasos sanguíneos no grupo LN em relação ao C (**Figura 9**).

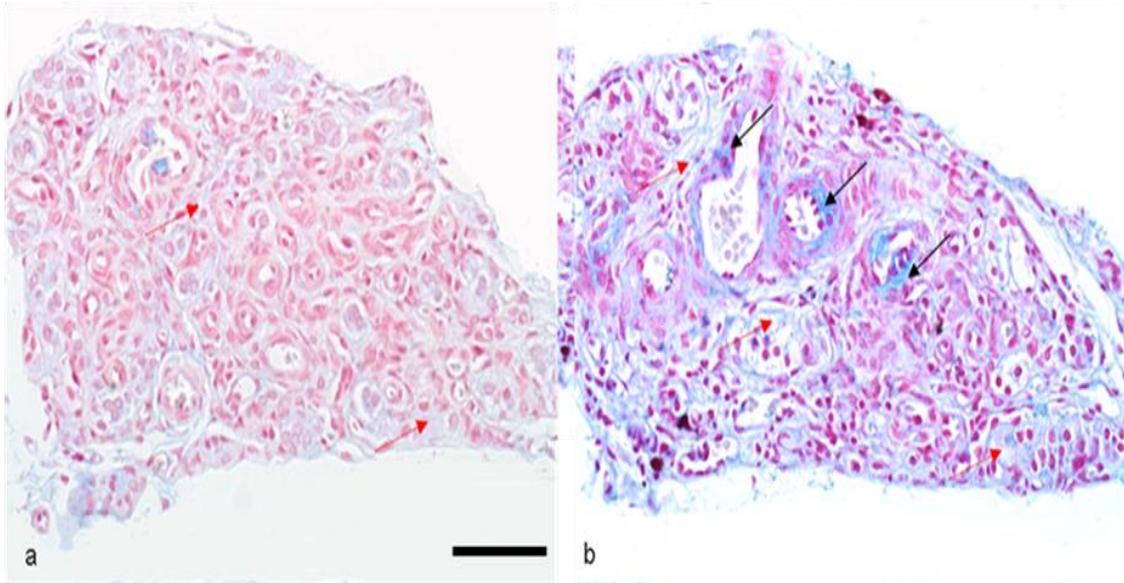


Figura 9- Fotomicrografias de CC corados com alcian blue pH 2,5. Setas vermelhas indicam proteoglicanos na MEC. Setas pretas indicam proteoglicanos ao redor de vasos sanguíneos. (a) C; (b) LN Barra= 30 μ m

A análise qualitativa com a coloração de picro sirius red revelou o aumento da quantidade de fibras colágenas no grupo LN em relação ao grupo C (**Figura 10**).

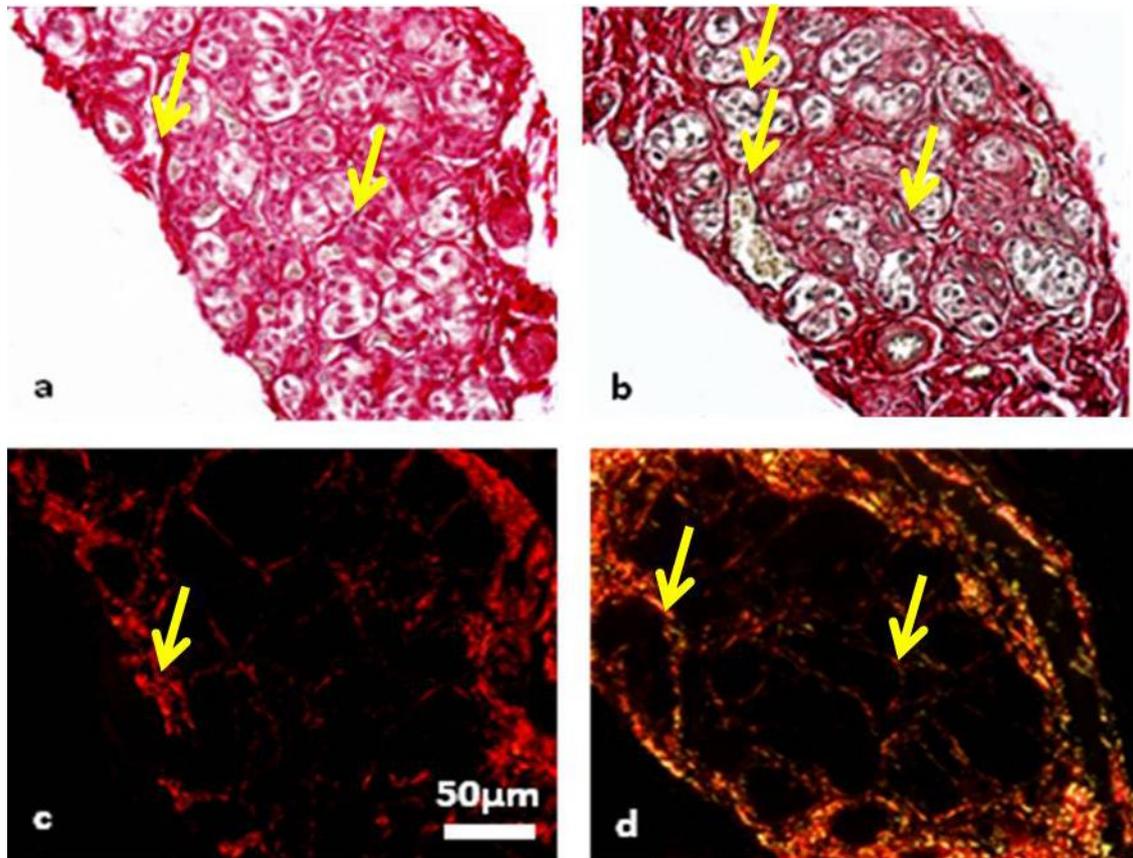


Figura 10- Fotomicrografias de CC corados pela técnica de picro sirius red. C (a,c) x LN (b,d). Em (c,d) Técnica de visualização em microscópio de luz polarizada. Setas indicam fibras de colágeno. Barra = 50 μ m.

A presença de célula clara foi observada em microscópio eletrônico de transmissão no grupo LN (**Figura 11**).

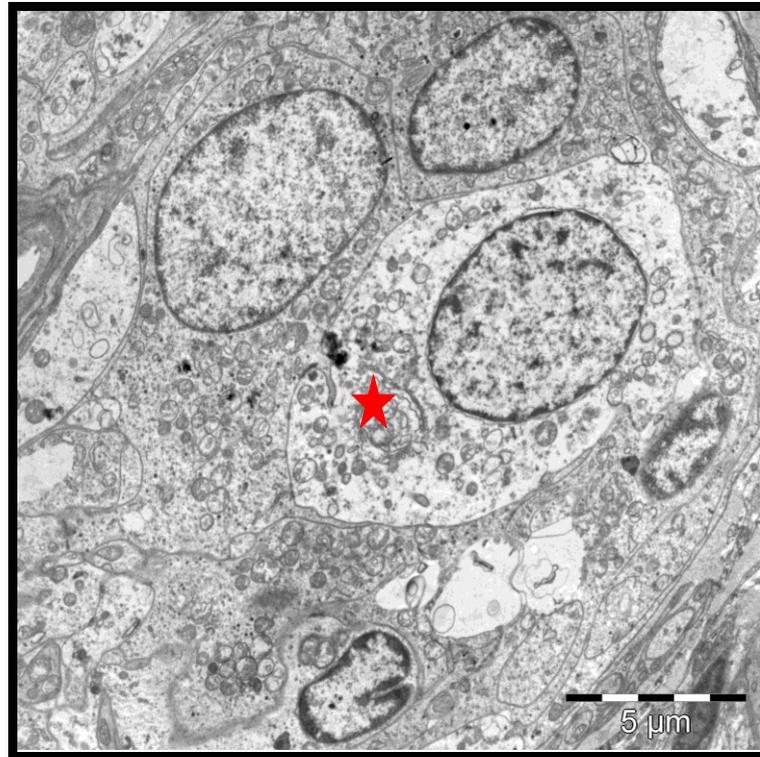


Figura 11- Eletromicrografias de CC. Estrela indica célula Clara. (b) LN

As observações usando a técnica FIF apresentaram aumento das concentração de aminos biogênicas em animais LN. As aminos biogênicas estão presentes em grandes quantidades, dispersos pelo CC (**Figura 12**).

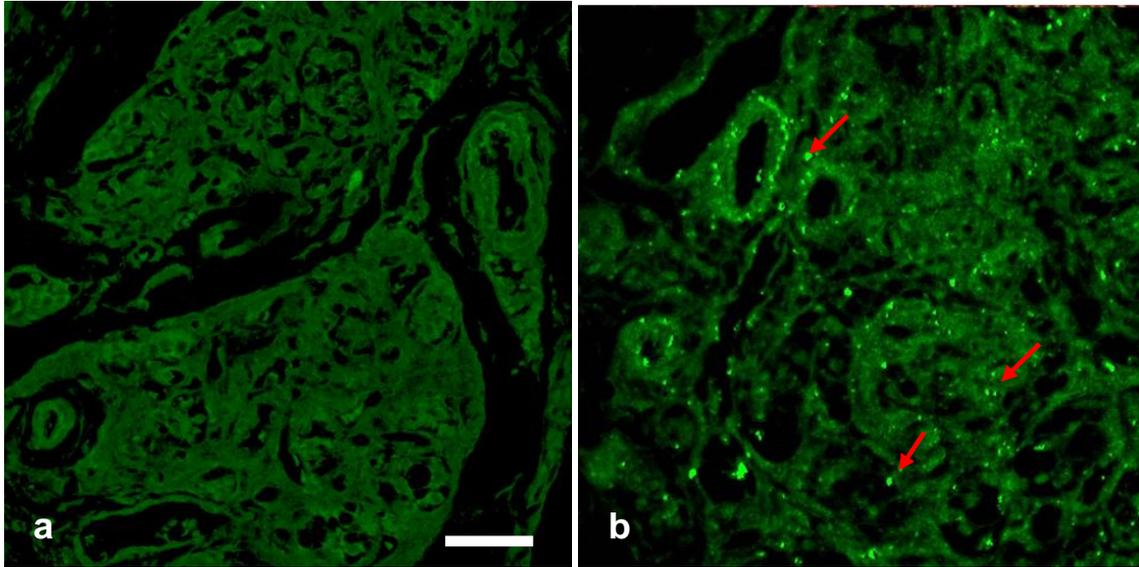


Figura 12- Fotomicrografias de CC corados pela técnica FIF e visualizadas em Microscópio Confocal de Varredura à Laser. (a) C; (b) LN. Setas indicam vesículas de aminos biogênicas marcadas. Barra = 50 μ m

A análise ultraestrutural mostrou o aumento de grânulos eletrodensos e a presença de vacúolos citoplasmáticos no grupo LN em relação ao grupo C. (**Figura 13**).

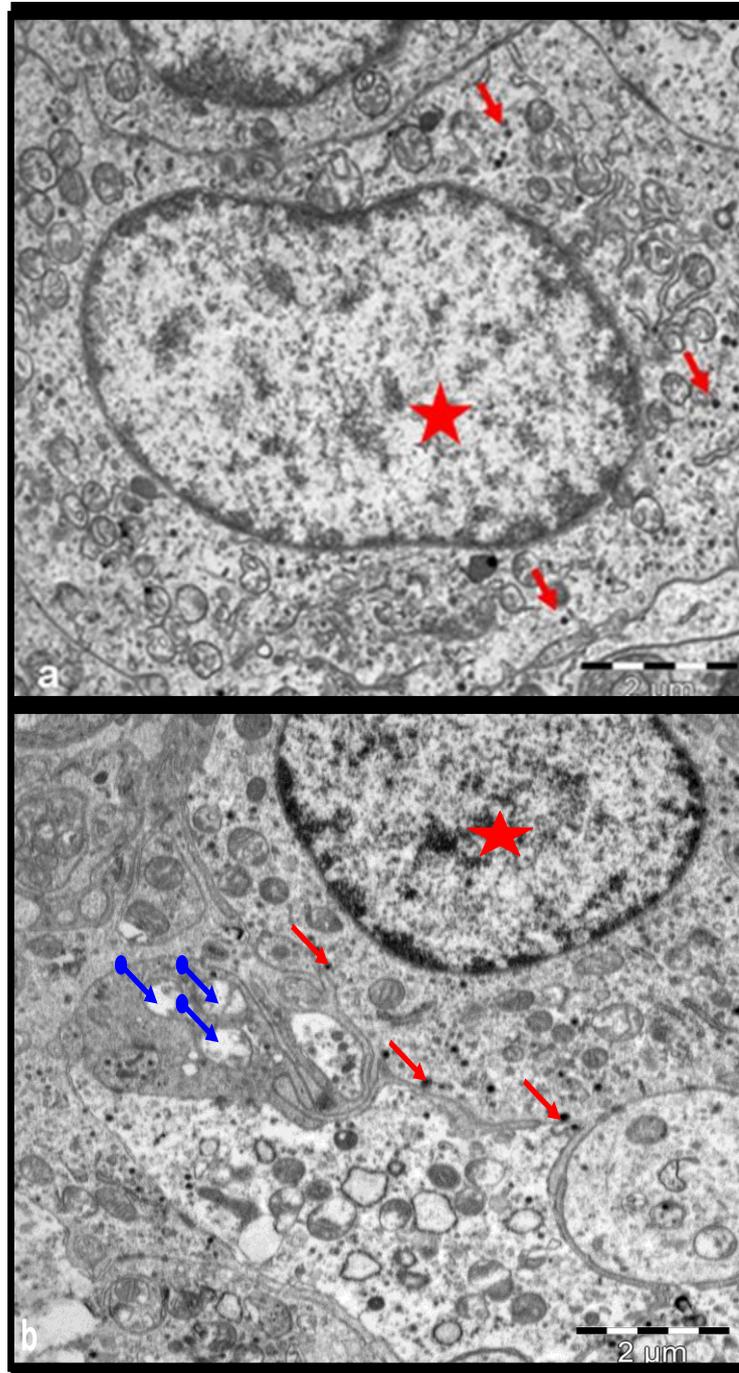


Figura 13- Eletromicrografias de CC. Setas vermelhas indicam grânulos citoplasmáticos. Setas azuis indicam vacúolos citoplasmáticos. Estrelas indicam núcleos. (a) C; (b) LN. Barra= 2μm

A marcação do anticorpo anti-NF- κ B foi visualizado na matriz extracelular para o grupo C enquanto que foi também localizado na matriz extracelular e nos glomus carotídeos no grupo LN (**Figura 14**).

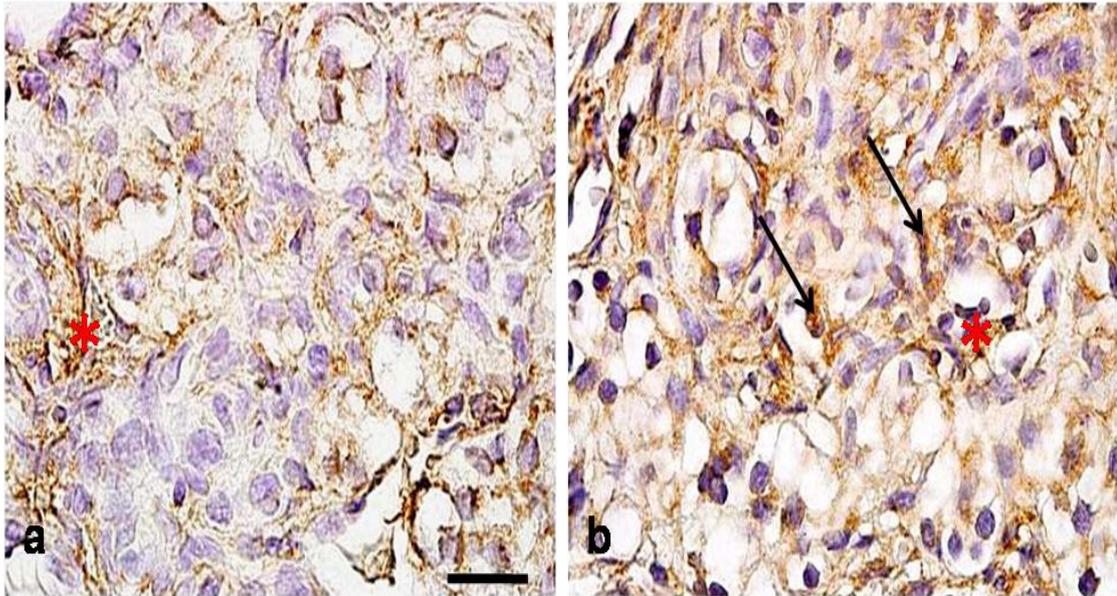


Figura 14 - Fotomicrografias de CC imunomarcados com anticorpo anti-NF- κ B. Setas indicam imunomarcação no glomus e asterístico indica imunomarcação na matriz extracelular. (a) C; (b) LN Barra = 30 μ m

A marcação com anticorpo anti-substância P foi visualizada tanto no grupo C quanto no grupo LN. Entretanto, encontrou-se mais dispersa pelo CC no grupo LN comparado com o grupo C, visualizado em sua maior quantidade no glomus carotídeo (**Figura 15**).

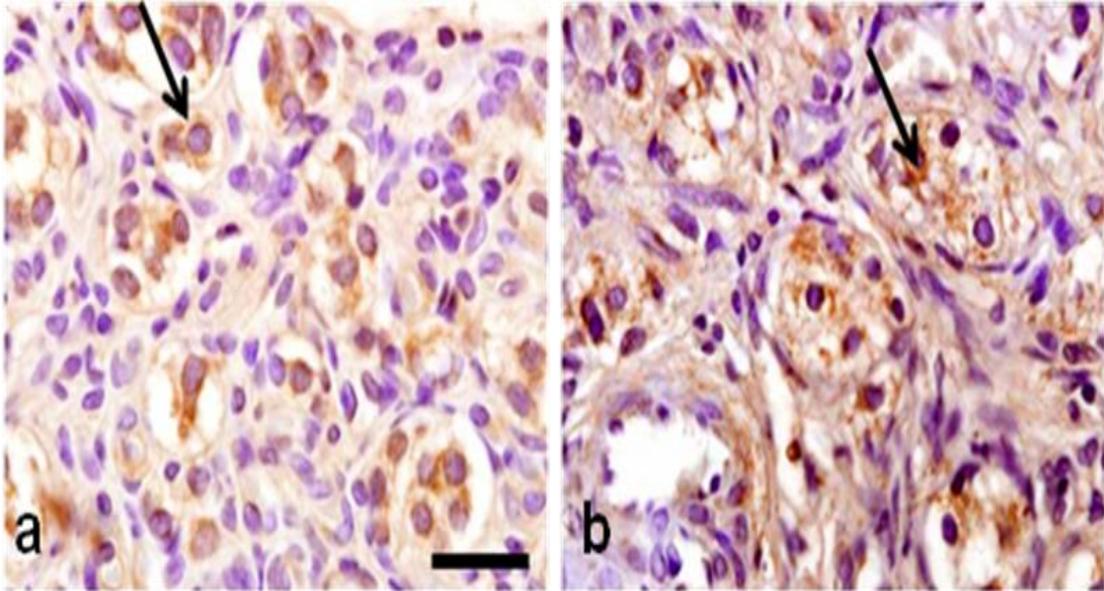


Figura 15 - Fotomicrografias de CC imunomarcados com anticorpo anti-SP. Setas indicam imunomarcação no glomus. (a) C; (b) LN. Barra = 30 μ m

O anticorpo anti-PGP9.5 foi visualizado nos grupos C e LN. Entretanto, sua maior marcação no glomus carotídeo foi visualizada no grupo C quando comparado ao grupo LN. **(Figura 16).**

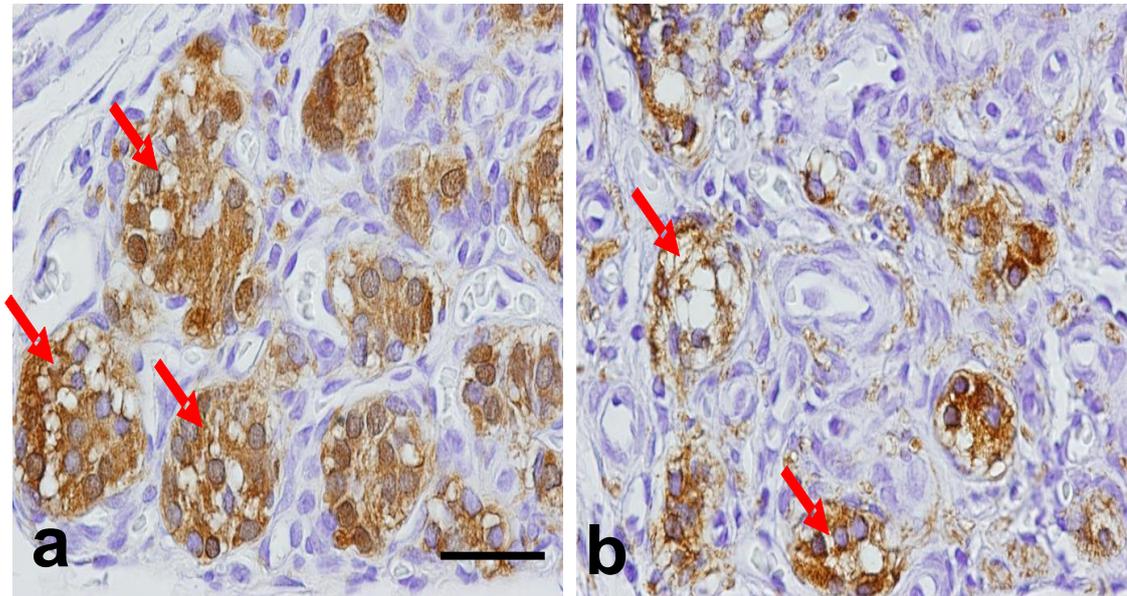


Figura 16 - Fotomicrografias de CC imunomarcados com anticorpo anti-PGP 9.5. Setas indicam imunomarcação no glomus .(a) C; (b) LN Barra = 30 μ m

Imunomarcção para VEGF mostrou-se presente nos grupos C e LN. No grupo C, no entanto, a marcação foi mais intensa nas células do glomus, enquanto no grupo LN, a marcação foi visualizada dispersa pelo citoplasma e presente no glomus carotídeo. (**Figura 17**).

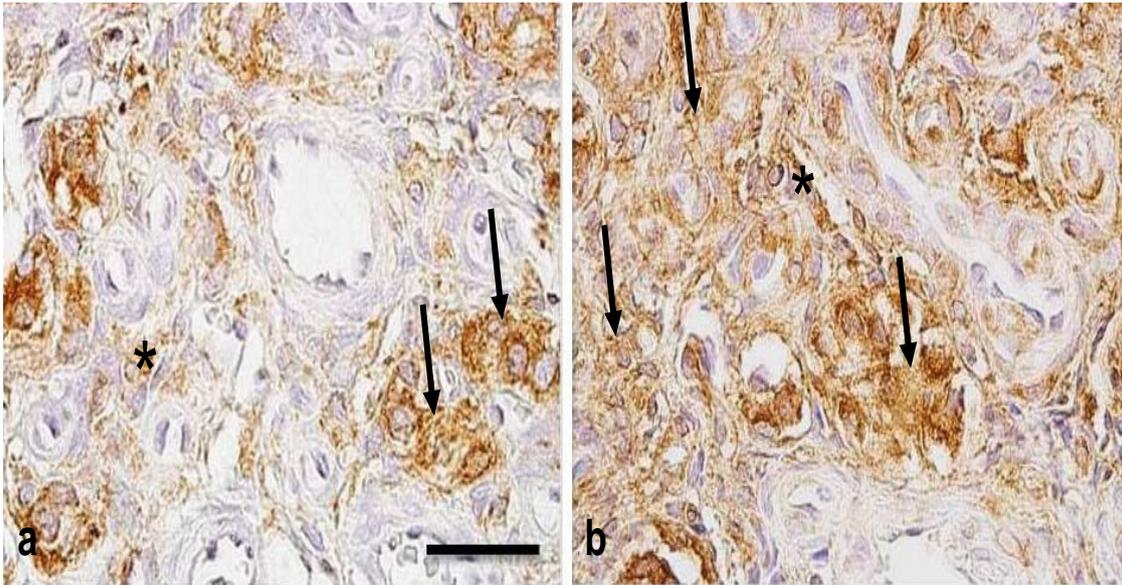


Figura 17 -Fotomicrografias de CC imunomarcados com anticorpo anti-VEGF. Setas indicam imunomarcção no glomus e asterístico indica imunomarcção na matriz extracelular. (a) C; (b) LN Barra = 30 μ m

A marcação com o anticorpo anti-NOS 1 , mostrou-se presente em ambos os grupos. Entretanto, visualiza-se mais presente no grupo LN tanto nos glomus carotídeos quanto distribuídos na matriz extracelular (**figura 18**).

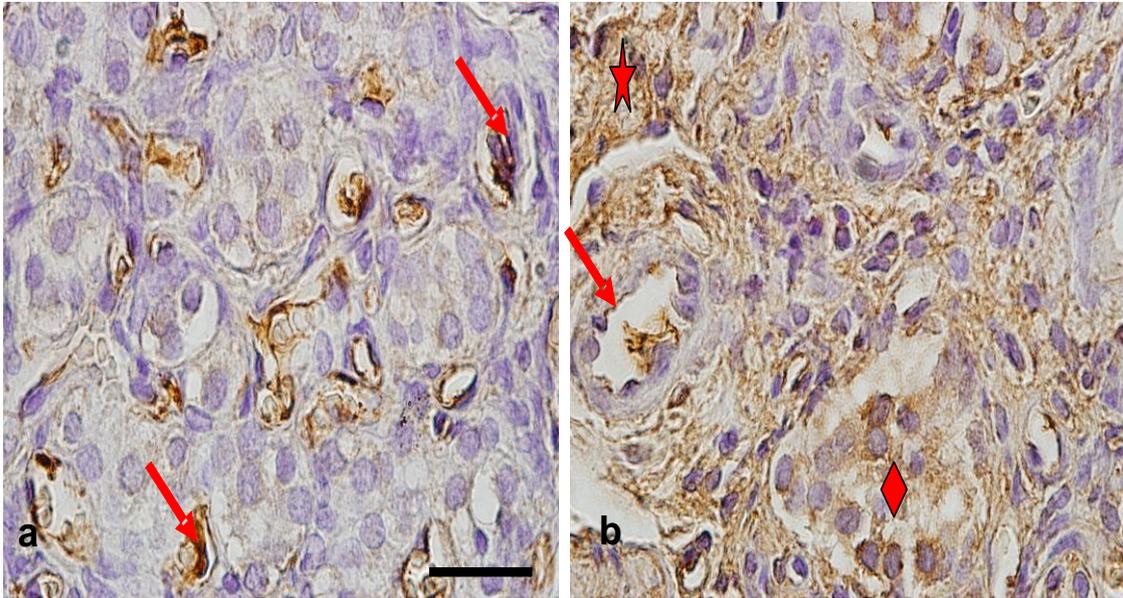


Figura 18 - Fotomicrografias de CC imunomarcados com anticorpo anti-NOS 1 . Setas indicam imunomarcação em vasos sanguíneos, estrela indica imunomarcação na matriz extracelular e losango indica marcação no glomus carotídeo. (a) C; (b) LN Barra = 30 μ m.

4 DISCUSSÃO

O aumento da pressão arterial pela administração oral de L-NAME é considerado um dos modelos para o desenvolvimento da hipertensão arterial sistêmica. Experimentos com a utilização de ratos da linhagem Wistar foram utilizados para análise da pressão arterial sistólica. Estes dados mostraram o aumento da pressão arterial no grupo L-NAME em relação ao grupo controle em 5 semanas de experimentação. Entretanto não houve diferença estatística em relação à massa corporal dos animais durante o experimento. [23]. Nosso estudo mostrou o aumento da pressão arterial sistólica com diferença estatística entre o grupo C e LN já na segunda semana de experimento até a finalização deste, após 45 dias de administração. Além disso, foi observado a redução do ganho de peso nos animais do grupo LN, também a partir da segunda semana de administração da droga. Nosso trabalho sugere que devido à diferença de acomodação e ao tempo diferenciado de experimentação dos animais ao experimento citado, isto possa ter influenciado na redução do ganho de peso dos nossos animais.

Os corpos carotídeos de ratos submetidos à hipóxia crônica tiveram um aumento de volume em relação ao grupo controle [67,68]. Este mesmo aumento foi observado em ratos Nova Zelândia geneticamente hipertensos [35] e em nosso estudo. Além disso, não houve diferença estatística no número de núcleos totais entre os grupos estudados, mas o grupo LN mostrou uma redução no número de núcleos de células do tipo 1 e 2 em cada glomus carotídeo. O aumento da área do CC pode estar relacionado à uma alteração nos componentes de matriz extracelular e fibrose, uma vez que a análise qualitativa sugere o aumento de fibras do sistema elástico, proteoglicanos e fibras de colágeno. A redução do número de células tipo 1 e 2 foi caracterizado em outros estudos experimentais. [67,69]. Lopez-Barneo e colaboradores sugerem o aumento do número de células do tipo 2 em modelos experimentais de sensibilidade ao oxigênio, possivelmente devido à presença de células progenitoras do CC [69]. Uma explicação para a diferença nos resultados entre os achados de Lopez-Barneo e colaboradores com o nosso estudo pode ser devido ao tempo de experimento diferenciado entre os dois modelos experimentais.

Estudos em pacientes com apnéia obstrutiva do sono e morbidade cardiovascular, especialmente hipertensão arterial sistêmica, mostraram um aumento significativo na produção e circulação de catecolaminas durante a apnéia [70,71]. A inibição da enzima óxido nítrico sintase aumenta a descarga quimiosensora do CC, levando à redução da passagem de íons como potássio, que geram a despolarização de membrana e, conseqüentemente, o

aumento da atividade simpática através da liberação acelerada do conteúdo de neurotransmissores, em especial de aminas biogênicas, encontradas no citoplasma das células tipo 1 [72,73]. Nosso estudo mostrou um aumento da concentração de aminas biogênicas no CC do grupo LN. Através das eletromicrografias, certificou-se o aumento desses grânulos no citoplasmática do grupo tratado com L-NAME, sugerindo o aumento da produção desses neurotransmissores, aumentando a atividade simpática e regulando a pressão do sangue, como ocorre nos distúrbios do sono e hipóxia [74,75].

O NF-kB é responsável pela transcrição do DNA. Este fator é encontrado em vários tipos celulares e estão diretamente envolvidos na resposta celular a um estímulo diferenciado. Estudos com modelos de hipóxia crônica revelaram a hipertrofia das células tipo 1 do corpo carotídeo [76]. Com o aumento da expressão de NF-kB em nosso experimento, sugerimos que o fator de transcrição está relacionada com hipertrofia dessas células.

Células Tipo 1 produzem a substância P, um neurotransmissor que pode atuar como um modulador da transmissão excitatória. Experimentos com exposição à hipóxia no período de quatro semanas, mostraram o aumentado da demanda desse neurotransmissor, sugerindo que as fibras nervosas do receptor de substância P estão envolvidos na resposta quimiossensora e de dilatação vascular [77-79]. Os ratos submetidos à inibição da enzima óxido nítrico sintase durante 6 semanas exibiu, em nosso estudo, o aumento da marcação para substância P. Isto pode sugerir que o neurotransmissor está sendo utilizado para estímulo quimiossensor e um importante vasodilatador cujo o objetivo é aumentar a circulação sanguínea e manter em níveis basais a quantidade de oxigênio que chega aos tecidos, mesmo em condições patológicas.

O produto do gene da proteína 9.5 foi descrito nas células tipo 1 [80]. Nosso trabalho sugere a redução desta no glomus do CC, sugerindo que existe uma redução do processo de ubiquitinação, ou seja, redução da degradação de proteínas no grupo hipertenso em relação ao controle que poderia estar sugerindo um acúmulo de proteínas desnecessárias para o funcionamento do CC.

O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é um sinal químico produzido pelas células que aumenta a vascularização restabelecendo o fornecimento de oxigênio aos tecidos quando ocorre diminuição do fluxo sanguíneo [81,82]. Nosso experimento mostrou o aumento da produção de VEGF pelas células e sua dispersão pela matriz extracelular no grupo dos animais hipertensos. Estes resultados são semelhantes aos resultados de experimentos em ratos expostos à hipóxia crônica, onde foi sugerido o aparecimento de uma precoce angiogênese no corpo carotídeo [10].

Além disso, um possível aumento da expressão da enzima produtora do vasodilatador óxido nítrico está sendo mostrada em nosso trabalho. A nNOS ou NOS 1 é encontrada em axônios do CC e está diretamente relacionados com as células tipo 1 e os vasos sanguíneos, sendo o oxigênio do sangue usado como co-fator para a síntese do óxido nítrico neuronal [83]. Estudos mostraram que a atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS) foi significativamente menor em um ambiente com baixa pO_2 em relação à um ambiente controle. A atividade quimiossensora in vitro mostrou-se aumentada de forma dose-dependente em resposta à L-omega nitro-arginina (L-NNA), um inibidor da atividade da NOS [84]. Nosso estudo sugere um aumento da atividade da NOS neuronal na presença do inibidor L-NAME, possivelmente pelo um aumento de descarga neurotransmissora, reduzindo os efeitos do aumento de pressão causados pelo L-NAME.

5 CONCLUSÃO

Nosso experimento conclui:

- a) Ocorrência de alterações dos seguintes componentes da matriz extracelular:
 - a.1 Fibras do sistema elástico;
 - a.2 Proteoglicanos;
 - a.3 Fibras colágenas;

- b) Seguintes alterações foram observadas em microscopia ótica e eletrônica:
 - b.1 Aumento da área do corpo carotídeo no grupo LN;
 - b.2 Redução do número de núcleos no glomus carotídeo no grupo LN;
 - b.3 Aumento de grânulos eletrodensos no grupo LN;
 - b.4 Aumento da expressão de componentes celulares: NF-kB, SP, VEGF, nNOS no grupo LN.
 - b.5 Redução da expressão do componente PGP 9.5 no grupo LN.

- c) Sugere-se que as alterações descritas se assemelham as seguintes descritas em hipóxia:

HIPÓXIA	HIPERTENSÃO
-Aumento do volume do CC; -Aumento da produção de VEGF e SP; -Aumento de componentes da matriz extracelular; -Redução do número de células no glomus carotídeo.	-Aumento da área do CC; -Aumento da produção de VEGF e SP; -Aumento de componentes da matriz extracelular; -Redução do número de núcleos de células no glomus carotídeo.

REFERÊNCIAS

- [1] Mayet J, Hughes A. Cardiac and vascular pathophysiology in hypertension. *Heart (British Cardiac Society)*. 2003 Sep;89(9):1104-9.
- [2] Qin H, Ishiwata T, Wang R, Kudo M, Yokoyama M, Naito Z, et al. Effects of extracellular matrix on phenotype modulation and MAPK transduction of rat aortic smooth muscle cells in vitro. *Experimental and molecular pathology*. 2000 Oct;69(2):79-90.
- [3] Gkaliagkousi E, Passacquale G, Douma S, Zamboulis C, Ferro A. Platelet activation in essential hypertension: implications for antiplatelet treatment. *American journal of hypertension*. 2010 Mar;23(3):229-36
- [4] Park KH, Park WJ, Kim MK, Jung JH, Choi S, Cho JR, et al. Noninvasive brachial-ankle pulse wave velocity in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy. *American journal of hypertension*. 2010 Mar;23(3):269-74
- [5] Wang G, Zhang Z, Ayala C. Hospitalization costs associated with hypertension as a secondary diagnosis among insured patients aged 18-64 years. *American journal of hypertension*. 2010 Mar;23(3):275-81
- [6] Brunner H, Cockcroft JR, Deanfield J, Donald A, Ferrannini E, Halcox J, et al. Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *Journal of hypertension*. 2005 Feb;23(2):233-46
- [7] Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE, Jr., Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *The New England journal of medicine*. 1990 Jul 5;323(1):22-7
- [8] Munzel T, Sinning C, Post F, Warnholtz A, Schulz E. Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction. *Annals of medicine*. 2008;40(3):180-96
- [9] Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Alger L, Hirth P, Mc Mahon G, Waltenberger J, et al. Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *Faseb J*. 2001 Feb;15(2):427-38.
- [10] Tipoe GL, Fung ML. Expression of HIF-1alpha, VEGF and VEGF receptors in the carotid body of chronically hypoxic rat. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2003 Nov 14;138(2-3):143-54.
- [11] Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 2006 Oct 30;25(51):6680-4.
- [12] Nanduri J, Yuan G, Kumar GK, Semenza GL, Prabhakar NR. Transcriptional responses to intermittent hypoxia. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2008 Dec 10;164(1-2):277-81.
- [13] Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *British journal of pharmacology*. 2006 Jan;147 Suppl 1:S193-201.
- [14] Mann GE, Yudilevich DL, Sobrevia L. Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. *Physiological reviews*. 2003 Jan;83(1):183-252.
- [15] Deves R, Boyd CA. Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. *Physiological reviews*. 1998 Apr;78(2):487-545.
- [16] Dudzinski DM, Igarashi J, Greif D, Michel T. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2006;46:235-76.
- [17] Chen LY, Mehta JL. Variable effects of L-arginine analogs on L-arginine-nitric oxide pathway in human neutrophils and platelets may relate to different nitric oxide synthase

isoforms. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1996 Jan;276(1):253-7

- [18] Gardiner SM, Kemp PA, Bennett T, Palmer RM, Moncada S. Nitric oxide synthase inhibitors cause sustained, but reversible, hypertension and hindquarters vasoconstriction in Brattleboro rats. *European journal of pharmacology*. 1992 Mar 31;213(3):449-51.
- [19] Biscoe TJ. Carotid body: structure and function. *Physiological reviews*. 1971 Jul;51(3):437-95.
- [20] Nakanishi K, Mattson DL, Cowley AW, Jr. Role of renal medullary blood flow in the development of L-NAME hypertension in rats. *The American journal of physiology*. 1995 Feb;268(2 Pt 2):R317-23.
- [21] Swislocki A, Eason T, Kaysen GA. Oral administration of the nitric oxide biosynthesis inhibitor, N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), causes hypertension, but not glucose intolerance or insulin resistance, in rats. *American journal of hypertension*. 1995 Oct;8(10 Pt 1):1009-14
- [22] Fink J, Fan NY, Rosenfeld L, Stier CT, Jr. Contribution of endothelin to the acute pressor response of L-NAME in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1998 Apr;31(4):618-22.
- [23] Neto-Ferreira R, Novaes Rocha V, da Silva Torres T, Mandarim-de-Lacerda CA, de Carvalho JJ. Beneficial effects of rosuvastatin on aortic adverse remodeling in nitric oxide-deficient rats. *Exp Toxicol Pathol*. May 26
- [24] Wilkinson KD. Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Seminars in cell & developmental biology*. 2000 Jun;11(3):141-8.
- [25] Otsuki T, Yata K, Takata-Tomokuni A, Hyodoh F, Miura Y, Sakaguchi H, et al. Expression of protein gene product 9.5 (PGP9.5)/ubiquitin-C-terminal hydrolase 1 (UCHL-1) in human myeloma cells. *British journal of haematology*. 2004 Nov;127(3):292-8.
- [26] Feng J, Chen BY, Cui LY. Carotid body-mediated changes of sympathetic nerve and their relationships with hypertension. *Chinese medical journal*. 2008 Sep 5;121(17):1732-5
- [27] Abudara V, Eyzaguirre C. Mechanical sensitivity of carotid body glomus cells. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2008 Apr 30;161(2):210-3.
- [28] Torres RA. Carotid body and sympathetic activation in heart failure: a story of sensors and sensitivity. *Cardiovascular research*. 2009 Mar 1;81(4):633-4.
- [29] Izal-Azcarate A, Belzunegui S, San Sebastian W, Garrido-Gil P, Vazquez-Claverie M, Lopez B, et al. Immunohistochemical characterization of the rat carotid body. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2008 Mar 20;161(1):95-9.
- [30] Peers C. The G. L. Brown Prize Lecture. Hypoxic regulation of ion channel function and expression. *Experimental physiology*. 2002 Jul;87(4):413-22.
- [31] Morgan M, Pack RJ, Howe A. Nerve endings in rat carotid body. *Cell Tissue Res*. 1975;157(2):255-72.
- [32] Eyzaguirre C. Chemical and electric transmission in the carotid body chemoreceptor complex. *Biological research*. 2005;38(4):341-5
- [33] Conde SV, Obeso A, Rigual R, Monteiro EC, Gonzalez C. Function of the rat carotid body chemoreceptors in ageing. *Journal of neurochemistry*. 2006 Nov;99(3):711-23.
- [34] Rigual R, Lopez-Lopez JR, Gonzalez C. Release of dopamine and chemoreceptor discharge induced by low pH and high PCO₂ stimulation of the cat carotid body. *The Journal of physiology*. 1991 Feb;433:519-31.
- [35] Bee D, Barer G, Wach R, Pallot D, Emery C, Jones S. Structure and function of the carotid body in New Zealand genetically hypertensive rats. *Quarterly journal of experimental physiology (Cambridge, England)*. 1989 Sep;74(5):691-701

- [36] Hellstrom S, Koslow SH. Biogenic amines in carotid body of adult and infant rats--a gas chromatographic-mass spectrometric assay. *Acta physiologica Scandinavica*. 1975 Apr;93(4):540-7.
- [37] Alfes H, Kindler J, Knoche H, Matthiessen D, Mollmann H, Pagnucco R. The biogenic amines in the carotid body. *Progress in histochemistry and cytochemistry*. 1977;10(2):1-69.
- [38] Okajima Y, Nishi K. Analysis of inhibitory and excitatory actions of dopamine on chemoreceptor discharges of carotid body of cat in vivo. *The Japanese journal of physiology*. 1981;31(5):695-704.
- [39] Krammer EB. Carotid body chemoreceptor function: hypothesis based on a new circuit model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1978 May;75(5):2507-11.
- [40] Prabhakar NR. Endogenous carbon monoxide in control of respiration. *Respiration physiology*. 1998 Oct;114(1):57-64.
- [41] Mazzone SB, Hinrichsen CF, Geraghty DP. Substance P receptors in brain stem respiratory centers of the rat: regulation of NK1 receptors by hypoxia. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1997 Sep;282(3):1547-56.
- [42] Chen ZB, Hedner J, Hedner T. Local effects of substance P on respiratory regulation in the rat medulla oblongata. *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology*. 1990 Feb;68(2):693-9.
- [43] Arregui A, Barer GR, Emson PC. Neurochemical studies in the hypoxic brain: substance P, met-enkephalin, GABA and angiotensin converting enzyme. *Life sciences*. 1981 Jun 29;28(26):2925-9.
- [44] Srinivasan M, Goiny M, Pantaleo T, Lagercrantz H, Brodin E, Runold M, et al. Enhanced in vivo release of substance P in the nucleus tractus solitarius during hypoxia in the rabbit: role of peripheral input. *Brain research*. 1991 Apr 19;546(2):211-6
- [45] Minguez-Castellanos A, Escamilla-Sevilla F, Hotton GR, Toledo-Aral JJ, Ortega-Moreno A, Mendez-Ferrer S, et al. Carotid body autotransplantation in Parkinson disease: a clinical and positron emission tomography study. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2007 Aug;78(8):825-31.
- [46] Habeck JO, Huckstorf C, Moritz V. A comparison of carotid body volumes in normotensive Wistar rats (NWR), Wistar Kyoto rats (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR). *Biomedica biochimica acta*. 1987;46(12):907-10.
- [47] Murphy MB, Murray C, Shorten GD. Fenoldopam: a selective peripheral dopamine-receptor agonist for the treatment of severe hypertension. *The New England Journal of Medicine*. 2001 Nov 22; 345(21):1548-57.
- [48] Sanchez-Quintana D, Garcia-Martinez V, Macias D, Hurle JM. Structural arrangement of the extracellular matrix network during myocardial development in the chick embryo heart. *Anatomy and embryology*. 1991;184(5):451-60.
- [49] Bleiberg I, Ricciardone MD, Reddi HA, McCarthy KF. New bone formation and bone marrow differentiation induced in rats by extracellular bone matrix implantation: effect of local preirradiation on the process. *Experimental hematology*. 1987 May;15(4):309-15.
- [50] Humphries MJ, Reynolds A. Cell-to-cell contact and extracellular matrix. *Current opinion in cell biology*. 2009 Oct;21(5):613-5.
- [51] Evangelisti R, Bodo M, Caruso A, Becchetti E, Carinci P. Extracellular glycosaminoglycans (GAG) released by chick embryonic fibroblasts. A possible involvement of surface receptors. *Cell and tissue research*. 1984;238(2):241-5.

- [52] Boudreau N, Rabinovitch M. Developmentally regulated changes in extracellular matrix in endothelial and smooth muscle cells in the ductus arteriosus may be related to intimal proliferation. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1991 Feb;64(2):187-99.
- [53] Reynertson RH, Parmley RT, Roden L, Oparil S. Proteoglycans and hypertension. I. A biochemical and ultrastructural study of aorta glycosaminoglycans in spontaneously hypertensive rats. *Collagen and related research*. 1986 Mar;6(1):77-101.
- [54] Dell'Orbo C, De Luca G, Gioglio L, Quacci D, Soldi C. The role of proteoglycans in maintaining collagen fibril morphology. *Histology and histopathology*. 1995 Jul;10(3):583-8.
- [55] Senoo H, Hata R. Extracellular matrix regulates cell morphology, proliferation, and tissue formation. *Kaibogaku zasshi*. 1994 Dec;69(6):719-33.
- [56] Montes GS. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell biology international*. 1996 Jan;20(1):15-27.
- [57] Constantine VS, Hartley MW. Collagen and elastic fibers in normal dermis and severe actinic (senile) elastosis. A light and electron microscopic study. *The Alabama journal of medical sciences*. 1966 Jul;3(3):329-42.
- [58] Postacchini F, De Martino C. Regeneration of rabbit calcaneal tendon maturation of collagen and elastic fibers following partial tenotomy. *Connective tissue research*. 1980;8(1):41-7
- [59] Ehrlich HP, Lambert PA, Siggers GC, Myers RL, Hauck RM. Dynamic changes appearing in collagen fibers during intrinsic tendon repair. *Annals of plastic surgery*. 2005 Feb;54(2):201-6.
- [60] Cotta-Pereira G, Rodrigo FG, David-Ferreira JF. The elastic system fibers. *Advances in experimental medicine and biology*. 1977;79:19-30.
- [61] Moraes-Teixeira Jde A, Felix A, Fernandes-Santos C, Moura AS, Mandarim-de-Lacerda CA, de Carvalho JJ. Exercise training enhances elastin, fibrillin and nitric oxide in the aorta wall of spontaneously hypertensive rats. *Experimental and molecular pathology*. Dec;89(3):351-7.
- [62] Cotta-Pereira G, Guerra Rodrigo F, Bittencourt-Sampaio S. Oxytalan, elaunin, and elastic fibers in the human skin. *The Journal of investigative dermatology*. 1976 Mar;66(3):143-8.
- [63] de Carvalho JJ, Apfel MI, Cotta Pereira G, Panico MD, Mattos da Silveira PR, de Medeiros A. [Histochemical study of elastic system fibers of the walls of normal and pathological saphenous veins]. *Phlebologie*. 1991 Jul-Oct;44(3):733-44.
- [64] Junqueira LC, Montes GS, Toledo OM, Bexiga SR, Gordilho MA, Brentani RR. Evidence for collagen molecular orientation in basement membranes. *The Histochemical journal*. 1983 Aug;15(8):785-94.
- [65] Junqueira LC, Cossermelli W, Brentani R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Archivum histologicum Japonicum*. 1978 Jun;41(3):267-74.
- [66] Whiteman P. The quantitative measurement of Alcian Blue-glycosaminoglycan complexes. *The Biochemical journal*. 1973 Feb;131(2):343-50.
- [67] Dhillon DP, Barer GR, Walsh M. The enlarged carotid body of the chronically hypoxic and chronically hypoxic and hypercapnic rat: a morphometric analysis. *Quarterly journal of experimental physiology (Cambridge, England)*. 1984 Apr;69(2):301-17.
- [68] Clarke JA, Daly MB, Marshall JM, Ead HW, Hennessy EM. Quantitative studies of the vasculature of the carotid body in the chronically hypoxic rat. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica* [et al. 2000 Mar;33(3):331-40.

- [69] Lopez-Barneo J, Ortega-Saenz P, Pardal R, Pascual A, Piruat JI. Carotid body oxygen sensing. *Eur Respir J*. 2008 Nov;32(5):1386-98.
- [70] Fletcher EC, Miller J, Schaaf JW, Fletcher JG. Urinary catecholamines before and after tracheostomy in patients with obstructive sleep apnea and hypertension. *Sleep*. 1987 Feb;10(1):35-44.
- [71] Smith ML, Pacchia CF. Sleep apnoea and hypertension: role of chemoreflexes in humans. *Experimental physiology*. 2007 Jan;92(1):45-50.
- [72] Iturriaga R, Alcayaga J, Rey S. Sodium nitroprusside blocks the cat carotid chemosensory inhibition induced by dopamine, but not that by hyperoxia. *Brain research*. 1998 Jul 13;799(1):26-34.
- [73] Prabhakar NR, Overholt JL. Cellular mechanisms of oxygen sensing at the carotid body: heme proteins and ion channels. *Respiration physiology*. 2000 Sep;122(2-3):209-21.
- [74] Chiochio SR, Biscardi AM, Tramezzani JH. Catecholamines in the carotid body of the cat. *Nature*. 1966 Nov 19;212(5064):834-5.
- [75] Fidone S, Gonzalez C. Catecholamine synthesis in rabbit carotid body in vitro. *The Journal of physiology*. 1982 Dec;333:69-79.
- [76] McGregor KH, Gil J, Lahiri S. A morphometric study of the carotid body in chronically hypoxic rats. *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology*. 1984 Nov;57(5):1430-8.
- [77] Hallberg D, Pernow B. Effect of substance P on various vascular beds in the dog. *Acta physiologica Scandinavica*. 1975 Feb;93(2):277-85.
- [78] Kusakabe T, Hayashida Y, Matsuda H, Gono Y, Powell FL, Ellisman MH, et al. Hypoxic adaptation of the peptidergic innervation in the rat carotid body. *Brain research*. 1998 Sep 28;806(2):165-74.
- [79] Kusakabe T, Hirakawa H, Matsuda H, Kawakami T, Takenaka T, Hayashida Y. Peptidergic innervation in the rat carotid body after 2, 4, and 8 weeks of hypocapnic hypoxic exposure. *Histology and histopathology*. 2003 Apr;18(2):409-18.
- [80] Kameda Y. Immunoelectron microscopic localization of vimentin in sustentacular cells of the carotid body and the adrenal medulla of guinea pigs. *J Histochem Cytochem*. 1996 Dec;44(12):1439-49.
- [81] Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocrine reviews*. 1992 Feb;13(1):18-32
- [82] Prabhakar NR, Peng YJ, Kumar GK, Nanduri J, Di Giulio C, Lahiri S. Long-term regulation of carotid body function: acclimatization and adaptation--invited article. *Advances in experimental medicine and biology*. 2009;648:307-17.
- [83] Wang ZZ, Bredt DS, Fidone SJ, Stensaas LJ. Neurons synthesizing nitric oxide innervate the mammalian carotid body. *The Journal of comparative neurology*. 1993 Oct 15;336(3):419-32.
- [84] Prabhakar NR, Kumar GK, Chang CH, Agani FH, Haxhiu MA. Nitric oxide in the sensory function of the carotid body. *Brain research*. 1993 Oct 15;625(1):16-22.

ANEXO A– Protocolo coloração Hematoxilina e Eosina – rotina

1. Desparafinar
2. Hidratar até água destilada
3. Hematoxilina
4. Água corrente
5. Eosina
6. Água destilada
7. Desidratar
8. Clarificar
9. Montar lâmina

ANEXO B- Protocolo de coloração: Resorcina fucsina de Weigert com oxidação (monopersulfato de potássio).

1. Desparafinar;
2. Hidratar até água destilada;
3. Monopersulfato de potássio 10 % (1 hora a 37°);
4. Lavar em água destilada;
5. Desidratar até álcool 90%;
6. Resorcina fucsina de Weigert (20 minutos);
7. Diferenciar em álcool 90%;
8. Diferenciar em álcool 70%;
9. Lavar em água destilada;
10. Orange G (10 segundos);
11. Água destilada;
12. Desidratar;
13. Clarificar;
14. Montar lâmina.

ANEXO C - Protocolo de coloração: *Picro Sirius Red*

1. Desparafinar;
2. Desidratar;
3. Permanganato de potássio (2 minutos);
4. Ácido oxálico 1% (1 minuto);
5. Lavar em água destilada;
6. Álcool 70%;
7. Resorcina fucsina de Weigert (45 minutos);
8. Água destilada (10 minutos);
9. Diferenciar em álcool-ácido;
10. Água destilada (10 minutos);
11. Picro-sirius red (1 hora);
12. Lavar em água destilada
13. Desidratar;
14. Clarificar;
15. Montar a lâmina.

ANEXO D – Proctocolo de coloração: Ancian Blue

1. Desparafinar
2. Hidratar
3. Corar com Alcian BBlue pelo respectivo pH
4. Lavar com solução tampão no respectivo pH
5. Lavar co água corrente
6. Lavar com água destilada
7. Corar com Safranina O
8. Desidratar
9. Clarificar
10. Montar a lâmina.

Tampão pH 2,5:

30mL de HCL 1N + 13,8g de fosfato de sódio monobásico em 1L de água destilada

Alcian Blue pH 2,5:

1g de Alcian Blue em 100mL de ácido acético 3% (100mL)

(acido clorídrico 0,1N: 8,35mL de HCL +91,65mL de água desilada.

ANEXO E- Protocolo indução de fluorescência por formaldeído

1. Desparafinar;
2. Encubar em Xilol puro (2 horas);
3. Montar Lamina

ANEXO F – Processamento Microscopia eletrônica

Fixação Glutaraldeído (2,5%)

1. Tampão Cacodilato 0,1Molar
2. Pós-fixação com tetróxido de ósmio
3. Lavagem tampão cacodilato 0,1M
4. Desidratação com acetona

30%

50%

70%

90%

100%

100%

5. Infiltração

Acetona: Epon

2 : 1

1 : 1

1 : 2

6. Inclusão em resina Epoxi.

ANEXO G- Aprovação do Comitê de ética e pesquisa para cuidado e uso de animais experimentais, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **CEA/257/2008** sobre **"Remodelamento das artérias carótidas em modelos de hipertensão genética de rato: possível correlação morfofuncional com o corpo carotídeo"**, sob a responsabilidade de **Jorge José de Carvalho**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em **17/12/2008**. Este certificado expira em **17/12/2012**.

Rio de Janeiro, 17 de Dezembro de 2008.

Prof. Israel Felzenszwalb

CEA/IBRAG/UERJ
Israel Felzenszwalb
Diretor
IBRAG - UERJ
Mat. 2887-8

Profa. Patricia Cristina Lisboa

CEA/IBRAG/UERJ

Profª Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva
Profª Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ
Matrícula 34765-8

/ass