



Universidade Federal de Pernambuco

Centro de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde

PEDRO PEREIRA TENÓRIO

**AVALIAÇÃO HISTOTECNOLÓGICA E MOLECULAR DE LESÕES
ANEURISMÁTICAS E ATEROMATOSAS DA AORTA EM HUMANOS**

Recife-PE

2017

PEDRO PEREIRA TENÓRIO

**AVALIAÇÃO HISTOTECNOLÓGICA E MOLECULAR DE LESÕES
ANEURISMÁTICAS E ATEROMATOSAS DA AORTA EM HUMANOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Área de Concentração Alterações Fisio-Morfológicas do Sistema Vascular, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biologia Aplicada à Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo-Júnior

Recife – PE

2017

Tenório, Pedro Pereira

Avaliação histotecnológica e molecular de lesões aneurismáticas e ateromatosas da aorta em humanos / Pedro Pereira Tenório. – Recife, 2017.

66 f.: il.

Orientador: Mario Ribeiro de Melo-Júnior

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia aplicada à saúde, 2017.

Inclui referências e apêndices

1. Aneurismas dissecante da aorta 2. I. Melo-Júnior, Mário Ribeiro de (orient.) II. Título.

616.133

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-390

**AVALIAÇÃO HISTOTECNOLÓGICA E MOLECULAR DE LESÕES
ANEURISMÁTICAS E ATEROMATOSAS DA AORTA EM HUMANOS**

Aprovada em: 02/06/17

COMISSÃO EXAMINADORA

PRESIDENTE: Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo-Júnior

Departamento de Patologia, CCS-UFPE

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA

Assinatura: _____

EXAMINADOR EXTERNO: Profa. Dra. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

Departamento de Anatomia, CCS-UFPE

Assinatura: _____

EXAMINADOR EXTERNO: Profa. Dra. Adriana Maria da Silva Telles

Departamento de Patologia, CCS-UFPE

Assinatura: _____

EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

Departamento de Patologia, CCS-UFPE

Assinatura: _____

EXAMINADOR EXTERNO: Profa. Dra. Adrya Lúcia Peres Bezerra de Medeiros

Centro Universitário Tabosa de Almeida, ASCES-UNITA

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Manoel Tenório da Silva** e **Josefa Pereira Tenório**, *In Memoriam*, pelo amor, carinho, dedicação e empenho que me deram durante toda a minha vida, sem vocês não teria chegado a mais esta vitória tão idealizada, lutada e por vezes definida como abstrata e ao meu amor, minha esposa, companheira e amiga de todos os momentos, **Andréa Kedima Diniz Cavalcanti Tenório**.

AGRADECIMENTOS

Ao grande Mestre Professor Dr. Mário Ribeiro de Melo-Júnior por todo incentivo, acreditação e brilhante orientação concedida durante esta minha caminhada.

À professora Msc. Lenieé Campos Maia, pela idéia precursora sobre aneurismas e por todo apoio, dedicação e paciência externadas durante minha trajetória acadêmica.

A Mônica Modesto Araújo, pelo seu auxílio e esforço ímpares em diversas etapas deste trabalho, sobretudo, durante a coleta, arquivamento e processamento de nosso material.

A Marina Falcão de Souza Cartaxo, pelo auxílio incondicional nas preparações histológicas.

A Silvânia Tavares Paz e Francisco Paes, pela confecção de diversas lâminas no laboratório de Histotecnologia, do Mestrado em Patologia.

Ao Prof. Dr. Marcelo Henrique Santos Paiva, pelo auxílio na execução da análise molecular deste manuscrito.

RESUMO

Introdução: O aneurisma dissecante de aorta e o processo ateromatoso são entidades patológicas comumente associadas a morbidade e mortalidade significativas. **Objetivo:** Avaliar os principais aspectos epidemiológicos, histotecnológicos, moleculares e ultraestruturais em aortas acometidas pelo aneurismático e aterosclerótico de cadáveres em um serviço de verificação de óbito (SVO) em Pernambuco, Brasil. **Metodologia:** Ao todo foram obtidas (n=30) peças anatômicas da aorta torácica e abdominal de cadáveres com até 24 horas de morte com faixa etária entre 55 a 96 anos com quadro de aneurisma dissecante e processo ateromatoso (n=15) e amostras de aorta sem alterações anatômicas (n=15) para fins de comparação. **Resultados:** Das (n=15) aortas acometidas pelo aneurisma dissecante, 60% (9/15) pertenciam ao gênero masculino, contra 40% (6/15) do gênero feminino. Prevalenceram (n=13) casos de tabagismo, correspondendo a 86,66%, 11 casos, 73,33%, de hipertensão arterial sistêmica (HAS), (n=8) de etilismo 53,33%, (n=4) de cardiopatia representando 26,66% e (n=1) de diabetes 6,66%. Em relação aos dados epidemiológicos a média etária geral foi de 74,2 anos, tendo uma prevalência maior de homens (60%) quando comparado às mulheres (40%). Através da análise histopatológica 86,66% dos casos pôde-se constatar destruição das fibras colágenas e elásticas além de depósitos gordurosos e presença de células espumosas, uma nítida rasgadura do vaso com a presença da falsa luz e infiltração de sangue. A partir dos dados morfométricos, comparando-se as fibras colágenas e elásticas, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes nos grupos estudados, embora a quantidade média de fibras colágenas do grupo de aneurisma tenha sido menor, quando comparado com o grupo controle, com uma média e desvio padrão respectivamente de $110331,8 \pm 7254$, $156592,1 \pm 8534$ pixels. As fibras elásticas apresentaram uma quantidade maior, quando comparado com o controle, sendo respectivamente $119164,9 \pm 7365$ e $92251,6 \pm 3014$. Quanto à análise molecular, o resultado final demonstrou a ausência de mutações entre as sequências obtidas acerca do gen *FBN1* das amostras. Além disso, a comparação entre a sequência referência e a do presente estudo, também evidenciou o monomorfismo deste fragmento. Quanto ao estudo ultraestrutural, evidenciamos que na aorta normal há disposição uniforme das fibras colágenas e elásticas, enquanto que, no aneurisma dissecante ocorreram ruptura e perda do colágeno e a elastina. **Conclusão:** Os processos aneurismáticos e ateromatosos prevaleceram em homens, com considerável fragilidade das fibras de colágeno e elastina no grupo aneurismático. Nenhum polimorfismo foi detectado em nossas amostras.

Palavras-chave: Aorta. Aneurisma dissecante. Histopatologia.

ABSTRACT

Introduction: Aortic dissecting aneurysm and the atheromatous process are common pathological entities associated with significant morbidity and mortality. **Objective:** To evaluate the main epidemiological, histotechnological, molecular and ultrastructural aspects in aortas affected by the aneurysmal and atherosclerotic of cadavers in a service of death verification (SVO) in Pernambuco, Brazil. **METHODS:** Anatomical parts of the thoracic and abdominal aorta of up to 24 hours of death were obtained (n = 30) with age between 55 and 96 years old with dissecting aneurysm and atheromatous process (n = 15) and samples of Aorta semaro anatomical (n = 15) for the comparison fins. **RESULTS:** Aortic dissecting aortic aneurysms (n = 15) accounted for 60% (9/15) of the male gender, compared with 40% (6/15) of the female gender. Prevalence (n = 13) of smoking, corresponding to 86.66%, 11 cases, 73.33%, systemic arterial hypertension (SAH), (n = 8) alcoholism 53.33%, (n = 4) De Cardiopathy representing 26.66% and (n = 1) of diabetes 6.66%. Regarding epidemiological data, the overall age group was 74.2 years, with a higher prevalence of men (60%) when compared to women (40%). Through the histopathological analysis, 86.66% of the cases of collagen and elastic fibers were found to be destroyed, as well as fatty deposits and the presence of foam cells, a clear tear of the vessel with a presence of false light and blood infiltration. From the morphometric data, comparing as collagen and elastic fibers, were not found in the statistically significant in the studied groups, although the average amount of collagen fibers of the aneurysm group was lower, when compared to the control group, with a mean And standard deviation respectively of 110331.8 ± 7254 , 156592.1 ± 8534 pixels. The elastic fibers presented a higher amount when compared to the control, being 119164.9 ± 7365 and 92251.6 ± 3014 respectively. As for the molecular analysis, the final result demonstrates an absence of mutations between as sequences obtained on the FBN1 gene of Samples. In addition, there is evidence of the monomorphism of this fragment. Regarding the ultrastructural study, we showed that in the normal aorta there is a uniform of collagen and elastic fibers, whereas, no dissecting aneurysm, occlusion and loss of collagen and elastin. **Conclusion:** The aneurysm and atheromatous processes prevailed in men, with considerable fragility of the collagen and elastin fibers in the aneurysm group. No polymorphism was detected in the samples.

Key-words: Aorta. Dissecting aneurysm. Histopathology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1- Corte transversal demonstrando a uniformidade e organização do colágeno na túnica média da artéria aorta (100x)	18
FIGURA 2- Dilatação da artéria da aorta.....	19
FIGURA 3- Aneurisma dissecante da aorta: formação do falso lúmen	20
FIGURA 4- Fragmentação das fibras elásticas a nível da túnica média na coloração de Orceína (100x).....	21
FIGURA 5- Corte histológico do fragmento da camada adventícia da aorta na coloração de Giemsa (3200x).....	24
FIGURA 6- Arranjo dos domínios das diferentes metaloproteinases em humanos.....	25

ARTIGO

FIGURA 1- Histological aspects of aortic dissecting aneurysm cases. A. Presence of blood collection in H.E staining in 4x; B. Presence of blood collection in Masson's Trichrome staining in 4x; C. False lumen formation in H.E staining in 4x; D. Formation of the false lumen in 4x Masson Trichrome staining; E. False lumen formation and blood collection in H.E stain in 4x; F. Formation of false lumen and blood collection in 4x Masson Trichrome staining	38
FIGURA 2- Arrow indicating the disorganizations and irregularity of the elastic fibers in aneurysmal aorta of corpses in Orcein staining (Orcein 100x).....	39
FIGURA 3- Arrow indicating the histologic aspect of the aorta artery affected by an atheromatous plaque. Stain of (Picro-sírius 100x)	39
FIGURA 4- Ultrastructural analysis of normal and aneurysmal aortas. In A and B: it is observed the arrangement of the layers of the aortic wall with the uniform provision of collagen and elastic fibers. In dissecting aneurysm there is rupture and loss of uniformity of fibers resulting in fragility of the vascular wall (C and D)	40

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Epidemiological profile regarding sex, age and co-morbidities of corpses affected by dissecting aneurysm.....	41
TABELA 2- Average distribution of collagen and elastic fibers in aneurysmal aortas of corpses*	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAA	-Aneurisma de Aorta Abdominal
ABI	-Biosistema Aplicado
AIDS	-Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BLAST	-Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local
BPS	-Tampão Fosfato Salino
CO ₂	-Dióxido de carbon
DNA	-Ácido Desoxirribonucléico
DNTP	-Desoxirribonucleotídeos
EUA	-Estados Unidos da América
FBN1	-Gene codificante da proteína Fibrilina 1
FTA-ABS	-Teste de Absorção de Anticorpos Treponêmicos Fluorescentes
GA	-Glutaraldeído
GIMP	-Programa de Manipulação de Imagens Gerais
HAS	-Hipertensão Arterial Sistêmica
HE	-Hematoxilina- Eosina
LCR	-Líquor Cefalorraquidiano
LUES	-Sífilis
MEC	-Matriz Extracelular
MEV	-Microscopia Eletrônica de Varredura
MFS	-Síndrome de Marfan
MgCl ₂	-Cloreto de Magnésio
MMP	-Metaloproteinases
OsO ₄	-Tetróxido de ósmio
PAS	-Ácido Periódico de Schiff
PCR	-Reação em Cadeia da Polimerase
PFA	-Paraformaldeído
ProMMP	-Pró-Metaloproteinases
SVO	-Serviço de Verificação de Óbitos
TAAD	-Aneurisma de Aorta Torácica
TBS	-Tampão Fosfato Salino
TGF-beta	-Fator de transformação do crescimento beta
TGFBR 1	-Receptor do fator de crescimento transformador 1
TGFBR 2	-Receptor do fator de crescimento transformador 2
TIMPs	-Inibidores Teciduais das Metaloproteinases
TNF-alfa	-Fator de Necrose Tumoral Alfa
t-PA	-Ativador de Plasminogênio do Tipo Tecidual
u-PA	-Ativador de Plasminogênio do Tipo Uroquinase
u-PAR	-Receptor do Ativador de Plasminogênio do Tipo Uroquinase
VDRL	-Pesquisa Laboratorial de Doença Venérea

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 PROBLEMATIZAÇÃO	13
1.2 OBJETIVOS.....	13
1.2.1 Objetivo Geral.....	13
1.2.2 Objetivos Específicos.....	13
1.3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	14
2 A AORTA HUMANA	17
2.1 DOENÇAS DA AORTA.....	18
2.1.1 Aneurismas da Aorta.....	18
2.1.2 Aneurisma Dissecante da Aorta	20
2.1.3 Doença Aterosclerótica.....	22
3 ANÁLISES MOLECULARES.....	26
4 FERRAMENTAS HISTOTECNOLÓGICAS	27
5 REFERÊNCIAS.....	28
6 RESULTADOS	34
6.1 ARTIGO Histotechnological and socio-epidemiological evaluation of aorta aneurysmal and atheromatous lesions of in humans.....	34
7 CONCLUSÕES.....	46
APÊNDICE A Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	47
APÊNDICE B Carta do Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	49
APÊNDICE C Artigo Publicado na Revista Paraense de Medicina.....	50
APÊNDICE D Artigo Aceito pela Revista de Ciências Médicas e Biológicas da UFBA.....	57

1 INTRODUÇÃO

A aorta, maior e principal artéria, recebe o sangue ejetado do ventrículo esquerdo, distribuindo para todo o organismo. Sua parede é constituída de três elementos principais: a camada íntima, em contato direto com o sangue, a média formada por camadas circulares, dispostas de forma concêntrica, de fibras elásticas e musculares e que chega a representar 80% da espessura total do vaso e a adventícia, camada mais externa, constituída de tecido conjuntivo e fibras elásticas (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2013). Diversos processos patológicos podem comprometer a integridade natural da artéria aorta (BORGES, 2006).

A artéria aorta também pode ser acometida por estrias lipídicas que podem evoluir a longo prazo, para placas ateroscleróticas originando a doença aterosclerótica (GARDNER *et al.*, 1999). Neste processo, diversas células inflamatórias, a exemplo dos mastócitos, vão estar envolvidas na patogênese da ruptura das placas através do enfraquecimento da placa fibrótica devido à alta atividade das enzimas produzidas que degradam a matriz extracelular, induzindo a laceração (NAPOLI *et al.*, 1997). Os mastócitos desta forma representam o componente inflamatório mais importante na aterosclerose sendo encontrados tanto em lesões discretas quanto as mais avançadas (HANSSON *et al.*, 2005).

Dentre as lesões frequentemente encontradas na aorta humana, os aneurismas são entidades patológicas de destaque, pois estão comumente associados à importante taxa de morbi-mortalidade, principalmente nas últimas décadas. Os aneurismas são dilatações circunscritas das artérias ou das câmaras cardíacas caracterizadas por progressiva dilatação focal da parede do vaso, envolvendo as três camadas: média, íntima e adventícia, podendo evoluir para uma ruptura ou dissecção (LUO *et al.*, 2016; VIRMANI e BURKE, 2001). É considerado aneurisma quando o diâmetro é superior a 3 cm, ou 1,5 vezes o seu diâmetro original do vaso (JACOB *et al.*, 2015). Tem sido demonstrado que, de acordo com a lei de Laplace, o aumento do diâmetro do aneurisma aumenta a superfície na parede da aorta, produzindo uma expansão da lesão levando a um rompimento (RODELLA *et al.*, 2016).

O aneurisma dissecante aórtico é caracterizado pelo desenvolvimento súbito e agudo de uma laceração na camada íntima que expõe diretamente a camada média do vaso. O sangue penetra na camada média separando-a longitudinalmente, desta forma, dissecando a sua parede. O espaço preenchido por sangue entre as camadas dissecadas da parede da aorta forma o falso lúmen (BRAUNWALD *et al.*, 2003). A dissecção da aorta pode então ser entendida como a delaminação das suas paredes que percorre um espaço virtual entre a adventícia e a íntima, sendo considerada como uma situação rara, de emergência em

cirurgia cardíaca e potencialmente fatal, devido ao alto risco de ruptura (BOOHER *et al.*, 2013; ISSELBACHER *et al.*, 2016; KNOBEL, 2006; PRIYANK *et al.*, 2016).

1.1 PROBLEMATIZAÇÃO

Nos últimos anos tem-se intensificado o estudo do processo ateromatoso, dos aneurismas e dissecções aórticas. A importância de elucidar os principais fatores contributivos que desencadeiam estas afecções, diminuem seus efeitos, por vezes, deletérios. É cada vez mais freqüente a identificação de aneurismas e dissecções aórticas em avaliações necroscópicas realizadas no Serviço de Verificação de Óbitos (SVO) da Secretaria de Saúde (SES), localizada na UFPE. Fato este que tem chamado a atenção por se tratar de uma lesão importante que inicialmente não é descrita na literatura como doença de base para *causa mortis*, embora se trate devido a sua magnitude e consequências orgânicas como fator desencadeante do óbito (COMUNICAÇÃO PESSOAL, MAIA, 2011).

Logo, diante do exposto, o presente estudo se propôs analisar os principais achados histomorfométricos, epidemiológicos, ultraestruturais e moleculares de aortas acometidas pelo aneurisma dissecante e aterosclerose em artérias aortas humanas, correlacionando com o diagnóstico anatomopatológico obtido através da necropsia.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Realizar uma análise epidemiológica, histomorfométrica, ultraestrutural e molecular de aortas acometidas pelo aneurisma dissecante e aterosclerose, oriundas do Serviço de Verificação de Óbitos (SVO) da Secretaria de Saúde (SES), em Pernambuco, Brasil.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Obter dados epidemiológicos de fatores como gênero, faixa etária, fumo e outras doenças correlatas;
- Realizar análise histomorfométrica a fim de descrever as principais lesões e alterações estruturais na aorta;

- Realizar análise ultraestrutural em aortas acometidas pelo processo ateromatoso e o aneurisma dissecante;
- Estudar um segmento do gen *FBN1* e *TGFBR2* em aortas acometidas pelo processo ateromatoso e o aneurisma dissecante.

1.3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Local do Experimento e Aspectos Éticos

Todas as amostras de tecido apenas foram obtidas após a anuência do responsável-legal pelo cadáver através da assinatura do Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Foram necropsiados cadáveres oriundos do Serviço de Verificação de Óbitos (SVO), órgão da Secretaria de Saúde (SES) do Estado de Pernambuco, localizado no departamento de Patologia na Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, durante o ano de 2014. A referida pesquisa possui aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do CCS-UFPE, sob ofício nº 133/2010- CEP/CCS.

Processamento das Aortas

As peças anatômicas foram embebidas em formalina tamponada a 10%, num volume final com aproximadamente 20 vezes o volume do material até o momento do processamento histológico em um período não inferior a 72 horas de fixação. De forma paralela, o grau da aterosclerose na macroscopia foi avaliada de acordo com classificação em discreta, moderada ou acentuada. As aortas foram medidas com o auxílio de uma escala padronizada de 0,0 à 12,0 cm, sendo considerada discreta de 0,1 a 4,0 cm, moderada de 4,1 a 7,0 cm e acentuada de 7,1 à 12,0 cm. A extensão das placas ateromatosas serviram de referência para pontuar o grau de acometimento das aortas estudadas (FERRAZ, 2008).

Análise Histopatológica

A análise histopatológica dos tecidos corados foi realizada selecionando-se 10 campos em cada lâmina, onde foi avaliado o perfil inflamatório, pontos focais de necrose, hemorragia, tentativa de reparo, através dos padrões característicos de marcação de cada corante que foi utilizado no procedimento. O registro de imagens foi realizado através de um sistema de captação com uma câmera filmadora conectada a um microcomputador e por sua vez a um microscópio ótico.

Através do programa de captura de imagens *Motic image Plus 2.0*, foi feita uma seleção preliminar e o armazenamento das áreas de interesse em que posteriormente foram avaliadas morfometricamente no software *GIMP 2.0*, através do qual foi obtida valores em pixels para cada tipo de fibra protéica investigada. Estes valores foram utilizados no estudo estatístico (*teste t* pareado) entre os grupos avaliados.

Estudo Histoquímico

Para esta análise, foram obtidos quinze (n= 15) fragmentos de aneurisma dissecante e aterosclerose. Quinze (n=15) amostras aórticas sem alterações anatômicas foram obtidas para fins de controle negativo. Após a correta fixação do tecido em formalina a 10%, foram obtidas secções histológicas (4 µm) através do micrótomo horizontal Yamato (Japão) e depois montadas em lâminas histológicas previamente identificadas. Estas lâminas foram submetidas a baterias de coloração com hematoxilina-eosina (HE) para análise histopatológica do tecido aórtico, Orcein e Picro-sirius para análise elástica e de fibras de colágeno, respectivamente.

Análise Ultraestrutural por Microscopia Eletrônica de Varredura

Para esta análise, foram obtidos fragmentos de artéria aorta sem alterações e com aneurisma dissecante, fixadas em glutaraldeído (GA) 2,5% + Paraformaldeído (PFA) 4% + tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,4, em 2 horas ou overnight à 4° C, a amostra foi então lavada com o mesmo tampão 3 vezes por 10 minutos cada. As amostras foram pós fixadas em (OsO₄) 2% + cloreto de cálcio 5mM e ferricianeto de potássio 0,8% em Tampão Cacodilato por 1 hora em câmara escura. Após este processo as amostras foram lavadas com água destilada 1 vez por 10 minutos, transferida a amostra para cesta permeável, a ser usada no aparelho de ponto crítico.

As amostras foram desidratadas em série crescente de acetona 30%, 50%, 70%, 90%, 15 minutos cada e 100% três vezes, 20 minutos cada. As amostras foram transferidas para o aparelho de ponto crítico, onde foram feitas várias substituições com dióxido de carbono (CO₂). Após esta fase foi realizado a secagem usando o método do ponto crítico, foi feita a remoção da peça seca e montada em Stub (suportes do microscópio). Nesta fase foi realizada a cobertura de ouro, sendo então a amostra observada em microscópio eletrônico de varredura.

Análise Molecular

Todas as amostras obtidas imediatamente após o óbito foram seccionadas em cerca de 1 cm, com bisturi estéril e foram acondicionadas em deep freezer a -80° C antes da realização do procedimento. Dentre os 65 exons que constituem o gene *FBN1* (N_M000138.4), o exon 2 foi selecionado para análise molecular, enquanto que o exon 1 (dos 7 presentes no gene) foi selecionado para o estudo do gene *TGFBR2* (WANG *et al.*, 2012). As extrações de DNA foram realizadas individualmente em 33 amostras, descritas acima, utilizando o kit de extração DNeasy_Blood_&_Tissue_kit (Qiagen[®]), seguindo protocolo descrito pelo fabricante.

Cada reação de PCR continha 200 µM de cada dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 10 pmol de cada primer, 1 U de Taq Polimerase (Invitrogen[®]) e cerca de 20 ng do DNA molde. As reações foram conduzidas em termociclador T3 ProfessionalR (Biometra[®]), programado da seguinte forma: um ciclo de 94° C por 5 min; 35 ciclos de 94° C por 45s, 60° C por 45s, 72° C por 2s; e um ciclo final a 72° C por 10 min. Os produtos amplificados foram separados e identificados por eletroforese em gel de agarose 1%, corados com brometo de etídio e fotografado em um transiluminador de ultravioleta. Após a extração, cada DNA foi quantificado em espectrofotômetro Nano_drop2000c (Thermo_Scientific[®]) e posteriormente acondicionadas a -20° C.

Os produtos de PCR foram submetidos à purificação, através do kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification[®] kit (Amersham Pharmacia Biotech[®]) e posteriormente quantificados em Nanodrop_2000c (Thermo Scientific[®]). Estes produtos purificados foram submetidos à reação de seqüenciamento em sequenciador capilar ABI 3100 (AppliedBiosystems[®]) em ambos os sentidos da fita. As sequências obtidas foram editadas, analisadas e alinhadas através do programa CodonCode_Aligner (v 3.7.1).

A identidade de cada uma das sequências foi verificada através da ferramenta BLAST, que permite comparar a sequência em estudo com outras depositadas no banco de dados do NCBI (National Centers for Biotechnology Information).

Análise estatística

Aspectos Epidemiológicos e Clínicos - As informações relativas ao sexo, idade, partes anatômicas da aorta e doenças relacionadas foram obtidas através da análise dos prontuários dos cadáveres. As análises estatísticas foram realizadas com o SPSS versão 13.0 e o software Epi-Info versão 7.0. Para a avaliação das diferenças entre médias, nas áreas de colágeno e elastina, foi utilizado o teste t-Student para dados inigualáveis. O nível de significância na decisão dos testes estatísticos foi de 5,0%.

Análise histotecnológica - A quantificação da fibra protéica (em pixels) na parede para cada tipo de lesão da aorta foi determinada com o Software GIMP 2.0. Os dados do estudo morfométrico digital foram analisados pelo teste t de Student pareado com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) por meio do software GraphPad PRISM® 5.0.

Análise Molecular - O software OriginPro8 (EUA) foi utilizado para a análise estatística e os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Variáveis quantitativas contínuas relacionadas à sequência do gene *FBN1* e *TGFBR2* foram testadas quanto ao caráter de normalidade usando o teste de Kolmogorov-Smirnov. As análises comparativas foram realizadas utilizando-se o teste estatístico paramétrico de Tukey ($p < 0,05$) através de SigmaPlot (EUA).

2 A AORTA HUMANA

O Sistema Cardiovascular tem como função principal transportar, através da corrente sangüínea, substâncias metabólicas até as células, nutrindo-as. O sangue, impulsionado pelo coração, chega até o nível celular através de uma complexa rede formada por: artérias, arteríolas, veias, vênulas e capilares (VEINOT *et al.*, 2001). Dentre estes vasos a artéria aorta é consagrada como a maior e principal do organismo, recebendo todo o sangue ejetado do ventrículo esquerdo, distribuindo para todo o organismo, com exceção dos dois pulmões (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2013).

A artéria aorta é classificada como do tipo elástica, por conter grande quantidade de fibras elásticas, além de células musculares lisas que juntamente com a matriz extracelular (MEC) são as responsáveis pela integridade do vaso, permitindo que durante a sua distensão, devido à alta pressão com que o sangue sai do coração, ela possa retornar à sua posição inicial de relaxamento, sem sofrer danos em sua estrutura (ROBERTS *et al.*, 1995; RAINES, 2000; VEINOT *et al.*, 2001). A aorta é constituída de três elementos principais: a íntima em contato direto com o sangue, a camada média formada por camadas circulares, dispostas de forma concêntrica, de fibras elásticas e musculares e que chega a representar 80% da espessura total do vaso e a adventícia, camada mais externa, constituída de tecido conjuntivo e fibras elásticas (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013) (Figura 1).

Figura 1. Seta mostrando um corte transversal demonstrando a uniformidade e organização do colágeno na túnica média da artéria aorta. (Coloração de Picro-sírius, Magnificação 100x)



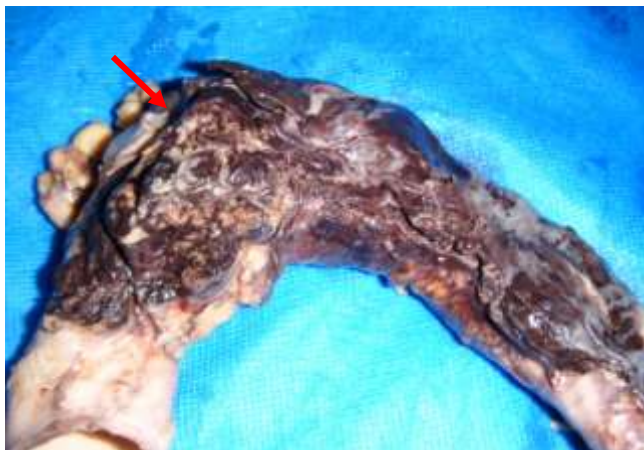
A túnica média da aorta é constituída por camadas paralelas de lâminas elásticas, em meio às quais situam-se células musculares lisas além de colágeno e proteoglicanos (DINGEMANS *et al.*, 2000). É justamente a camada média da aorta em que diversos processos lesivos podem ocorrer, dentre eles o aneurisma dissecante, entidade patológica de elevado índice de morbi-mortalidade (BORGES, 2006).

2.1 DOENÇAS DA AORTA

2.1.1 Aneurismas da Aorta

Segundo Virmani e Burke (2001), os aneurismas são dilatações circunscritas das artérias ou câmaras cardíacas. A maioria dos aneurismas é encontrada na aorta (Figura 2). Os aneurismas aórticos são caracterizados por progressiva dilatação da parede do vaso, envolvendo as três túnicas que pode evoluir para uma ruptura. Quanto à forma, os aneurismas podem ser saculares, com boca estreita ou fusiformes. A patogênese dos aneurismas da aorta é complexa e necessita de muitas investigações. Diferentes teorias têm sido propostas, mas nenhuma delas foram aceitas como plenamente estabelecidas (TANWEER *et al.*, 2014). Todos parecem ser consequência da perda na resistência da parede. O processo inicia-se por alterações estruturais da camada média que resultam em redução na resistência do vaso, provocando alongamento e tortuosidade da parede e dilatação do lúmen do vaso (VIRMANI e BURKE, 2001).

Figura 2 Seta exibindo uma dilatação na artéria aorta



Fonte:Autor (2012).

O principal critério indicativo de um aneurisma da aorta no segmento abdominal é um diâmetro maior ou igual a 5,5 cm (HIRSCH *et al.*, 2006). No entanto, um aneurisma de aorta abdominal menor que 5,5 cm pode se romper (FILLINGER, 2007; REEPS *et al.*, 2008). No início, a dilatação é geralmente fusiforme, pelas leis da física. O aumento do diâmetro do vaso eleva a tensão na parede, o que contribui para uma dilatação mais acentuada (VIRMANI e BURKE, 2001).

A dilatação progressiva resulta em danos maiores, em certos pontos da parede, o que por sua vez provoca uma dilatação local mais acentuada em forma de saco, formando o aneurisma sacular. Os aneurismas crescem lentamente, atingem volume considerável e podem comprimir, deslocar e até mesmo destruir estruturas vizinhas, além disso, tendem a aumentar de tamanho até se romperem, provocando quadros hemorrágicos (VIRMANI e BURKE, 2001).

Os aneurismas da aorta podem ainda serem classificados em inflamatórios ligados ou não à aterosclerose, situados mais comumente na aorta abdominal, e não inflamatórios, que aparecem com maior frequência na aorta ascendente. Os aneurismas não-inflamatórios da aorta são comumente categorizados como degenerativos. Parte destes pacientes são portadores de doenças genéticas conhecidas, como síndrome de Marfan e Ehlers-Danlos, que são distúrbios hereditários do tecido conectivo, levando a um defeito na estrutura do colágeno. Cada vez mais se vêm detectando defeitos genéticos, inclusive variantes nas referidas doenças (PEREIRA e GUTIERREZ, 2004). Os aneurismas de aorta podem sofrer uma rasgadura da parede do vaso, passando a ser denominado de aneurisma dissecante da

aorta (BORGES, 2006).

2.1.2 Aneurisma Dissecante da Aorta

O aneurisma dissecante da aorta é caracterizado por um desenvolvimento súbito de uma laceração da camada íntima expondo diretamente a camada média, desta forma, o sangue penetra na porção mediana separando-a e formando um falso lúmen preenchido por sangue (BRAUNWALD *et al.*, 2003) (Figura 3). Knobel (2006), define dissecção da aorta como a delaminação das suas paredes que percorre um espaço virtual entre a adventícia e a íntima. A dissecção aórtica é uma complicação rara, sendo encontrada em pacientes com hipertensão arterial sistêmica e idade avançada, tabagistas, homens na proporção de (4:1), caucasianos, uso de corticoides, diabetes e dislipidemia (KUNIHARA *et al.*, 2002; LANDENHED *et al.*, 2015).

Figura 3. Seta indicando o aneurisma dissecante da aorta: formação do falso lúmen



Fonte: Autor (2012).

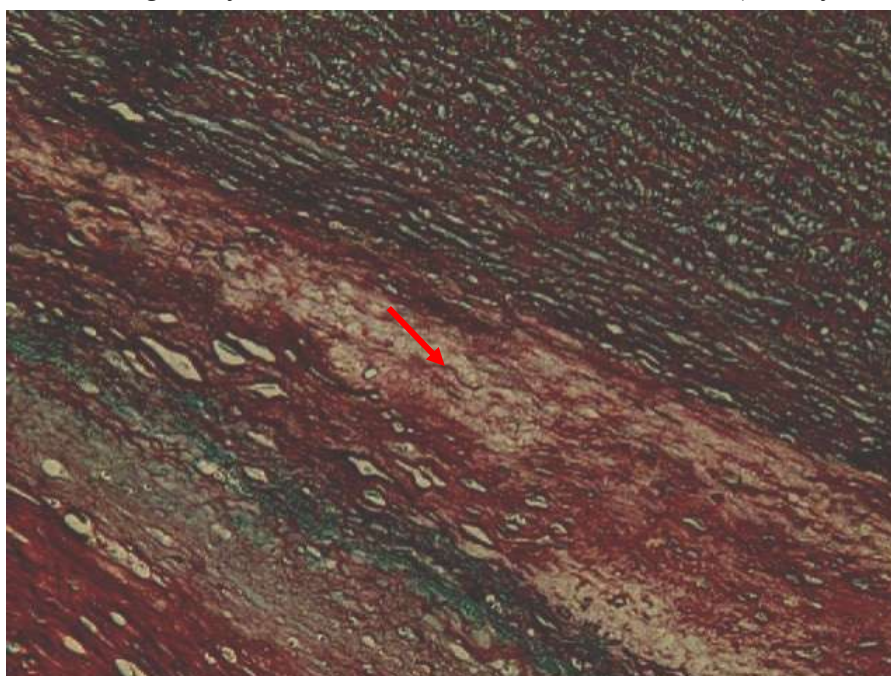
Os aneurismas dissecantes e os não dissecantes estão freqüentemente associados a uma desordem genética. Logo, a principal diferença consiste no fato de que os aneurismas dissecantes são marcados por uma separação das paredes da aorta, o que não acontece nos aneurismas não dissecantes. Entretanto, o grande interesse de estudar conjuntamente, consiste no fato de que apresentam em comum características histopatológicas na túnica média, tais como: acúmulo de material mucóide (proteoglicanos e glicosaminoglicanos), fragmentação nas fibras elásticas, aparente diminuição do número de células musculares

lisas e o fato de não apresentarem inflamação. Este conjunto de eventos anormais e degradativos causariam um enfraquecimento tecidual (BORGES, 2006) (Figura 4).

Isto poderia assim resultar em dilatação da parede como um todo ou, em casos mais agudos, na ruptura da túnica média (dissecção). Cabe acrescentar que há pacientes com aneurismas não dissecantes que podem sofrer dissecção, porém correspondem a uma minoria (BORGES, 2006). A degeneração da camada média, na qual é evidenciada uma clássica degradação do colágeno e da elastina, é considerada o principal fator predisponente na maioria dos casos de dissecção aórtica. Portanto, qualquer processo mórbido ou outra condição que comprometa a integridade dos componentes musculares ou elásticos da camada média, predispõem a aorta à dissecção (BRAUNWALD *et al.*, 2003).

Além de degeneração da túnica média, outros achados histopatológicos são relevantes na área da dissecção tais como: áreas de degeneração mucóide da aorta, infiltrado linfoplasmocítico perivascular com endarterite obliterativa da *vasa-vasorum* e intensa separação das fibras elásticas com depósitos de mucopolissacarídeos similares ao grau associado com a síndrome de Marfan ou necrose cística da camada média (CHOI *et al.*, 1999).

Figura 4. Seta indicando a fragmentação das fibras elásticas a nível da túnica média. (Coloração de Orceína, 100x)



A tendência do aneurisma dissecante é limitar-se à aorta, porém pode acometer as artérias ilíacas, carótidas, mesentéricas, renais, subclávias e as coronárias com conseqüente redução do fluxo sanguíneo e isquemia dos territórios atingidos (DEBAKEY *et al.*, 1982).

Uma vez ocorrendo à dissecação, o sangue pode se dirigir a vários caminhos: voltar para a luz principal, extravasar para fora da artéria, continuar pelos ramos aórticos ou até mesmo permanecer na luz falsa coagulando e formando um hematoma na camada média (DEBAKEY *et al.*, 1982). Segundo Braunwald *et al.*, (2003), o aneurisma dissecante da aorta pode ser classificado em dois tipos: tipo 1 quando no segmento anatômico ascendente e tipo 2 quando na aorta descendente. Cerca de 65% das lacerações da íntima ocorrem na aorta ascendente, 20% na aorta descendente, 10% no arco aórtico e 5% na aorta abdominal, sendo que a prevalência da dissecação da aorta concentra-se nas 6º e 7º décadas de vida (GOLDMAN *et al.*, 2005).

Knobel (2006) define que a manifestação clínica principal da dissecação aórtica é a dor torácica, habitualmente de forte intensidade e que é acompanhada de sintomas neurovegetativos discretos ou permanentes decorrentes da compressão de vasos da base ou ramos medulares podendo determinar acidentes vasculares encefálicos, paraparesia ou paraplegia. A dor tem localização variada com tendência a migrar para as costas e abdômen, não melhorando com decúbito, uso de vasodilatadores e analgésicos habituais. Esta artéria pode ser acometida por depósitos de gordura, que podem evoluir a longo prazo para as placas ateroscleróticas originando a doença aterosclerose (GARDNER, 1999).

2.1.3 Doença Aterosclerótica

A aterosclerose é uma doença crônica que atinge vasos sanguíneos periféricos e centrais, podendo ser considerada um estado inflamatório ativo, cujas lesões têm evolução longa e gradual (KRAUSE *et al.*, 2007). Esse processo é acentuado pela presença de fatores de risco cardiovasculares como tabagismo, etilismo, sedentarismo e consumo excessivo de gordura, fazendo com que a doença aterosclerótica seja uma das principais causas de morbidade e mortalidade em adultos de todo o mundo (STARY *et al.*, 1994; GIULIANO *et al.*, 2005). Células inflamatórias estão envolvidas na patogênese da ruptura das placas ateroscleróticas, através do enfraquecimento da placa fibrótica devido à alta atividade das enzimas produzidas, que degradam a matriz extracelular (ATIKNSON *et al.*, 1994; TSURUDA *et al.*, 2006; BOT *et al.*, 2007).

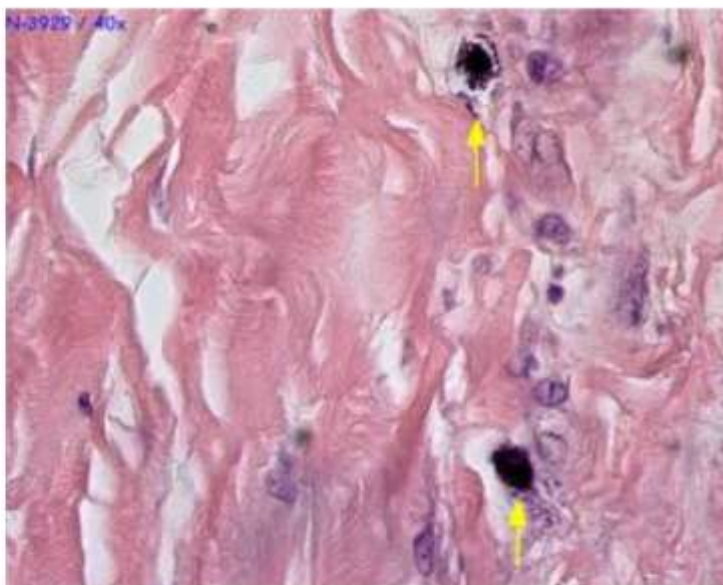
Os macrófagos representam o componente inflamatório mais importante na aterosclerose, sendo encontrados tanto em lesões discretas como as mais avançadas (HANSSON, 2005). Estas células são as protagonistas da inflamação e da resposta imune inata. Sua ação depende da capacidade de produção de radicais livres de oxigênio,

proteases, fatores do sistema complemento e citocinas (STARY *et al.*, 1995).

Os mastócitos também têm participação importante na patogênese da placa aterosclerótica e suas complicações (BOT *et al.*, 2007), podendo ser encontrados tanto em tecidos normais como naqueles com inflamação (METCALFE, 2008). Seus grânulos contêm principalmente histamina, proteases neutras e proteoglicanos da heparina e são as primeiras células imunes que consideravelmente estimulam o processo inflamatório. Originalmente, os mastócitos foram divididos fenotipicamente em dois tipos de acordo com as proteases neutras citoplasmáticas: os que contêm triptase e os que contêm triptase e quimase (FILIPPIS, 2008) sendo que na aorta humana, a maior parte dos mastócitos contem triptase e quimase simultaneamente (KOVANEN, 2007).

Os mastócitos ativados têm sido encontrados abundantemente na adventícia durante a progressão da placa ateromatosa e também na íntima das artérias, influenciando na vulnerabilidade das placas ateroscleróticas e colaborando para a ruptura e erosão da placa (BOT *et al.*, 2007) na qual a quimase e a triptase parecem estar envolvidas nesse processo, pois os sítios com placa aterosclerótica contém elevado número de mastócitos ativados em presença de TNF- α (Fator de Necrose Tumoral α) que levam a apoptose de células musculares lisas, epiteliais e miócitos. Os mastócitos também degradam a fibronectina e vibronectina, que compõe a matriz extracelular e que são necessárias para a adesão das células, ou então ativam metaloproteinases, que por sua vez degradam a matriz extracelular fragilizando a parede da aorta podendo levar a um quadro futuro de dissecção desta artéria, logo estando intimamente ligado ao desencadear de um aneurisma (HEIKKILA *et al.*, 2008; CIAVARELLA *et al.*, 2015) (Figura 5). Neste contexto há uma perda da lâmina elástica e células musculares lisas. Além disso, há um aumento em metaloproteases de matriz e marcadores inflamatórios (JACOB *et al.*, 2015).

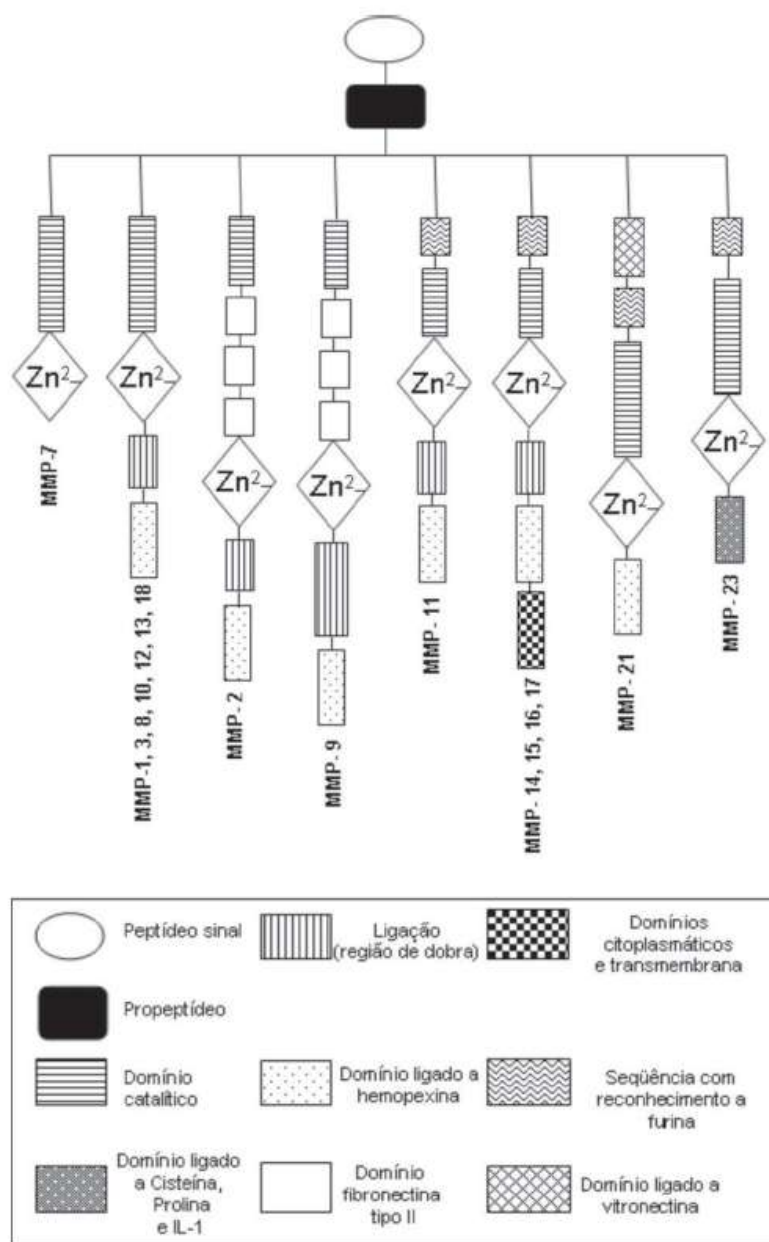
Figura 5. Corte histológico do fragmento da camada adventícia da aorta em que observa-se mastócitos (setas)
[Giemsa, 3200x]



Fonte: Ramalho (2010).

As metaloproteinases (MMPS) são uma família de proteases dependentes de cálcio e zinco secretadas de forma inativa que requerem ativação para a digestão enzimática. A sua ativação é controlada por inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). Cada tipo de metaloproteinase promove uma degradação de uma dos componetes histológicos da aorta. O grupo das estromelinas (MMPs 3, 10, 11, 19, 20) degradam proteínas de ligação, fibronectina, laminina e os colágenos dos tipos III e IV (BIRKEDAL e HANSEN, 1993; BIETH *et al.*, 2001; JACOB *et al.*, 2001; GALIS e KHATRI, 2002; VISSE e NAGASE, 2003). Enquanto as matrilisinas degradam o versican, elastina, fibronectina e colágeno tipo IV (THOMPSON e LOFTUS, 2002) (Figura 6).

Figura 6 - Arranjo dos domínios das diferentes metaloproteínases em humanos, demonstrando as estruturas em comum das metaloproteínases e suas particularidades estruturais



Fonte: Araújo *et al.*, (2010).

Logo, tanto as metaloproteínases quanto os mastócitos são instrumentos importantes na reação inflamatória presente na placa aterosclerótica que podem ser avaliados e quantificados através de métodos histotecnológicos laboratoriais específicos (BORGES, 2006; KINET 2007).

A atividade proteolítica das metaloproteínases pode ser regulada por três níveis: através do controle da expressão gênica, da ativação das pró-enzimas e pela inibição direta

por inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) ou outros inibidores como a alfa 2-macroglobulina. A principal via de ativação *in vivo* das MMPs é o sistema do plasminogênio. A ativação das pró-MMPs se faz diretamente pela plasmina. O plasminogênio é convertido em plasmina, enzima ativa, pelo ativador de plasminogênio do tipo tecidual (t-PA) ou pelo ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (u-PA) que se encontram ligados a um receptor na membrana celular, receptor u-PA (u-PAR). As principais MMPs ativadas pela plasmina são proMMP-1, proMMP-3, proMMP-7, proMMP-9, proMMP-10 e proMMP-13. Uma vez ativadas elas podem participar da ativação de outras MMPs, podendo conduzir a quadros aneurismáticos (THOMPSON e LOFTUS, 2002).

Em aneurismas da aorta na porção torácica decorrentes da síndrome de Marfan foi verificado um aumento da expressão da MMP-2, bem como um aumento no processo de apoptose em células musculares lisas vasculares (NATAATMADJA *et al.*, 2003). Aqueles associados a valva aórtica bicúspide apresentaram também um aumento da expressão e atividade da MMP-9, além da MMP-2 (BOYUM *et al.*, 2004). Tais fatos podem ter relação com a predisposição destes pacientes ao desenvolvimento de aneurismas. Nas regiões de acúmulo mucóide, nesta mesma condição patológica, Borges, 2006, não encontrou aumento de nenhuma das metaloproteinases estudadas, sendo elas as MMP-1, MMP-2, MMP-3 e MMP-9.

Um aumento da expressão de algumas metaloproteinases foi relatado na porção ascendente de aortas com dissecção, quando comparadas àquelas normais. Na túnica média dessas aortas, a expressão das MMP-1, MMP-2 e MMP-9 e MMP-12 encontravam-se aumentadas (ISHII e ASUWA, 2000; JACOB *et al.*, 2001; KOULLIAS *et al.*, 2004).

3 ANÁLISES MOLECULARES

Os aneurismas da aorta torácica (TAAD) que levam a uma dissecção aguda são responsáveis por significativa mortalidade e muitos casos estão associados com uma vasta gama de condições incluindo a Síndrome de Marfan (MFS) e a síndrome de Loeys-Dietz. Na ausência de uma síndrome, estimou-se que 19% a 20% dos casos de (TAAD), apresentam um componente genético que conduz a TAAD familiar (ALBORNOZ, 2006). Paralelamente, estima-se que aproximadamente 20% dos pacientes com aneurisma de aorta abdominal (AAA) possuem uma história familiar positiva para aneurismas, sugerindo uma predisposição genética para AAA nestas famílias (VAN DE LUIJTGAARDEN *et al.*, 2014).

Desta forma, fatores hereditários desempenham um papel etiológico importante no aneurisma da aorta e na dissecção, com um número de gens específicos sabidamente comprovados em predispor tal condição (ZIGANSHIN *et al.*, 2015). Estudos prévios conduzidos com pacientes portadores de aneurisma dissecante de aorta demonstraram a associação entre mutações encontradas nos gens *fibrilina-1 (FBN1)* e *recetor do fator transformador de crescimento beta-1 (TGFB1)*, com as diferentes manifestações clínicas da doença (WANG *et al.*, 2012).

O gen *FBN1* codifica uma proteína da matriz extracelular protéica, além de regular o fator de transformação beta (TGF-BETA) sinalizando uma cascata, liberando o TGF-BETA, o qual atua através de seus receptores: *TGFB1* e *TGFB2* (KAARTINEN and WARBURTON, 2003). Cerca de 70 a 93% dos pacientes com a forma clássica de síndrome de Marfan apresentam mutações no gene *FBN1*, enquanto que mutações no gene *TGFB2* são encontradas em cerca de 75% dos pacientes com a síndrome de Loeys-Dietz (BART *et al.*, 2006).

4 FERRAMENTAS HISTOTECNOLÓGICAS

Diversas técnicas, como baterias de colorações especiais e programas computacionais são utilizadas para o estudo das alterações que acometem a aorta, tais como os aneurismas e processos ateromatosos (RAMALHO, 2010; TENÓRIO *et al.*, 2012).

A coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) é direcionada para uma análise histopatológica geral do tecido, enquanto a de orceína destina-se a identificação e estudo das fibras elásticas. Já o Picro-sírius para avaliação do depósito colagênico (CLARK *et al.*, 1981). Em muitos serviços de pesquisa em Patologia, a análise é realizada com o registro de imagens através de um sistema de captação com uma câmera filmadora conectada a um microcomputador e por sua vez a um microscópio ótico (COSTA *et al.*, 2006). Um dos programas de captura de imagens *Motic Plus*, promove a seleção e o armazenamento de tais áreas de interesse que serão avaliadas morfometricamente em outros programas a exemplo do *GIMP 2.0*.

O *GIMP Image Manipulation Program 2.0* promove uma análise quantitativa, ou seja, ele realiza uma avaliação morfométrica de uma determinada área previamente selecionada pelo Software *Motic Plus*. Tal programa quantifica o número médio em *Pixel* (menor elemento de um dispositivo de exibição no qual é atribuída uma cor característica), através da marcação realizada por corantes especiais ou áreas imunomarcadas. Estudos

moleculares que focam os aneurismas e processos ateromatosos também são requeridos em laboratórios de pesquisa em Patologia. Tais estudos focam quais determinados gens e proteínas estão sendo expressas de forma aberrante ou inibidas.

5 REFERÊNCIAS

Atiknson JB, Harlan CW, Harlan GC, Virmani R. The Association Of Mast Cells And Atherosclerosis: A Morphologic Study Of Early Atherosclerotic Lesions In Young People. **Hum Pathol**, Madison, v.25, n. 2, p.154-9, Feb.1994. Disponível em:

<[http://www.humanpathol.com/article/0046-8177\(94\)90271-2/pdf](http://www.humanpathol.com/article/0046-8177(94)90271-2/pdf)>. Acesso em: 10 jan. 2017.

Albornoz G, Coady MA, Roberts M, Davies RR, Tranquilli M, Rizzo JA, Elefteriades JA. Familial thoracic aortic aneurysms and dissections: incidence, modes of inheritance, and phenotypic patterns. **Ann Thorac Surg**, Chicago, v.82, n. 4, p.1400-1405, Oct. 2006.

Disponível em: <[http://www.annalsthoracicsurgery.org/article/S0003-4975\(06\)01020-4/pdf](http://www.annalsthoracicsurgery.org/article/S0003-4975(06)01020-4/pdf)>. Acesso em: 25 jan. 2017.

Araújo et al., Metaloproteinases: aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na cicatrização. **R. Ci. md. biol**, Salvador, v.10, n.1, p.82-88, jan./abr. 2011. Disponível em: <<https://portalseer.ufba.br/index.php/cmbio/article/view/5470/3932>>. Acesso em: 21 Jan. 2016.

Bot I, Jager SCA, Zernecke A, Lindstedt KA, Berkel TJC, Wewer C, Biessen EAL. Perivascular mast cells promote atherogenesis and induce plaque destabilization in apolipoprotein E-Deficient mice. **Circulation**, Dallas, v.115, n. 19, p. 2516-2525, May. 2007. Disponível em: <<http://circ.ahajournals.org/content/115/19/2516>>. Acesso em: 21 Jan. 2016.

Bieth JG. The elastases. **J Soc Biol**, Paris, v.195, n.2, p.173-179, 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11723830>>. Acesso em: 21 Jan. 2016.

Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. **Crit Rev Oral Biol Med**, Thousand Oaks, v.4, n. 2, p.197-250, Jan. 1993. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8435466>>. Acesso em: 21 Jan. 2016.

Bart L. Loeys, Ulrike Schwarze, Tammy Holm, Bert L. Callewaert, George H. Thomas, Hariyadarshi Pannu, Julie F. De Backer, Gretchen L. Oswald, Sofie Symoens, Sylvie Manouvrier, Amy E. Roberts, Francesca Faravelli, M. Alba Greco, Reed E. Pyritz, Dianna M. Milewicz, Paul J. Coucke, Duke E. Cameron, Alan C. Braverman, Peter H. Byers, Anne M. De Paepe, and Harry C. Dietz. Aneurysm Syndromes Caused by Mutations in the TGF- β Receptor. **N England J Med**, Waltham, v. 355, n.1, p.788-798, Aug. 2006. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMoa055695>>. Acesso em: 30 Jan. 2017.

Boyum J, Fellingner EK, Schmoker JD, Trombley L, Mcpartland K, Ittleman FP, Howard AB. Matrix metalloproteinase activity in thoracic aortic aneurysms associated with bicuspid and tricuspid aortic valves. **J Thorac Cardiovasc Surg**, Beverly, v.127, n.3, p.686-691,

Mar. 2004. Disponível em: <[http://www.jtcvsonline.org/article/S0022-5223\(03\)02015-4/pdf](http://www.jtcvsonline.org/article/S0022-5223(03)02015-4/pdf)>. Acesso em: 21 Jan. 2016.

Braunwald, E.; Zipes, D P.; Libby, P. **Tratado de Medicina Cardiovascular**. 6º ed. Roca LTDA, 2003.

Borges LF. Matriz extracelular na aorta ascendente humana: quantificação morfométrica do colágeno em aortas normais e análise topográfica da matrilisina, estromelisina e plasmina em dissecções e aneurismas não-inflamatórios. **Tese de Doutorado da Universidade de São Paulo USP**, São Paulo. 2006.

Booher AM, Isselbacher EM, Nienaber CA, Trimarchi S, Evangelista A, Montgomery DG, Froehlich JB, Ehrlich MP, Oh JK, Januzzi JL, O’Gara P, Sundt TM, Harris KM, Bossone E, Pyeritz RE, Eagle KA; IRAD Investigators. The IRAD classification system for characterizing survival after aortic dissection. **Am J Med**, Tucson, v.126, n.730, p.19-24, Aug. 2013. Disponível em: <[http://www.amjmed.com/article/S0002-9343\(13\)00105-8/fulltext](http://www.amjmed.com/article/S0002-9343(13)00105-8/fulltext)>. Acesso em: 15 Fev. 2017.

Ferraz MLF. Avaliação Morfológica da Aterosclerose em Aortas de Pacientes Autopsiados. **Tese de Doutorado da Universidade Federal do Triângulo Mineiro**. Uberaba, 2008.

Ciavarella, C., Alviano, F., Gallitto, E., Ricci, F., Buzzi, M., Velati, C., Stella, A., Freyrie, A., Pasquinelli, G. Human vascular wall mesenchymal stromal cells contribute to abdominal aortic aneurysm pathogenesis through an impaired immunomodulatory activity and increased levels of matrix metalloproteinase-9. **Circ. J**, Tokyo, v.79, n.7, p.1460–1469, Apr. 2015. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/circj/79/7/79_CJ-14-0857/pdf>. Acesso em: 20 Fev. 2017.

Clark, G. **Staining procedures**. 4th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1981.

Costa PG; Saraiva P; Matayoshi S. Análise Morfométrica da Fenda Palpebral de Pacientes Com Oftalmopatia Distiróideia Antes e Após Aplicação de Toxina Botulínica Tipo A. **Arq Bras Endocrinol Metab**, São Paulo, v.50, n.5, p.920-925, Outubro, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abem/v50n5/32231.pdf>>. Acesso em: 30 Jan. 2017.

Choi KH, Rim SJ, Lee SK, Jang BC, Cho SH. Dissecting aortic aneurysm with aortic-valve insufficiency in systemic lupus erythematosus. **Nephrol Dial Transplant**, Pierre-Bénite, v.14, n. 4, p.969-973, Apr. 1999. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10328483>>. Acesso em: 20 Fev. 2017.

DeBakey ME, McCollum CH, Crawford ES, Morris GC Jr, Howell J, Noon GP et al. Dissection and dissecting aneurysms of the aorta: twenty-year follow-up of five hundred twentyseven patients treated surgically. **Surgery**, Rochester, v.92, n.6, p.1118-1134, Dec. 1982. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7147190>>. Acesso em: 20 Fev. 2017.

Dingemans KP, Teeling P, Lagendijk JH, Becker AE. Extracellular matrix of the human aortic media: an ultrastructural histochemical and immunohistochemical study of the adult aortic media. **Anat Rec**, Medford, v.258, n.1, p.1-14, Jan. 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10603443>>. Acesso em: 25 Fev. 2017.

Fillinger M. Who should we operate on and how do we decide: predicting rupture risk and survival in patients with aortic aneurysm. **Semin Vasc Surg**, New York, v.20, n.2, p.121-127, Jun. 2007. Disponível em: <[http://www.semvascsurg.com/article/S0895-7967\(07\)00024-5/pdf](http://www.semvascsurg.com/article/S0895-7967(07)00024-5/pdf)>. Acesso em: 25 Fev. 2017.

Filippis D, D'Amico A, Iuvone T. Cannabinomimetic control of mast cell mediator release: New perspective in chronic inflammation. **J Neuroendocrinol**, Malden, v.20, n.1, p. 20-25, may. 2008. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2826.2008.01674.x/epdf>>. Acesso em: 25 Fev. 2017.

Gardner E, Gray DJ, Rahilly RO. **Anatomia Estudo Regional do Corpo Humano**. 4º ed. Philadelphia, Guanabara Koogan, 1999.

Giuliano ICB, Coutinho MSSA, Freitas SFT, Pires MMS, Zunino JN, Ribeiro RQC. Lípides séricos em crianças e adolescentes de Florianópolis, SC – Estudo Floripa Saudável 2040. **Arq Bras Cardiol**, São Paulo, v.85, n.2, p. 85-91, Aug. 2005. Disponível em: <<http://www.arquivosonline.com.br/2005/8502/8502004.pdf>>. Acesso em: 15 Fev. 2017.

Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. **Circ Res**, Baltimore, v. 90, n.3, p: 251-262, Feb 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11861412>>. Acesso em: 15 Fev. 2017.

Goldman, Lee; Ausiello, Dennis. **Cecil tratado de medicina interna**. 22º ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2005.

Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **N England J Med**, Waltham, v.352, n. 16, p.1685-1695, Apr. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15843671>> Acesso em: 10 Fev. 2016.

Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzner NR, et al; American Association for Vascular Surgery; Society for Vascular Surgery; Society for Cardiovascular Angiography and Interventions; Society for Vascular Medicine and Biology; Society of Interventional Radiology; ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease; American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic Inter-Society Consensus; Vascular Disease Foundation. ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease): endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation. **Circulation**, Philadelphia, v.113, n.11, p.463-654, Mar. 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16549646>>. Acesso em: 08 Fev. 2016.

Heikkilä HM, Lätti S, Leskinen MJ, Hakala JK, Kovanen PT, Lindstedt KA. Activated

Mast Cells Induce Endothelial Cell Apoptosis by a Combined Action of Chymase and Tumor Necrosis Factor- α . **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, Dallas, v.28, n. 2, p. 309-314, Fev. 2008. Disponível em: <<http://atvb.ahajournals.org/content/atvbaha/28/2/309.full.pdf>>. Acesso em: 08 Fev. 2016.

Ishii T, Asuwa N. Collagen and elastin degradation by matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in aortic dissection. **Hum Pathol**, Madison, v.3, n. 6, p.640-646, Jun. 2000. Disponível em: <[http://www.humanpathol.com/article/S0046-8177\(00\)80104-5/pdf](http://www.humanpathol.com/article/S0046-8177(00)80104-5/pdf)>. Acesso em: 08 Fev. 2016.

Isselbacher EM, Lino Cardenas CL, Lindsay ME. Hereditary Influence in Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection. **Circulation**, Philadelphia, v.133, n.24, p.2516-2528, Jun. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27297344>>. Acesso em: 08 Fev. 2017.

Junqueira, L.C.; Carneiro, J. **Histologia Básica - texto e atlas**. 12ª edição. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2013.

Jacob AD, Barkley PL, Broadbent KC, Huynh TTT. Abdominal Aortic Aneurysm Screening. **Semin Roentgenol**, Madison, v.50, n.2, p.118–126, Apr, 2015. Disponível em: <[http://www.seminarsinroentgenology.com/article/S0037-198X\(14\)00046-7/fulltext](http://www.seminarsinroentgenology.com/article/S0037-198X(14)00046-7/fulltext)>. Acesso em: 08 Fev. 2017.

Jacob MP, Badier-Commander C, Fontaine V, Benazzoug Y, Feldman L, Michel JB. Extracellular matrix remodeling in the vascular wall. **Pathol Biol**, Paris, v.49, n.4, p.326-332, May, 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11428168>>. Acesso em: 09 Fev. 2016.

Kinet J. The essential role of mast cells in orchestrating inflammation. **Immunol Rev**, Malden, v.217, n.1, p.5-7, Jun, 2007. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-065X.2007.00528.x/epdf>>. Acesso em: 09 Fev. 2016.

Knobel, Elias. **Condutas do paciente grave**. 3ª ed. São Paulo, Atheneu, 2006.

Krause MP, Hallage T, Gama MPR, Sasaki JE, Miculis CP, Buzzachera CF, Silva SG. Associação entre perfil lipídico e adiposidade corporal em mulheres com mais de 60 anos de idade. **Arq Bras Cardiol**, São Paulo, v.89, n.3, p.163-169, Sept, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abc/v89n3/a04v89n3.pdf>>. Acesso: 09 Fev. 2016.

Koullias GJ, Ravichandran P, Korkolis DP, Rimm DL, Eleftheriades JA. Increased tissue microarray matrix metalloproteinase expression favors proteolysis in thoracic aortic aneurysms and dissections. **Ann Thorac Surg**, Chicago, v.78, n. 6, p.2106-2110, Dec, 2004. Disponível em: <[http://www.annalsthoracicsurgery.org/article/S0003-4975\(04\)01618-2/pdf](http://www.annalsthoracicsurgery.org/article/S0003-4975(04)01618-2/pdf)>. Acesso em: 09 Fev. 2016.

Kunihara T, Sasaki S, Nishibi T, Akimaro Kudo F, Shiiya N, Murashita T, et al. Successful endovascular stent-grafting for thoracic aortic aneurysm in systemic lúpus erythematosus. **J Cardiovasc Surg**, Torino, v.43, n.2, p.235-240, Apr, 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11887062>>. Acesso em: 30 Jan. 2017.

Kovanen PT. Mast cells: multipotent local effector cells in atherothrombosis. **Immunol Rev**, Malden, v.217, n.1, p.105-122, Jun, 2007. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-065X.2007.00515.x/epdf>>. Acesso em: 30 Jan. 2017.

Kaartinen, V., and Warburton, D. Fibrillin controls TGF- β activation. **Nat. Genet**, New York, v.33, n.3, p.331-332. Mar, 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12610545>>. Acesso em: 30 Jan. 2017.

Landenhed, M., Engström, G., Gottsäter, A., Caulfield, M.P., Hedblad, B., Newton-Cheh, C., Melander, O., Smith, J.G. Risk profiles for aortic dissection and ruptured or surgically treated aneurysms: a prospective cohort study. **J. Am. Heart Assoc**, Dallas, v.4, n.1, p.1-10, Jan, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4330075/pdf/jah3-4-e001513.pdf>>. Acesso em: 30 Jan. 2017.

Metcalf DD. Mast cells and mastocytosis. **Blood J**, Washington, v.112, n.4, p.946-956, Aug, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2515131/?report=reader>>. Acesso em: 30 Jan. 2015.

Nataatmadja M, West M, West J, Summers K, Walker P, Nagata M, Watanabet. Abnormal extracellular matrix protein transport associated with increased apoptosis of vascular smooth muscle cells in marfan syndrome and bicuspid aortic valve thoracic aortic aneurysm. **Circulation**, Philadelphia, v.108, n.2, p.329-334, Sep, 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12970255>>. Acesso em: 30 Jan. 2017.

Napoli C, D'armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, Palinski W. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. **J Clin Invest**, Michigan, v.100, n. 11, p.2680-2690, Dec, 1997. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC508471/pdf/1002680.pdf>>. Acesso em: 30 Jan. 2017.

Priyank Shah, Sharad Bajaj, Faye Shamoon. Aortic Dissection Caused by Percutaneous Coronary Intervention: 2 New Case Reports and Detailed Analysis of 86 Previous Cases. **Texas Heart Institute Journal**, Houston, v. 43, n.1, p.52-60, Fev, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4810587/pdf/i0730-2347-43-1-52.pdf>>. Acesso em: 20 Jan. 2017.

Pereira LV, Gutierrez PS. Aspectos genéticos envolvidos em doenças da aorta. **Rev Soc Cardiol Est S. Paulo**, São Paulo, v.14, n.13, p.488-98, Maio-jun, 2004. Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=407466&indexSearch=ID>>. Acesso em: 25 Jan. 2017.

Ramalho, L.S. Análise Morfométrica de Mastócitos na Aorta de Pacientes Autopsiados. **Dissertação de mestrado da Universidade Federal do Triângulo Mineiro UFTM**. Uberaba, 2010.

Reeps C, Essler M, Pelisek J, Seidl S, Eckstein HH, Krause BJ. Increased 18F fluorodeoxyglucose uptake in abdominal aortic aneurysms in positron emission/computed tomography is associated with inflammation, aortic wall instability, and acute symptoms. **J Vasc Surg**, Chicago, v.48, n.2, p.417-423, Aug, 2008. Disponível em: <[http://www.jvascsurg.org/article/S0741-5214\(08\)00509-0/pdf](http://www.jvascsurg.org/article/S0741-5214(08)00509-0/pdf)>. Acesso em: 25 Jan. 2017.

Roberts L, Jacob MP, Fulop T. Elastin in blood vessels. **Ciba Found Symp**, Hoboken, v.192, n.1, p.286-299, Sep, 1995. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8575262>>. Acesso em: 25 Jan. 2017.

Rodella LF, Rezzani R, Bonomini F, Peroni M, Cocchi MA, Hirtler L and Bonardelli S. Abdominal aortic aneurysm and histological, clinical, radiological correlation. **Acta Histochemica**, Maryland Heights, v.118, n.3, p.256-262, Apr, 2016. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0065128116300071/1-s2.0-S0065128116300071/main.pdf?_tid=dddffa05a-2dae-11e7-9f5500000aabb0f6c&acdnat=1493561652_50e31edb5edf9e1a5d845789dbef06fe>. Acesso em: 30 Jan. 2017.

Raines, E.W. The extracellular matrix can regulate vascular cell migration, proliferation, and survival: relationships to vascular disease. **Int J Exp Pathol**, Malden, v.81, n.3, p.173-182, Jun, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10971738>>. Acesso em: 25 Jan. 2017.

Sary HC, Chandler AB, Glagov S; Guyton JR, InsullWJr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. **Circulation**, Philadelphia, v.89, n.5, p.2462-2478, May, 1994. Disponível em: <<http://circ.ahajournals.org/content/89/5/2462>>. Acesso em: 25 Jan. 2017.

Sary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S; InsullWjr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis. **Circulation**, Philadelphia, v.92, n.1, p.1355-1374, Sep, 1995. Disponível em: <<https://doi.org/10.1161/01.CIR.92.5.1355>>. Acesso em: 25 Jan. 2017.

Tsuruda T, Kato J, Hatakeyama K, Yamashita A, Nakamura K, Iamamura T, Kitamura K, Onitsuka T, Asada Y, Eto T. Adrenomedullin in mast cells of abdominal aortic aneurysm. **Cardiovasc Res**, Leuven, v.70, n.1, p.158-164, Apr, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.02.003>>. Acesso em: 25 Jan. 2017.

Tanweer, O., Wilson, T.A., Metaxa, E., Riina, H.A., Meng, H. A comparative review of the hemodynamics and pathogenesis of cerebral and abdominal aortic aneurysms: lessons to learn from each other. **J. Cerebrovasc. Endovasc Neurosurg**, Gyeonggi-do, v.16, n.4, p.335-349, Dec, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4296046/pdf/jcen-16-335.pdf>>. Acesso em: 25 Jan. 2017.

Thompson and Loftus. The role of matrix metalloproteinases in vascular disease. **Vascular Medicine**, Cleveland, v.7, p.117-133, May, 2002. Disponível em:

<<http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1191/1358863x02vm420ra>>, Acesso em: 25 Jan. 2017.

Tenório, P. P. Aspectos anatomopatológicos, ultraestruturais e histoquímicos do aneurisma dissecante da artéria aorta humana. **Dissertação de Mestrado da Universidade Federal de Pernambuco UFPE**. Recife, 2012.

Virmani R, Burke, AP. Nonatherosclerotic diseases of the aorta and miscellaneous diseases of the mains pulmonary arteries and larges veins. In: Silver MD, Gotlieb AI, Schoen FJ. (Ed). **Cardiovascular Pathology**. 3ª ed. Churchill Livingstone, 2001.

Van de Luijtgarden KM, Bastos Goncalves F, Hoeks SE, Valentijn TM, Stolker RJ, Majoor-Krakauer D, Verhagen HJ, Rouwet EV. Lower atherosclerotic burden in familial abdominal aortic aneurysm. **J Vasc Surg**, Chicago, v.59, n.3, p.589–593, Marc, 2014. Disponível em: <[http://www.jvascsurg.org/article/S0741-5214\(13\)01711-4/pdf](http://www.jvascsurg.org/article/S0741-5214(13)01711-4/pdf)>. Acesso em: 28 Jan. 2017.

Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circ Res**, Baltimore, v.92, n.8, p.27-39, May, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D>>. Acesso em: 27 Jan. 2017.

Veinot JP, Ghadially FN, Walley VM. Light microscopy and ultrastructure of the blood vessels and heart. In: Silver MD, Gotlieb AI, Schoen FJ. (Ed). **Cardiovascular Pathology**. 3ª ed. Churchill Livingstone, 2001.

Wang WJ, Han P, Zheng J, Hu FY, Zhu Y, Xie JS, Guo J, Zhang Z, Dong J, Zheng GY, Cao H, Liu TS, Fu Q, Sun L, Yang BB and Tian XL. Exon 47 skipping of fibrillin-1 leads preferentially to cardiovascular defects in patients with thoracic aortic aneurysms and dissections. **J Mol Med**, Berlim, v.91, n.1, p.37-47, Fev, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3593235/>>. Acesso em: 27 Jan. 2017.

Ziganshin BA, Bailey AE Coons C, Dykas D Charilaou P, Tanriverdi LH, Liu L, Tranquilli M, Bale AE, Elefteriades JA. Routine Genetic Testing for Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection in a Clinical Setting. **Ann Thorac Surg**, Chicago, v.100, n.5, p.1604-1611, Nov, 2015. Disponível em: <[http://www.annalsthoracicsurgery.org/article/S0003-4975\(15\)00735-3/pdf](http://www.annalsthoracicsurgery.org/article/S0003-4975(15)00735-3/pdf)>. Acesso em: 27 Jan. 2017.

Yuanming Luo; Ambroise Duprey; Stéphane Avril; Jia Lu. Characteristics of thoracic aortic aneurysm rupture in vitro. **Acta Biomater**, Pennsylvania, v, 42, n. 1, p.286-295, Sep, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706116303130>>. Acesso em: 26 Jan. 2017.

6 RESULTADOS

6.1 ARTIGO

Int J Clin Exp Pathol 2017;10(6):6613-6623

Original Article

Histotechnological and socio-epidemiological evaluation of aorta aneurysmal and atheromatous lesions of in humans

Pedro P Tenório¹, Mônica M Araújo², Kalina MB Ferreira³, Marcelo HS Paiva⁴, Mário R de Melo-Júnior⁵

¹Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Brazil; ²Programa de Residência em Patologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brazil; ³Centro Universitário Maurício de Nassau, Brazil; ⁴Centro Acadêmico do Agreste, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil; ⁵Departamento de Patologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brazil

Received January 28, 2017; Accepted April 22, 2017; Epub June 1, 2017; Published June 15, 2017

Abstract: Introduction: Aneurysms and atheromatous process are prominent pathological entities, commonly associated with significant morbidity and mortality. The present study aimed to evaluate socio-epidemiological and histomorphometric aspects in aortas impaired by aneurysmal and atheromatous process. Methods: Anatomical pieces from abdominal and thoracic aorta from cadavers presenting dissecting aneurysm and atheromatous process underwent histopathological, morphometric, ultrastructural and molecular procedures, altogether with a socio-epidemiological survey. Results: A higher prevalence of aneurysmal and atheromatous process was observed in men over women. Histopathological analysis identified that most cases presented collagen and elastic fragility. Morphometric analysis revealed that comparing the collagen fibers, the average number of the aneurysmal group pixels was lower than the control group. In ultrastructural analysis, dissecting aneurysm showed a rupture and fiber loss of uniformity which made up the vessel, above all of the collagen and elastin. Molecular analysis was unable to pinpoint mutations in sequences obtained from our samples. Conclusions: The atheromatous and aneurysmal process prevailed in men, with considerable collagen and elastic fragility in the aneurysmal group, however no polymorphism was detected in samples.

Keywords: Aorta, dissecting aneurysm, histopathology

Introduction

Aneurysms are important pathological entities, commonly associated with important morbidity and mortality rates, especially in recent decades. These entities are circumscribed dilatation found in arteries or in cardiac chambers, characterized by progressive focal dilatation of the vessel wall, involving three layers: medium, intima and adventitia, which it may evolve to a rupture or dissection [1]. It is considered an aneurysm when the vessel diameter is greater than 3 cm or 1.5-fold its original diameter [2]. It was demonstrated that, according to Laplace's law, the diameter augment of the aneurysm increases the surface of the aorta wall, producing an injury expansion, leading to the rupture [3].

The dissecting aortic aneurysm is characterized by the sudden and acute development of a

laceration in the inner layer, which exposes

directly the medial layer of the vessel. The blood penetrates into the middle layer separating it lengthwise, and therefore dissecting its wall. The space is filled up with blood between the dissected layers from the aortic wall make up a false lumen [4]. Thus, the aorta dissection can be understood as the delamination of its walls, which runs a virtual space between the adventitia and intima, being considered as a rare situation, of emergency heart surgery and potentially fatal due to the high risk of rupture [5-8].

The aorta artery can also be impaired by lipidic striae that can evolve in the long term, to atherosclerotic plaques. These plaques may lead to atherosclerotic disease [9]. Thus, atherosclerosis is a chronic disease that affects the peripheral and central blood vessels, and it could be considered an inflammatory active

Histotechnological and socio-epidemiological evaluation of aortic lesions

condition, whose lesions have long and gradual evolution [10]. Inflammatory cells are involved in the pathogenesis of atherosclerotic plaques rupture, through the weakening of the fibrotic plaque due to high activity of enzymes produced by these cells, which degrade the extra-cellular matrix [11-13]. This process is enhanced by the presence of cardiovascular risk factors such as smoking, alcohol consumption, sedentary lifestyle and fat excessive consumption, making the atherosclerotic disease one of the main causes of morbidity and mortality in adults all over the world [14, 15].

Tissue samples were only obtained after the consent of the responsible-legal from the

The thoracic aorta aneurysms that lead to an acute dissection are responsible for significant mortality, being classified as a rare situation of emergency heart surgery and potentially deadly, due to the dissection or rupture high risk of and it is in many cases associated with a wide range of conditions including hypertension such as Marfan syndrome (MFS) or syndrome of Loeys-Dietz 1 [5-8]. Approximately 20% of patients with abdominal aortic aneurysms (AAA) have a positive family history for aneurysms, suggesting a genetic predisposition for AAA in those families [16]. Soon, hereditary factors play an etiological role in the thoracic aortic aneurysm and dissection, with a number of specific genes which are to predispose to this condition [17]. Previous studies carried out in aorta dissecting aneurysm patients demonstrated that an association between mutations found in genes fibrillin-1 (FBN1) and receptor of transforming growth factor beta-1 (TGFB1) and the various clinical manifestations of the disease [18]. Such gene encodes the protein fibrillin-1, which is a structural macromolecule present in all connective tissues. FBN1 is the gene involved in the Marfan syndrome, a hereditary disease of the connective tissue whose main characteristics include the thoracic aortic aneurysm and dissection [19].

Based on these data, the present manuscript had the objective of evaluating the main histomorphometric, epidemiological, ultrastructural and molecular aspects in aorta arteries impaired both by the atheromatous process and the aneurysm.

Materials and methods

Place of experiment and ethical aspects

cadaver, through the informed consent form. Cadavers (n = 33) were necropsied from the Deaths Verification Service, organ from the Department of Health from Pernambuco State located in the department of Pathology from the Federal de University (UFPE), throughout the year of 2014. This research was approved from the Research Ethics Committee from the UFPE, according to letter no. 133/2010.

Aortas processing

After collection, the anatomical pieces were soaked into buffered formalin at 10%, in a final volume with 20-fold the volume of the material. Histological processing was performed in a time-window of up to 72 hours. In parallel, the intensity of atherosclerosis was analyzed macroscopically, and classified as mild, moderate or severe. The aortas were evaluated with the support of a standardized scale from 0.0 to 12.0 cm, being considered mild from 0.1 to 4.0 cm, moderate to 4.1 to 7.0 cm and severe from 7.1 to 12.0 cm. The atheromatous plaques extension was used as a reference for scoring the degree of involvement of the aortas studied [20].

6614

Histochemical study

For this analysis, 15 fragments were obtained for dissecting aneurysm and atherosclerosis. Fifteen aortic samples with no anatomical changes (n = 15) were obtained for negative control purposes. After the correct setting of tissue in 10% formalin, histological sections were obtained (4 µm) through horizontal micro- tome Yamato (Japan) and then mounted on his- tological slides previously identified, in a total of n = 106 slides. These slides were subjected to hematoxylin-eosin (HE) staining batteries for histopathological analysis of the aortic tissue, Orcein and Picrosirius for elastic and collagen fibers analysis, respectively.

Histopathological analysis

The stained tissues were submitted to histopathological analysis by selecting 10 fields on each slide, where it was evaluated the inflammatory profile, focal points of necrosis, hemorrhage, attempted repair, distribution of glycos- aminoglycans, through the characteristic pat- terns of each dye which was used in the proce- dure. Images recording were performed through a capture system with a camcorder camera connected to a microcomputer and in turn to an optical microscope.

Int J Clin Exp Pathol 2017;10(6):6613-6623

Histotechnological and socio-epidemiological evaluation of aortic lesions

Through the program of image capture Motic image Plus 2.0, it was made a preliminary selection and storage of areas of interest in which were subsequently evaluated morphometrically using the software GIMP 2.0.

Ultrastructural analysis

For this analysis, fragments were obtained from 4 cases, being 2 from the negative control aorta artery and 2 with dissecting aneurysm, fractioned and fixed in glutaraldehyde (GA) 2.5% + Paraformaldehyde (PFA) 4% + cacody late buffer 0.1 M, pH 7.4, in 2 hours or over- night at 4°C, each sample was then washed with the same buffer 3 times for 10 minutes each. Samples were post fixed in (OsO₄) 2% + calcium chloride to 5 mM and Potassium ferro- cyanide 0.8% in cacody late buffer for 1 hour in a dark camera. After this process, samples were washed with distilled water for

10 min- utes, was and then transferred to a permeable basket, to be used in the equipment for critical point.

Samples were dehydrated in ascending series of acetone 30%, 50%, 70%, 90%, 15 minutes each and 100% three times, 20 minutes each. Samples were transferred to the critical point apparatus, where a number of replacements with carbon dioxide (CO₂) were performed. After this phase, the drying was performed using the critical point method, it was made the removal of the dry part and mounted on Stub (catalytic microscope), in this phase it was performed the gold cover, and then the sample was observed in scanning electron microscope, through the analysis in scanning electron microscopy (Figure 4C and 4D).

Molecular analysis

For this analysis, anatomical parts from the abdominal and thoracic aorta were evaluated

of cadavers aged between 55 to 96 years with dissecting aneurysm and atheromatous (n = 33). All obtained samples were sectioned at around 1 cm immediately after the death, with a sterile scalpel and placed in deep freezer at

-80 °C prior to performing the procedure. Out of the 65 exons present in the FBN1 gene (NM000138.4), the exon 2 was selected for molecular analysis, and exon 1 (out of 7 present in the gene) was selected for the study of TGFBR2 gene. The PCR primers and reaction

details are found elsewhere [18]. DNA extractions were performed individually, using the DNeasy_Blood_&_Tissue_kit (Qiagen®), following the manufacture's protocol. After extraction, each DNA sample was quantified in a Nano_drop2000c (Thermo_Scientific®) spectrophotometer and subsequently stored at -20 °C.

Each PCR reaction contained 200 µM of each dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 10 pmol of each primer, 1 U Taq polymerase (Invitrogen) and approximately 20 ng of DNA template. The reactions were performed in a T3 Professional® (Biometra) programmed as follows: a cycle of 94 °C for 5 min; 35 cycles of 94 °C for 45 s, 60 °C for 45 s, 72 °C for 2 s; and a final cycle at 72 °C for 10 min. The amplified products were separated and identified by electrophoresis in agarose gel, stained with ethidium bromide and photographed on a U.V.transilluminator.

PCR products were cleaned up, using the illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification® kit (Amersham Pharmacia Biotech) and subsequently quantified in Nanodrop_2000c® (Thermo Scientific). These purified products were submitted to sequencing reactions in the capillary sequencer ABI capillary 3100 (Applied Biosystems). Both strands from each sample were sequenced. Sequences obtained were edited, analyzed and aligned with the program CodonCode Aligner program v. 3.7.1.

The identity of each of the sequence was confirmed through the BLAST tool, which allows the comparison of sequences from the present study with other previously deposited in the NCBI database (National Center for Biotechnology Information).

Statistical analysis

Epidemiological and Clinical Aspects: Information relating to gender, age, anatomical parts of aorta and related diseases were obtained by analyzing the medical records of patients. Statistical analyzes were performed with SPSS version 13.0 and software Epi-Info version 7.0. For the evaluation of the differences between means, it was used t-Student test for unmatched data. The level of significance in the decision of the statistical tests was 5.0%.

Histotechnological analysis: The quantification of protein fiber (in pixels) in the wall for each type of aorta lesion was

determined with
6615

Int J Clin Exp Pathol 2017;10(6):6613-6623

Histotechnological and socio-epidemiological evaluation of aortic lesions

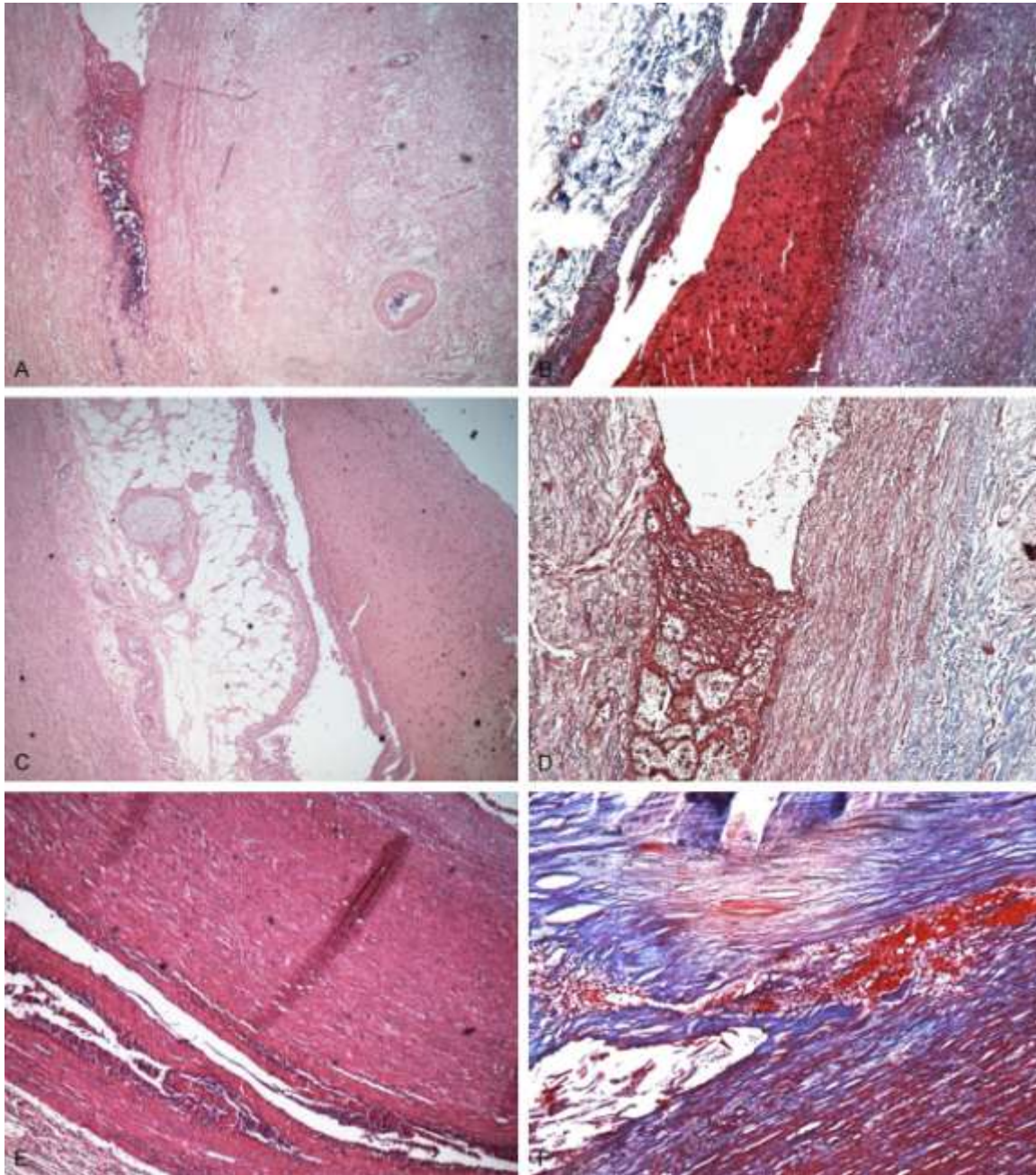


Figure 1. Histological aspects of aortic dissecting aneurysm cases. A. Presence of blood collection in H.E staining in 4×; B. Presence of blood collection in Masson's trichrome staining in 4×; C. False lumen formation in H.E staining in 4×; D. Formation of the false lumen in 4× Masson trichrome staining; E. False lumen formation and blood collection in H.E stain in 4×; F. Formation of false lumen and blood collection in 4× Masson trichrome staining.

Software GIMP 2.0. Data from the digital morphometric study were analyzed using the paired Student's t test with significance level of 5% ($P < 0.05$) by means of the GraphPad PRISM® 5.0 software.

Molecular analysis: The software OriginPro8 (USA) was used for the statistical analysis

and

data were expressed as mean $\pm$ standard deviation. Continuous quantitative variables related to sequence of the gene FBN1 and TGFB β 2 were tested regarding the character

6616

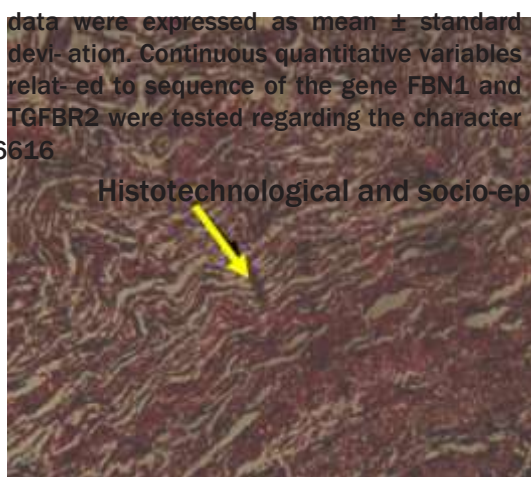


Figure 2. Arrow indicating the disorganizations and irregularity of the elastic fibers in aneurysmal aorta of corpses in orcein staining (orcein 100 $\times$).

Results

Epidemiological aspects

Anatomical parts (n = 30) were obtained from the abdominal and thoracic aorta from cadavers aged between 55 to 96 years with dissecting aneurysm and atheromatous process (n = 15), and samples from the aorta with no anatomical changes (n = 15) as a negative control. Out of the 15 dissecting aneurysm aortas, 60% (9/15) belonged to males, as opposed to 40% (6/15) to the female sex. Grouping all phenotypes, 11 cases (73.33%) had as background the hypertension, followed by 13 cases of smoking (86.66%), 8 cases of alcoholism (53.33%), 1 of diabetes (6.66%) and four cases of heart disease (26.66%) (Table 1).

In (n = 13) 86.6% of all cases studied exhibited smoking, as a personal history, followed by hypertension (n = 11) 73.3%. Out of 60% of the cases of dissecting aneurysms that occurred in men (n = 6) cases 66.66% was hypertensive, (n = 9) cases 100% of smokers (n = 5) cases 55.55% of alcoholic, (n = 1) case 11.11% of diabetic, (n = 2) cases 22.22% of cardiac patient. The average age among men was 71.2 years, whereas the average age among

of normality using the Kolmogorov-Smirnov test. Comparisons analyses were performed using parametric statistic test of Tukey (P < 0.05) through SigmaPlot (USA).

Int J Clin Exp Pathol 2017;10(6):6613-6623



Figure 3. Arrow indicating the histologic aspect of the aorta artery affected by an atheromatous plaque. Stain of (Picro-sirius 100 $\times$).

women was

74.1 years, and of these 83.3% with hypertension (Table 1).

Histotechnological analysis

Out of the (n = 15) aortas impaired by dissecting aneurysm, (n = 13) cases 86.66% exhibited collagen and elastic fibers fragility, fatty deposits and the presence of foamy cells, in addition

to a sharp tearing of the vessel with the presence of the false lumen and blood infiltration (Figure 1A-F).

The atheromatous impairment was also checked at a macroscopic level in the arteries selected in the study, presenting itself in a general way with intensity from moderate to intense. The necrosis was present in these (n= 13) dissecting aneurysm cases, indicating a deterioration and destruction of the aortic tissue, especially due to the presence of a column of blood at the site where there was a tearing.

In our study (n = 11) cases, 73.33% presented, by orcein staining, a disorganization and fragmentation of the fibers (Figure 2).

Through Picro-sirius staining, (n = 11) cases 73.33% exhibited the presence of the fragmentation of collagen fibers all over the tissue, weakly birefringent and greenish, besides the presence of fat deposit (Figure 3).

The morphometric study, based on the analysis of image selected in advance, allowed comparing the average distribution of collagen and elastic fibers in the connective tissue.

From the morphometric data, comparing the collagen and elastic fibers, no statistically significant differences were found, although the average quantity of collagen fibers of the aneurysm group was lower compared to the control group while the elastic fibers group was greater than the control group (Table 2).

6617

Int J Clin Exp Pathol 2017;10(6):6613-6623

Histotechnological and socio-epidemiological evaluation of aortic lesions

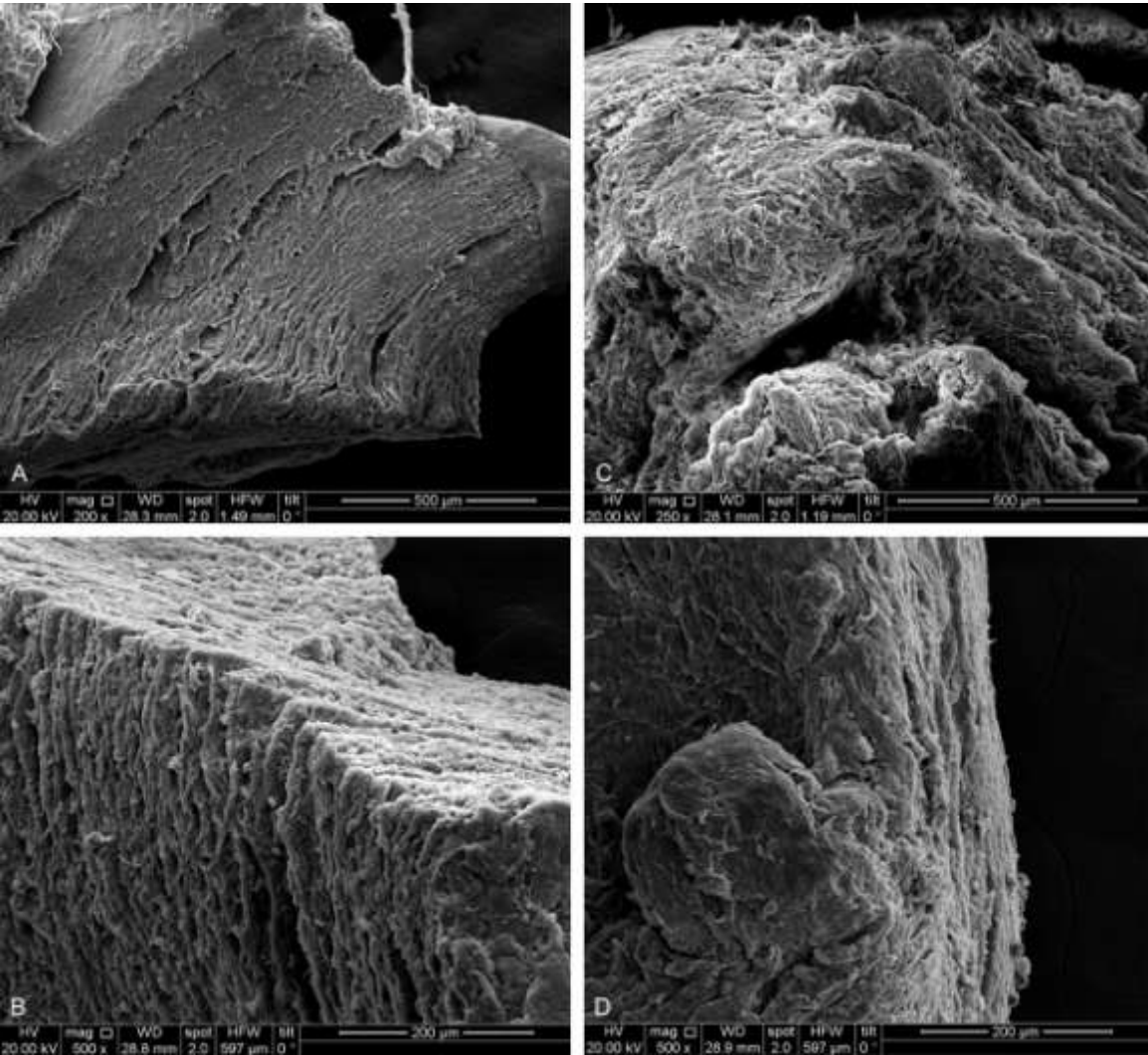


Figure 4. Ultrastructural analysis of normal and aneurysmal aortas. In (A and B) it is observed the arrangement of the layers of the aortic wall with the uniform provision of collagen and elastic fibers. In dissecting aneurysm there is rupture and loss of uniformity of fibers resulting in fragility of the vascular wall (C and D).

Ultrastructural analysis

In normal aorta it is observed the uniform provision of collagen and elastic fibers (Figure 4A and 4B). In dissecting aneurysm there are rupture and loss of uniformity of fibers which make up the vessel, above all, the collagen and elastin, resulting in the vascular wall fragility, events that trigger the dissection of the vessel wall (Figure 4C and 4D).

Molecular analysis

Sequences obtained here from the FBN1 gene were aligned among themselves and with the FBN1 reference sequence (NG_008805.2).

As the complete gene FBN1 presents approximately 245 kb, only the nucleotides between the positions 37.583 and 37855 bps were used for the alignment of this study (Data not shown).

The purified DNA specimens from 1 cm of the biological material presented concentrations ranging from 20 to 400 ng/μl. This variation may have been a reflection of two biases: the conservation status of each sample and the amount of biological material contained in the fragment sectioned of the aorta. The amplification of the genes FBN1 and TGFBR2 generated a fragment of 272 bp and 299 bp, respectively corresponding to the expected sizes of the frag-

6618

Int J Clin Exp Pathol 2017;10(6):6613-6623

Histotechnological and socio-epidemiological evaluation of aortic lesions

Table 1. Epidemiological profile regarding sex, age and co-morbidities of corpses affected by dissecting aneurysm

Cases	Sex	Age	CO-morbidities
Case 1	Male	75	Hypertension, diabetes, smoking, alcoholism, cardiac patient.
Case 2	Female	80	Hypertension
Case 3	Male	62	Hypertension, smoking, alcoholism
Case 4	Male	82	Hypertension, smoking, alcoholism
Case 5	Male	76	Smoking
Case 6	Male	63	Hypertension, smoking
Case 7	Female	96	Hypertension
Case 8	Male	76	Smoking
Case 9	Female	62	Smoking, alcoholism
Case 10	Female	64	Hypertension, smoking, alcoholism, cardiac patient.
Case 11	Male	61	Hypertension, smoking, cardiac patient.
Case 12	Male	91	Smoking, alcoholism
Case 13	Male	55	Hypertension, smoking, alcoholism
Case 14	Female	64	Hypertension, smoking, alcoholism, cardiac patient.
Case 15	Female	79	Hypertension, smoking

Table 2. Average distribution* of collagen and elastic fibers in aneurysmal aortas of corpses

Group	Connective tissue (Fibers)**	
	Collagen	Elastic
Aneurysm	110331.8 ± 7254	119164.9 ± 7365
Control	156592.1 ± 8534	92251.6 ± 3014
	Value of P = 0.122 Value of P = 0.179	

*Pixel values (total area per field = 12234 μm²).

**Mean ± standard deviations (paired t test, P < 0.05).

ments. After sequencing, the sequences obtained from the fragments from the gene FBN1 were edited and aligned with each other along the sequence of reference gene FBN1 (NG_008805.2). As the total size of gene FBN1 is approximately 245 kb, only the nucleotides between the positions 37.583 and 37855 bps were used for the alignment of this study. The alignment showed that, regardless of the bio-

logical sample under study, all of the sequences obtained for this fragment were monomorphic. Besides monomorphic among themselves, it was not also possible to observe mutations in our sequences when compared to the reference sequence of the gene. Unfortunately, the sequences obtained for the fragment concerning the gene TGFBR2 did not exhibit satisfactory quality and were therefore excluded from the final analysis.

Discussion

The general mean age in our casuistry was 72.4 years in line with recent data from the literature that indicate a incidence peak of aortic dissection in the sixth and seventh decades of life. In addition to that, there is a higher prevalence of men affected by dissecting aneurysm [21, 22]. In Brazil, incidence studies of abdominal aneurysm, but information on mortality is still scarce. A study carried out in São Paulo-Brazil revealed a significant increase in mortality rates by standardized aneurysm and aortic dissection, from 1985 to 2009, in which the rate of mortality by dissecting aneurysms and ruptures were 2.86 for men and 2.19 in women by 100,000 inhabitants [23].

The change of connective tissue present in the aortic wall plays an important role in the development of aneurysms because the elastic and collagen fibers are the major determinants of mechanical properties of the aorta. Necrosis is an evident process in the middle layer on the aortas impaired by dissecting aneurysm [3].

Atherosclerosis has been directly associated with the degeneration of the median layer in aortic aneurysms, leading to a dissection condition [24]. According to histopathological findings, a study confirms that the aneurysm is an insidious chronic disease that corresponds to

6619

Int J Clin Exp Pathol 2017;10(6):6613-6623

Histotechnological and socio-epidemiological evaluation of aortic lesions

an extension segment of the vessel wall, including its three layers, where the middle layer forms a false light which can be seen in histological preparations [25].

According to the literature, the elastic fibers, given this context are fragmented and irregular and in some areas absent with large areas of basophilic accumulation and an apparent reduction in the number of smooth muscle cells [25]. In another recent study, the morphological comparison of aneurysmal and non-aneurysmal aortas showed that at the aneurysmal wall presents a rupture of the linearity of elastic fibers in the middle layer and of the collagen structure both in the

tunica media and adventitia. In addition, several inflammatory cells were located around the peri-vascular spaces of the vasa vasorum [3].

In the literature the Picro-sirius staining method is applied to the histopathological diagnosis of collagenolysis due to the fact that this technique detects morphologically, not only the presence of intact bundles of collagen, but also fragmented ones. Regarding the aneurysmal process there are drastic morphological changes in bundles of collagen exhibiting themselves disorganized and weakly stained. One of the most important histologic characteristics of aneurysmal tissue is the elastic fibers fragmentation and a decrease in the concentration of

elastin during the aneurysm growth until its eventual rupture [3].

The collagen component is responsible for the physical strength of the wall that would also suffer degradation, especially of metalloproteinases. The fact of this component fibrillate being in a smaller quantity could explain the easier fragility of the aortic wall in this region. The blood pressure constantly applied on this wall, already weakened and consequently presenting a lower resistance to mechanical forces, could have resulted in tearing and dissection [25]. The elastin and collagen alterations are reflections of the consequence of the production of proteases by the artery wall cells, such as the smooth muscle cells in the media layer, fibroblasts and inflammatory cells. Proteases and, namely, metalloproteases (MMP), are closely bounded with aneurysm [26].

Studies of electronic microscopy addressing the main characteristics at the ultrastructural level of the dissecting aneurysm are scarce. According to studies, the aorta histological structure with atherosclerosis showed fragility in terms of lamellar construction on its wall [27].

Because of the high rate of mortality associated with acute dissection of the ascending aorta being approximately 40% to 50%, it is crucial not only to identify patients with aortas and amplified ascending ones in order to try and slow down the growth using medical treatments, but also to intervene surgically in an elective way before dissection occurs [28]. The knowledge of the likely dissection risk for a given condition and aorta diameter is primordial. The surgery is usually recommended in cases in which the diameter exceeds 5.0 to 5.5 cm; however, a large proportion of dissections may occur in smaller diameters, and even in patients without dilatation [29].

The study of the gene *FBN1* provides information that enables healthcare genetically customized and provides the identification of new mutations responsible for the aortic pathology [17]. Recent results have demonstrated that the detection of genes can contribute to discover the real cause of the abdominal aorta aneurysm and help to identify precisely relatives at risk [30]. The genetic predisposition for aortic aneurysm was established, and the discovery of genes in affected families has identified several major categories of genetic modifications [6].

In patients with Loeys-Dietz syndrome, which is caused by mutations in the transforming growth factor, in the genes type I or II receptor (*TGFBR1* and *TGFBR2*), dissections may occur with little aortic growth [28]. Up to now, the genes identified in the TAAD have mainly been those associated with the smooth muscle maintenance with contractile function, including the *TGFBR2* autosomal dominant [28]. Individuals have already been identified with mutations in the gene *TGFBR2* featuring the aneurysm fusiform type. In families who also have members with AAAs, screening for AAAs is also recommended. Ultimately, identification of defective genes means that only family members who shelter a mutant gene are the ones who must be submitted to surveillance for such aneurysms [31].

Histotechnological and socio-epidemiological evaluation of aortic lesions

Conclusions

Over the epidemiological data, there was a greater prevalence of men affected when compared to women in line with several studies published; being the smoking 86.6% followed by hypertension with 73.3% the most relevant personal history. The atheromatous process is related in many cases with the dissecting aneurysm of the aorta, because, through the macroscopic study that was conducted, we observed impaired aorta arteries both with atheromatous process and the aneurysm.

In dissecting aneurysm there are ruptures and loss of uniformity of fibers which make up the vessel, above all, the collagen and elastin, resulting in a fragility of the vascular wall, i.e., out of the (n = 15) aortas affected by dissecting aneurysm, 86.66% had fragility of the collagen and elastic fibers besides a sharp tearing of the vessel with the presence of the false lumen and infiltration of blood. 73.33% exhibited through orcein and Picro-sirius staining a disorganization and fragmentation of the elastic and collagen fibers, respectively.

We also observed that the hemorrhage and the dissection process are present in most of the cases evaluated in addition to necrosis areas, a fact that we found in the histopathological and morphometric study. In the latter we quantified the average value of pixels by comparing two types of staining. We verified that in the aneurysm group the mean values in pixels per area was close, revealing a provision characteristic of collagen and elastin concerning the aneurysmal process.

Unlike in the control group we observed a variation in the average number in pixels and this fact can be attributed to the staining marking at the time of the histological preparation. Comparing the two groups concerning the collagen it can be observed closer proximity to the value of $P < 0.05$ compared with the elastic fibers. Even in the case of collagen fibers, the average amount of pixels of the aneurysm group was lower comparing with the control group. On the other hand, when it comes to the elastic

fibers, the average amount of pixels of the aneurysm group was lower than the control group.

Regarding the ultrastructural study, we found that at the normal aorta there is uniform arrangement of the collagen and elastic fibers, while at the dissecting aneurysm rupture and loss of uniformity of fibers occurred, especially the collagen and the elastin.

The final result of the molecular analysis demonstrated the absence of mutations among the sequences obtained from our samples. In addition, the comparison between the reference sequence and our sequences also showed the monomorphism of this fragment. The alignment of the sequences revealed that the fragment analyzed exhibited no polymorphisms, since so many of the normal individuals and patients showed the same nucleotide sequence. There is intention to sequence the TGFBR2 gene.

Disclosure of conflict of interest

None.

Address correspondence to: Pedro P Tenório, Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Rua da Alvorada, S/N-Centro de Formação Profissional de Paulo Afonso-CFPPA-

Gen. Dutra, Paulo Afonso-BA 48607-190, Brazil. E-mail: pedrotenorio28@gmail.com

References

- [1] Virmani R, Burke AP. Nonatherosclerotic diseases of the aorta and miscellaneous diseases of the main pulmonary arteries and large veins. In: Silver MD, Gotlieb AI, Schoen FJ, editors. *Cardiovascular Pathology* 2001. pp. 107-137.
 - [2] Jacob AD, Barkley PL, Broadbent KC and Huynh TT. Abdominal aortic aneurysm screening. *Semin Roentgenol* 2015; 50: 118-126.
 - [3] Rodella LF, Rezzani R, Bonomini F, Peroni M, Cocchi MA, Hirtler L and Bonardelli S. Abdominal aortic aneurysm and histological, clinical, radiological correlation. *Acta Histochem* 2016; 118: 256-262.
 - [4] Braunwald E, Zipes DP and Libby P. *Doenças da aorta. Tratado de medicina cardiovascular*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013. pp. 1336-1363.
 - [5] Booher AM, Isselbacher EM, Nienaber CA, Trimarchi S, Evangelista A, Montgomery DG, Froehlich JB, Ehrlich MP, Oh JK, Januzzi JL, O'Gara P, Sundt TM, Harris KM, Bossone E, Pyeritz RE and Eagle KA; IRAD Investigators. The IRAD classification system for characterizing survival after aortic dissection. *Am J Med* 2013; 126: 19-24.
- 6621
- Int J Clin Exp Pathol 2017;10(6):6613-6623
- ### Histotechnological and socio-epidemiological evaluation of aortic lesions
- [6] Isselbacher EM, Lino Cardenas CL and Lindsay ME. Hereditary influence in thoracic aortic aneurysm and dissection. *Circulation* 2016; 133: 2516-2528.
 - [7] Chunlai S, Stella PR, Belkacemi A and Agostoni P. Aortic dissection, a complication during successful angioplasty of chronic total occlusion of the right coronary artery, was treated conservatively. *Cardiovasc J Afr* 2012; 23: 11-13.
 - [8] Shah P, Bajaj S and Shamoof F. Aortic dissection caused by percutaneous coronary intervention: 2 new case reports and detailed analysis of 86 previous cases. *Tex Heart Inst J* 2016; 43: 52-60.
 - [9] Hussein N, Hasan A and Abdulameer A. Aortic root calcification: a possible imaging biomarker of coronary atherosclerosis. *Pulse Basel* 2016; 3: 167-171.
 - [10] Krause MP, Hallage T, Gama MPR, Sasaki JE, Miculis CP, Buzzachera CF and Silva SG. Associação entre perfil lipídico e adiposidade corporal em mulheres com mais de 60 anos de idade. *Arq Bras Cardiol* 2007; 89: 163-169.
 - [17] Ziganshin BA, Bailey AE, Coons C, Dykas D, Charilaou P, Tanriverdi LH, Liu L, Tranquilli M, Bale AE and Elefteriades JA. Routine genetic testing for thoracic aortic aneurysm and dissection in a clinical setting. *Ann Thorac Surg* 2015; 100: 1604-1611.
 - [18] Wang WJ, Han P, Zheng J, Hu FY, Zhu Y, Xie Guo J, Zhang Z, Dong J, Zheng GY, Cao H, Liu TS, Fu Q, Sun L, Yang BB and Tian XL. Exon 47 skipping of fibrillin-1 leads preferentially to cardiovascular defects in patients with thoracic aortic aneurysms and dissections. *J Mol Med* 2012; 91: 37-47.
 - [19] Sakai LY, Keene DR, Renard M and De Backer J. FBN1: the disease-causing gene for Marfan.
 - [11] Atkinson JB, Harlan CW, Harlan GC and Virmani R. The association of mast cells and atherosclerosis: a morphologic study of early atherosclerotic lesions in young people. *Hum Pathol* 1994; 25: 154-159.
 - [12] Bot I, de Jager SC, Zerneck A, Lindstedt KA, van Berkel TJ, Wewer C and Biessen EA. Perivascular mast cells promote atherogenesis and induce plaque destabilization in apolipo-

- protein E-deficient mice. *Circulation* 2007; 115: 2471-2473.
- [13] Tsuruda T, Kato J, Hatakeyama K, Yamashita A, Nakamura K, Iamamura T, Kitamura K, Onitsuka T, Asada Y and Eto T. Adrenomedullin in mesenchymal cells of abdominal aortic aneurysm. *Cardiovasc Res* 2006; 70: 158-164.
- [14] Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD and Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the committee on vascular lesions of the council on arteriosclerosis, American heart association. *Circulation* 1994; 89: 2462-2478.
- [15] Giuliano Ide C, Coutinho MS, Freitas SF, Pires MM, Zunino JN, Ribeiro RQ. Lípidos séricos em crianças e adolescentes de Florianópolis, SC- Estudo Floripa Saudável 2004. *Arq Bras Cardiol* 2005; 85: 85-91.
- [16] Van de Luijckgaarden KM, Bastos Goncalves F, Hoeks SE, Valentijn TM, Stolker RJ, Majoer-Krakauer D, Verhagen HJ and Rouwet EV. Lower atherosclerotic burden in familial abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 2014; 59: 589-593.
- syndrome and other genetic disorders. *Gene* 2016; 591: 279-291.
- [20] Ferraz MLF. Avaliação Morfológica da Aterosclerose em Aortas de Pacientes Autopsiadas. Tese de Doutorado da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba. 2008; 30-31.
- [21] Tsamis A, Rachev A and Stergiopulos N. A constituent-based model of age-related changes in conduit arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 301: 1286-1301.
- [22] Zulliger MA and Stergiopulos N. Structural strain energy function applied to the ageing of the human aorta. *J Biomech* 2007; 40: 3061-3069.
- [23] Santo AH, Puech-Leão P and Krutman M. Trends in aortic aneurysm- and dissection-related mortality in the state of São Paulo, Brazil, 1985-2009: multiple-cause-of-death analysis. *BMC Public Health* 2012; 12: 859.
- [24] Albini PT, Segura AM, Liu G, Minard CG, Coselli JS, Milewicz DM, Shen YH and LeMaire SA. Advanced atherosclerosis is associated with increased medial degeneration in sporadic ascending aortic aneurysms. *Atherosclerosis* 2014; 232: 361-368.
- [25] Borges LF. Matriz extracelular na aorta ascendente humana: quantificação morfométrica do colágeno em aortas normais e análise topográfica da matrilisina, estromelisinase e plasmina em dissecções e aneurismas não-inflamatórios. Tese de Doutorado da Universidade de São Paulo USP, São Paulo. 2006; 13-61.
- [26] Ciavarella C, Alviano F, Gallitto E, Ricci F, Buzzi M, Velati C, Stella A, Freyrie A and Pasquinelli G. Human vascular wall mesenchymal stromal cells contribute to abdominal aortic aneurysm pathogenesis through an impaired immunomodulatory activity and increased levels of matrix metalloproteinase-9. *Circ J* 2015; 79: 1460-1469.
- [27] Orsi AM, Stefanini MA, Crocci AJ, Simões K and Ribeiro AA. Some segmental features of the aortic wall of the dog. *Anat Histol Embryol* 2005; 33: 131-134.

6622

Int J Clin Exp Pathol 2017;10(6):6613-6623

Histotechnological and socio-epidemiological evaluation of aortic lesions

- [28] Hiratzka LF, Bakris GL, Beckman JA, Bersin RM, Carr VF, Casey DE Jr, Eagle KA, Hermann LK, Isselbacher EM, Kazerooni EA, Kouchoukos NT, Lytle BW, Milewicz DM, Reich DL, Sen S, Shinn JA, Svensson LG and Williams DM; American College of Cardiology Foundation/ American Heart Association Task Force on Practice Guidelines; American Association for Thoracic Surgery; American College of Radiology; American Stroke Association; Society of Cardiovascular Anesthesiologists; Society for Cardiovascular Angiography and Interventions; Society of Interventional Radiology; Society of Thoracic Surgeons; Society for Vascular Medicine. ACCF/AHA/AATS/ACR/ASA/SCA/SCAI/SIR/STS/SVM Guidelines for the diagnosis and management of patients with thoracic aortic disease: executive summary: a report of the American college of cardiology foundation/ American heart association task force on prac-

tice guidelines, American association for thoracic surgery, American college of radiology, American stroke association, society of cardio-vascular anesthesiologists, society for cardio-vascular angiography and interventions, society of interventional radiology, society of thoracic surgeons, and society for vascular medicine. *Circulation* 2010; **121**: 266-369.

- [29] Spin JM. Gene mutations and familial thoracic aortic aneurysms a walk on the mild side. *Circ Cardiovasc Genet* 2011; **4**: 4-6.
- [30] Van de Lijngaarden KM, Heijmans D, Maugeri A, Weiss MM, Verhagen HJ, Ijpma A, Brüggen-wirth HT and Majoer-Krakauer D. First genetic analysis of aneurysm genes in familial and sporadic abdominal aortic aneurysm. *Hum Genet* 2015; **134**: 881-893.
- [31] Regalado E, Medrek S, Tran-Fadulu V, Guo DC, Pannu H, Golabbakhsh H, Smart S, Chen JH, Shete S, Kim DH, Stern R, Braverman AC and Milewicz DM. Autosomal dominant inheritance of a predisposition to thoracic aortic aneurysms and dissections and intracranial saccular aneurysms. *Am J Med Genet A* 2011; **155**: 2125-2130.

7 CONCLUSÕES

- Das aortas acometidas pelo aneurisma dissecante, a maioria pertencia ao sexo masculino;
- O tabagismo, hipertensão arterial, etilismo, cardiopatia e diabetes, respectivamente prevaleceram;
- A média etária geral foi de 74,2 anos;
- Na maioria dos casos, constatou-se histopatologicamente o aneurisma dissecante;
- A partir dos dados morfométricos, comparando-se as fibras colágenas e elásticas, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes nos grupos estudados;
- Quanto à análise molecular, o resultado final demonstrou ausência de mutações entre as sequências obtidas das amostras avaliadas;
- Quanto ao estudo ultraestrutural, foi evidenciado que na aorta normal a disposição uniforme das fibras colágenas e elásticas, enquanto que, no aneurisma dissecante ocorreram ruptura e perda da uniformidade das fibras, sobretudo, o colágeno e a elastina.

APÊNDICE A- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Prezado(a) responsável,

Chamo-me Pedro Pereira Tenório, sou aluno regularmente matriculado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da UFPE e pretendo realizar uma pesquisa, sob a orientação do Prof. Dr. Mario Ribeiro de Melo-Junior com o objetivo de realizar uma análise epidemiológica, histomorfométrica, ultraestrutural e molecular de aortas acometidas pelo aneurisma dissecante e aterosclerose.

Para tanto, há necessidade de retirarmos amostras da artéria aorta dos cadáveres a fim de realizar estudos anatômicos e laboratoriais cruciais para o entendimento das doenças decorrentes de alterações desta estrutura vascular.

Vossa participação nesta pesquisa consistirá em autorizar a coleta de amostras de artéria aorta do cadáver sob vossa responsabilidade que se encontra neste serviço médico.

As informações obtidas por meio desta pesquisa serão publicadas em meio acadêmico-científico e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar a identificação do paciente (cadáver).

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

Este projeto foi submetido e aprovado ao Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da UFPE, de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Desde já colocamo-nos a inteira disposição para quaisquer esclarecimentos adicionais.

Atenciosamente,


Mario Ribeiro de MELO-JUNIOR

Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n, Cidade Universitária, Recife, PE

CEP: 50670-901
Fone: 2126-8588
Cel: 81-8852-3380
E-Mail: mrmj@gmail.com

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação, e concordo, voluntariamente, em autorizar a coleta das amostras biológicas solicitadas.

Nome do responsável

Testemunha 1

Assinatura do responsável

Testemunha 2

Recife, ____ de _____ de 2012

APÊNDICE B- Carta do Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
 Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 139/2010 - CEP/CCS

Recife, 04 de Junho de 2010

Registro do SISNEP RR - 329706

CARE - 0067.0.172.000-10

Registro CEP/CCS/UFPE Nº 100/10

Título: "Aspectos anátomo-patológicos e histoquímicos do aneurisma dissecante aórtico".

Pesquisador Responsável: Mário Ribeiro de Melo Junior

Senhor(a) Pesquisador(a):

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou, de acordo com a Resolução Nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epigrafe, liberando-o para início da coleta de dados em 04 de Junho de 2010.

Ressaltamos que a aprovação definitiva do projeto será dada após a entrega do relatório final, conforme as seguintes orientações:

- a) Projetos com, no máximo, 06 (seis) meses para conclusão: o pesquisador deverá enviar apenas um relatório final;
- b) Projetos com períodos maiores de 06 (seis) meses: o pesquisador deverá enviar relatórios semestrais.

Dessa forma, o ofício de aprovação somente será entregue após a análise do relatório final.

Atenciosamente

Jáucia Pinheiro Ramos
 Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
 Coordenador do CEP/CCS/UFPE

Recebido no CEP
 do UFPE em
 08-06-10

Às

Prof. Mário Ribeiro de Melo Junior

Programa de Pós-Graduação em Patologia- CCS/UFPE

P. de R. T.

APÊNDICE C- Artigo Publicado na Revista Paraense de Medicina

ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA PARAENSE DE MEDICINA

O PAPEL DAS METALOPROTEINASES NO DESENVOLVIMENTO DO ANEURISMA DE AORTA

THE ROLE OF MATRIX METALLOPROTEINASES IN THE DEVELOPMENT OF AORTIC ANEURYSM

Pedro Pereira TENÓRIO¹; Marcos André Araújo DUQUE²; Mônica Modesto ARAÚJO³; Nicodemos Teles de Pontes FILHO⁴ e Mário Ribeiro de MELO JÚNIOR⁵

Trabalho realizado na Universidade Federal de Pernambuco-UFPE/ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami- LIKA. Recife, Pernambuco, Brasil

1 Biomédico graduado pela Faculdade ASCES. Caruaru, Pernambuco, Brasil; Mestre em Patologia Universidade Federal de Pernambuco- UFPE

2 Biomédico graduado pela Faculdade ASCES. Caruaru, Pernambuco, Brasil; Mestrando em Biologia Aplicada à Saúde UFPE - Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami- LIKA

3 Graduanda em Medicina - Universidade Federal de Pernambuco- UFPE;

4 Médico graduado pela Universidade Federal de Pernambuco- UFPE; Professor Titular do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Pernambuco- UFPE

5 Graduado em Ciências Biológicas (Bacharelado) pela Universidade Federal de Pernambuco – UFPE; Professor Adjunto do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Pernambuco- UFPE

RESUMO

Objetivo: realizou-se uma revisão de literatura enfatizando o papel das metaloproteinases no desenvolvimento do aneurisma de aorta. **Método:** realizado um levantamento da literatura nas principais bases de dados científicos: Medline, Pubmed, Scienc direct, utilizando os seguintes unitermos: metaloproteinases, aorta, aneurisma de aorta. **Conclusão:** as metaloproteinases participam de importantes mecanismos fisiológicos, contudo, os artigos sugerem que o aumento da expressão de alguns tipos de metaloproteinases promovem um desencadeamento de processos que induzem a lesão e dano no tecido aórtico, o que contribui para o desenvolvimento do aneurisma.

DESCRITORES: Metaloproteinases. Aorta. Aneurisma.

INTRODUÇÃO

As metaloproteínas (MMPS) constituem uma família de proteases dependentes de cálcio e zinco identificadas em humanos, (1). Diversos processos fisiológicos ocorrem com a participação das metaloproteínas (2), como determinação da arquitetura da matriz extracelular (3), cicatrização, angiogênese (4) e apoptose (5), contudo várias pesquisas têm indicado um papel fundamental das metaloproteínas no processo patológico levando ao desenvolvimento do aneurisma de aorta (6), desta forma, objetivamos realizar uma revisão bibliográfica acerca das principais metaloproteínas que estão envolvidas no desencadear do aneurisma aórtico.

MÉTODO

Foi realizado um levantamento da literatura nas principais bases de dados científicos, Scielo, Medline, Pubmed, Scienc direct, utilizando os seguintes unitermos: metaloproteínas, aorta, aneurisma de aorta.

DISCUSSÃO

A FAMÍLIA DAS METALOPROTEÍNASES

As metaloproteínas são membros de uma subfamília de proteases, constituída de 25 Proteínas caracterizada pela forte ligação de íons de zinco (Zn^{2+}) e cálcio (Ca^{2+}). O primeiro relato sobre as metaloproteínas foi publicado por Jerome Gross e Charles Lapière, em 1962, que encontraram uma enzima ativa em cultura de pele que degradava colágeno tipo I (7). As metaloproteínas foram subdivididas sendo agrupadas de acordo com o seu substrato. As collagenases que compreendem as (MMPs 1, 8, 13 e 18), as gelatinases (MMP-2, MMP-9) as estromelisinases (MMPs 3, 7, 10, 11, 19, 20), Araújo, et al 2011 matrilisinas (7 e 16) e

as de tipo membrana MT-MMPs (MMPs 14,15, 16, 17, 24 e 25) (8,1) (Tabela I).

MMP	Sinônimo	Peso molecular (kDa)	Substrato
1	Colagenase 1	45	Colágeno tipo I
2	Gelatinase A	66, 62	Proteoglicanos, colágeno IV, V, VII e X, fibronectina
3	Estromelisinase 1	45	Proteoglicanos, colágeno X, XI, procólágeno
7	Matrilisina 1	19	Fibronectina, Plasminogênio
8	Colagenase 2	58	Proteoglicanos
9	Gelatinase B	86, 67	Plasminogênio, colágeno IV
10	Estromelisinase 2	44	Estromelisinase 1
11	Estromelisinase 3	47	IGFBP-1 (proteína de ligação da somatomedina)
12	Elastase de macrófago	22	Plasminogênio, elastina, colágeno IV, Fibronectina
13	Colagenase 3	48	Colágeno tipo I
14	MT1-MMP	54	CD44, Colágeno tipo I
15	MT2-MMP	61	Transglutaminase de superfície
16	MT3-MMP	55	Transglutaminase de superfície
17	MT4-MMP	54	Fibrina
18	Colagenase 4	-	Colágeno tipo I

Araújo, et al 2011

As collagenases são assim denominadas pela sua capacidade de degradar a tripla hélice da molécula de colágenos intersticiais como os

tipos I, II e III. As collagenases aparecem difusamente distribuídas nos tecidos e em áreas de contato entre as células e os elementos matriciais, mesmo quando não há evidências de degradação da matriz, porém desaparecem progressivamente nos processos de fibrose evolutiva, indicando sua importância no equilíbrio entre síntese e degradação do tecido. As gelatinases atuam, sobretudo, em fragmentos já degradados pelas collagenases bem como sobre o colágeno tipo IV e elastina. As estromelisinases degradam proteoglicanos como o agrecano, proteínas de ligação, fibronectina, laminina e os colágenos tipo III e IV (9). As matrilisinases degradam versican, elastina, fibronectina, colágeno tipo IV entre outros. (8). As metaloproteinases de membrana estão envolvidas na degradação de colágenos do tipo I, II e III, e são capazes de ativar algumas outras metaloproteinases da matriz, mas nem todas apresentam atuação na parede vascular. Todas as metaloproteinases são sintetizadas na forma inativa sendo ativadas posteriormente, seja intra ou extracelularmente.

A principal via de ativação *in vivo* das MMPs é o sistema do plasminogênio. A ativação das pró-MMPs se faz diretamente pela plasmina. O plasminogênio é convertido em plasmina (enzima ativa) pelo ativador de plasminogênio do tipo tecidual (t-PA) ou pelo ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (u-PA) que se encontram ligados a um receptor na membrana celular, receptor u-PA (u-PAR). As principais MMPs ativadas pela plasmina são proMMP-1, proMMP-3, proMMP-7, proMMP-9, proMMP-10 e proMMP-13. Uma vez ativadas elas podem participar da ativação de outras MMPs (8). A atividade proteolítica das MMPs pode ser regulada em 3 níveis: pelo controle da expressão gênica (regulação da transcrição), ativação das pró-enzimas e inibição direta por inibidores teciduais de metaloproteinases

(TIMPs) ou outros inibidores como a α 2-macroglobulina (8).

ANEURISMA DE AORTA

Os aneurismas são dilatações circunscritas das artérias ou das câmaras cardíacas (10). A grande maioria dos aneurismas é encontrada na aorta, sendo os aneurismas aórticos caracterizados por progressiva dilatação da parede do vaso, envolvendo as três túnicas: média, íntima e adventícia, podendo evoluir para uma ruptura. Quanto à forma, os aneurismas podem ser saculares (com boca estreita) ou fusiformes (dilatação de toda a circunferência de um segmento). Todos parecem ser consequências da perda da resistência da parede. O processo inicia-se por alterações estruturais da camada média que resultam em redução da resistência do vaso, provocando alongamento e tortuosidade da parede e dilatação da luz (10). Esta perda da resistência é, sobretudo, devida a ação das metaloproteinases, podendo também ser ativada através da inativação da enzima α -1 antitripsina (11).

METALOPROTEINASES E O ANEURISMA DE AORTA

Não é inesperado que muitas modificações dos aneurismas atinjam a MEC, visto que o espaço extracelular que corresponde à maior parte da parede aórtica. Cada um dos três maiores componentes que ocupam este espaço desempenha um papel fisiológico relacionado à tensão arterial intermitente (pulsante) são eles: a. o colágeno dá sustentação mecânica (12) b. o sistema elástico proporciona a elasticidade (13) c. os grandes proteoglicanos, como o versican, respondem pela absorção das tensões sofridas durante a sístole, uma vez que estes funcionam com uma esponja diminuindo e aumentando seu volume (14).

Diversas metaloproteinases estão relacionadas com o desencadear do aneurisma de aorta, a seguir descreveremos as principais:

a) MMP-2 A MMP-2 é a enzima dominante na parede dos primeiros pequenos aneurismas (15). A superexpressão do gene para a MMP-2 pode ser importante na formação do aneurisma (16, 17). O gene da MMP-2 pode ser diferencialmente expresso podendo, portanto, ser responsável pela elastólise e degeneração aneurismática da aorta (17). Recente estudo relatou que os níveis de próteicos de MMP-2 e o mRNA foram significativamente maiores nos aneurismas de aorta que nos controles (18).

b) Relação entre a MMP-2 e MMP-9: A MMP-9 foi encontrada como a mais abundante proteinase elastolítica secretada por implantes de tecidos com aneurisma de aorta in vitro. Ela também está expressa ativamente em aneurismas por infiltração de macrófagos localizados nos danos dos tecidos in situ. Embora a MMP-2 seja a enzima elastolítica dominante na parede de pequenos aneurismas, a MMP-9 se torna proeminente com o aumento do tamanho do aneurisma (15). Isso também é apoiado por outros cientistas que encontraram um aumento estatisticamente significativo na atividade de MMP-9 no tecido com aneurisma, mas nenhum aumento na atividade da MMP-2 comprovando assim o aumento mais consistente (19).

c) Relação entre a MMP-3 e MMP-7: As MMP-3 e MMP-7 são capazes de degradar uma série de proteínas, como fibronectina, laminina, tenascina, bem como alguns tipos de colágeno, elas podem também ativar algumas pró-MMPs e principalmente clivar proteoglicanos (20).

Porém, o que chama a atenção é o fato da MMP-7 degradar o versican. A ação desta enzima sobre este proteoglicano parece ser muito mais eficiente que a exercida por outras MMPs também capazes de degradá-lo, como a MMP-3 e MMP-9. O versican é o principal proteoglicano presente na parede da aorta. Este proteoglicano é importante na integridade estrutural da parede da aorta e também na participação da regulação de muitos eventos biológicos. Sendo assim, pode-se inferir que uma alteração na estrutura física do versican esteja relacionada tanto com os aneurismas como as dissecções aórticas (21).

CONCLUSÃO

As metaloproteinases participam de uma variedade de eventos importantes para o organismo. Para garantir a integridade do tecido, é necessário um balanço dinâmico entre as MMPs e a atividade dos inibidores dessas enzimas, ou seja, os TIMPs, pois um descontrole na atividade de MMPs provoca uma excessiva degradação ou acumulação de elementos constitutivos da MEC, levando a um quadro patológico. É observado que este desequilíbrio entre a expressão gênica das metaloproteinases e a inibição enzimática está intimamente ligado aos aneurismas de aorta, sendo diversos tipos de metaloproteinases relacionadas com o desencadear desta afecção. Atualmente poucos estudos focam o real mecanismo de ação destas enzimas e de seus inibidores teciduais no desenvolver dos aneurismas de aorta. Portanto faz-se necessário a realização de mais investigações a respeito das metaloproteinases e de seus inibidores, no intuito de diminuir a morbi-mortalidade decorrente dos aneurismas de aorta em humanos.

SUMMARY

THE ROLE OF MATRIX METALLOPROTEINASES IN THE DEVELOPMENT OF AORTIC ANEURYSM

Pedro Pereira TENÓRIO; Marcos André Araújo DUQUE; Mônica Modesto ARAÚJO; Nicodemos Teles de Pontes FILHO e Mário Ribeiro de MELO-JÚNIOR

Objective: we conducted a literature review emphasizing the role of matrix metalloproteinases in the development of aortic aneurysm. **Method:** it was a structured survey of the literature on major scientific databases: Medline, Pubmed, Science Direct, using the following keywords: Metalloproteinases, aorta, aortic aneurysm. **Conclusion:** the matrix metalloproteinases participate in important physiological mechanisms, however, the papers suggest that increased expression of some types of metalloproteinases promote a trigger processes that lead to injury and damage to the aortic tissue, which contributes to the development of the aneurysm.

KEY WORDS: Metalloproteinases. Aorta. Aortic aneurysm.

REFERÊNCIAS

1. Visse, R; Nagase, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003, v. 92:827-39
2. Yong, VW et al. Elevation of matrix metalloproteinases (MMPs) in multiple sclerosis and impact of immunomodulators. *J. Neurol. Sci., Amsterdam.* 2007, v. 259, n. 1-2, p. 79-84
3. Lee, MH; Murphy, G. Matrix metalloproteinases at a glance. *J. Cell. Sci. London.* 2004, v. 117, n. 18, p. 4015-4016
4. Chen, W et al. Differential expression of matrix metalloproteinases and tissue-derived inhibitors of metalloproteinase in fetal and adult skins. *Int. J. Biochem Cell. Biol., Exeter* 2007, v. 39, n. 5, p. 997- 1005
5. Nagase, H; Visse, R; Murphy, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res., London.* 2006, v. 69, n. 3, p. 562-573
6. Folkesson M et al. Presence of NGAL/MMP-9 complexes in human abdominal aortic aneurysms. *Thromb Haemost.* 2007, v. 98: 427–433
7. Araújo, RVS et al. Metaloproteinases: Aspectos Fisiopatológicos Sistêmicos e sua Importância na Cicatrização. *R. Ci. md. biol., Salvador.* 2011, v.10, n.1, p.89-93
8. Thompson e Loftus, The role Of Matrix Metalloproteinases in Vascular Disease. *Vascular Medicine.* 2002, v. 7: 117-133
9. Birkedal-Hansen, H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J. Periodontol.* 1993, v. 64, p.474-484
10. Virmani, R; Burke, AP. Nonatherosclerotic diseases of the aorta and miscellaneous diseases of the mains pulmonary arteries and larges veins. In: SILVER MD, GOTLIEB AI, SCHOEN FJ, 3. Ed.. *Cardiovascular Pathology*, Churchill Livingstone, 107-137, 2001
11. Nollendorfs, A; Greiner, TC; Nagase, H; Baxter, BT: The expression and localization of membrane type-1 matrix metalloproteinase in human abdominal aortic aneurysms. *J. Vasc. Surg.* 2001, v. 34: 316–322
12. Hay, ED. Biogenesis and organization of extracellular matrix. *Faseb J.* 1999, Dec; 13 Suppl 2: S281-3
13. Jacob, MP. Élastine: préparation, caractérisation, structure, biosynthèse et catabolisme. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1993, v, 187(2): 166-80
14. Yanagishita, M. Function of the proteoglycans in the extracellular matrix. *Acta Pathol Jpn.* 1993 v, 7: 1208-1218
15. Freestone, T et al. Ammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995, v, 15: 1145–51
16. Goodall, S et al. Ubiquitous elevation of MMP-2 expression in the vasculature of patients with abdominal aneurysms. *Circulation.* 2001, v, 104: 304–309
17. Liapis e Parakevas. The pivotal role of matrix metalloproteinases in the development of human abdominal aortic aneurysms. *Vascular Medicine.* 2003, v, 8: 267-271
18. Davis, V; R, Persidskaia; L, Baca-Regen et al. Matrix metalloproteinase- 2 production and its binding to the matrix are increased in abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Throm Vasc Biol.* 1998, v, 18: 1625–33
19. Sakalihan, N; Delvenne, P; Nusgens, BV; Limet, R; Lapiere, CM. Activated forms of MMP2 and MMP9 in abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 1996, v, 24: 127–33
20. Hijova, E. Matrix Metalloproteinases: their biological functions and clinic implications. *Bratisl lek listy.* 2005, v, 3: 127-132

21. Halpert, I; Sires, UI; Roby, JD; Potter-Perigo, S; Wight, TN; Shapiro, SD; Welgus, HG; Wickline, SA; Parks, WC. Matrilysin is expressed by lipid-laden macrophages at sites of potential rupture in atherosclerotic lesions and localizes to areas of versican deposition, a proteoglycan substrate for the enzyme. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996, v, 93:9748-53

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Pedro Pereira Tenório

Universidade Federal de Pernambuco

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

ENDEREÇO: Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, Recife/PE

CEP:50670-901

Telefone: (81) 2126-8484

Email: pedrotenorio28@gmail.com

Recebido em 30.01.2012 – Aprovado em 05.12.2012

APÊNDICE D - Artigo Aceito pela Revista de Ciências Médicas e Biológicas da UFBA

Importance of anatomopathological analysis and histopathological examination for the diagnosis of suspected cases of syphilitic aneurysm

Pedro Pereira Tenório ^{1*}; Andréa Kedima Diniz Cavalcanti Tenório ²; Marcos André Araújo Duque ³; Mônica Modesto Araújo ⁴; Lenieé Campos Maia ⁵; Nicodemos Teles de Pontes Filho ⁶; Mário Ribeiro de Melo-Júnior ⁷.

¹ *Master Degree in Pathology, Assistant Professor at the Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF);* ² *Nurse, University Center ASCES-UNITA;* ³ *Master in Applied Biology to Health, Doctoral Student at the University Federal of Pernambuco (UFPE), Brazil;* ⁴ *Doctor, Resident in Pathology at the University Federal of Pernambuco (UFPE), Brazil;* ⁵ *Pathologist Doctor, Professor at the Federal University of Pernambuco (UFPE), Brazil;* ⁶ *PhD in Nutrition, Professor at the University Federal of Pernambuco (UFPE), Brazil;* ⁷ *PhD in Sciences Biological, Associate Professor at the University Federal of Pernambuco (UFPE), Brazil.*

ABSTRACT

Introduction: Syphilis is a sexually transmitted disease caused by mycobacterium *Treponema pallidum* in which in its tertiary stage can lead to an aortic syphilitic aneurysm. Currently, such cases are rare because of the effectiveness of antibiotic therapy. **Objective:** We aimed to carry out an anatomopathological analysis and histopathological examination of three cases potentially suspicious of aortic syphilitic aneurysm on human corpses. **Methods:** It was a descriptive study that 03 anatomic specimens of aortas from cadavers with ages ranging from 50 to 91 years obtained in Service checklist of deaths during the period from 2014 to 2015. We performed an anatomopathological and histopathological analysis with the use of special dyes. **Results:** Through the macroscopic evaluation it was observed in all cases a dilation corresponding to arch of aorta where the intima obtained an aspect of longitudinal striation, classic of syphilitic process. As for histopathological study on the tissues treatment with the staining batteries, it was demonstrated the presence of the dissecting hematoma in all cases, besides necrosis and absence characteristic of the inflammatory process. **Conclusion:** The anatomopathological and histopathological study are diagnostic tools that have specific characteristics and are directed to assist in preliminary diagnosis of suspected cases of aortic syphilitic aneurysm in necropsies. **Keywords:** Aorta. Aortic Aneurysm. cardiovascular syphilis.

INTRODUCTION

Syphilis is a sexually transmitted disease caused by the bacteria *Treponema pallidum*. If not treated, it can determine dermatological, neurological and cardiovascular manifestations [1]. Among the cardiovascular lesions, the syphilitic aortic aneurism is present in tertiary stage of syphilitic infection, being responsible for 5 to 10% of the causes of death of cardiovascular origin, becoming rare today after the advent of penicillin [1,2]. The cardiovascular impairment occurs in approximately 10% of patients with untreated syphilis, which can manifest itself in a period from 5 to 40 years after the initial infection, being the ascending aorta and the descending segment affected approximately 50% and 15% of the cases, respectively [1].

The main cardiovascular manifestations of the tertiary syphilis include, dilation of the aortic root, aneurysm formation, aortic insufficiency and ostial stenosis disease. In previous studies, the coronary ostial lesions were detected in 26% of patients with syphilitic aortitis [3]. The aortitis, an inflammatory response to the invasion of aortic wall by spirochetes, entails obliterating endarteritis of the *vasa vasorum* and results in necrosis of elastic fibers and connective tissue in the middle layer of the aorta artery. As a consequence of the aorta wall

weakening, there may be progression for late vascular syphilis manifestations [4].

In addition to the macroscopic study of anatomical pieces, several techniques are required in the laboratory of Pathology Anatomy, such as the use of special stainings batteries that aim at a more accurate assessment of specific and rare alterations which affect the aorta, such as syphilitic aneurysms [5,6].

METHODS

Place of experiment and Ethical Aspects

All tissue samples were only obtained after the consent of the responsible-legal by the corpse through the signing of the informed consent form (ICF). On the whole (n=3) corpses were necropsied from the Deaths Verification Office, organ of the Department of Health from the State of Pernambuco, located in the Department of Pathology from the University Federal of Pernambuco-UFPE, during the year 2014 to 2015. This research has approval from the Research Ethics Committee from the University Federal of Pernambuco, being approved under letter no. 133/2010.

Aortas Processing

After collection, the anatomical pieces were soaked in buffered formalin at 10%, in a final volume with approximately 20 times the volume of the material until the moment of histological processing in a period not inferior than 72 hours. In parallel, the detailed anatomopathological analysis was performed. In parallel, the intensity of atherosclerosis in macroscopy was assessed according to classification in mild, moderate or severe. The aortas were evaluated with the aid of a standardized scale from 0.0 to 12.0 cm, being considered mild from 0.1 to 4.0 cm, moderate to 4.1 to 7.0 cm and severe from 7.1 to 12.0 cm. The extension of atheromatous plaques was used as a reference for scoring the degree of involvement of the aortas studied [7].

Histochemical study

After the correct setting of tissue in 10% formalin, histological sections (4 µm) were obtained through horizontal microtome Yamato (Japan) and then mounted on histological slides previously identified, where they were subjected to staining batteries of Hematoxylin and eosin (HE) for histopathological general analysis, Masson trichrome (TM), for analysis of elastic and collagen fibers, in addition to the Periodic acid–Schiff (PAS), with the purpose to analyze the distribution of glycosaminoglycan, in one of the events [8].

Histopathological analysis

The histopathological analysis of the tissues stained was made by selecting 10 fields on each slide, where it was evaluated the inflammatory profile, focal points of necrosis, hemorrhage, attempted repair, distribution of glycosaminoglycan, through the characteristic patterns of each

dye that has been used in the procedure. The registration of images was performed through a system of capture with a camcorder camera connected to a microcomputer and in turn to an optical microscope.

CASE REPORT

First Case

Male cadaver, 80 years old, married, retired, dark-skinned and low educational level with a history of arterial hypertension and cardiopathy, six months had been presenting strong dyspnea, weight loss, weakness, cough, expectoration, constipation, localized pain in the legs and chest, and hemoptysis a day prior to death.

The macroscopical analysis of aortic artery showed a moderate atheromatous impairment, with presence of saccular aneurysm in the thoracic wall next to the arch where it is observed the presence of mural thrombus with longitudinal striation in the thoracic segment of the intima, as well as, cardiac alterations presented by ring aortic valve dilation and of the cardiac chambers. It was evident hematic crust in the middle layer in the thoracic segment and a collapse of the adventitia next to the implantation of the left ventricle leading the hemopericardium (Figures 1, 2 and 3).



Figure 1- Moderate Ateromatous Impairment



Figure 2- Presence of Wall Thrombus



Figure 3- Dissection and Hematology
Collection

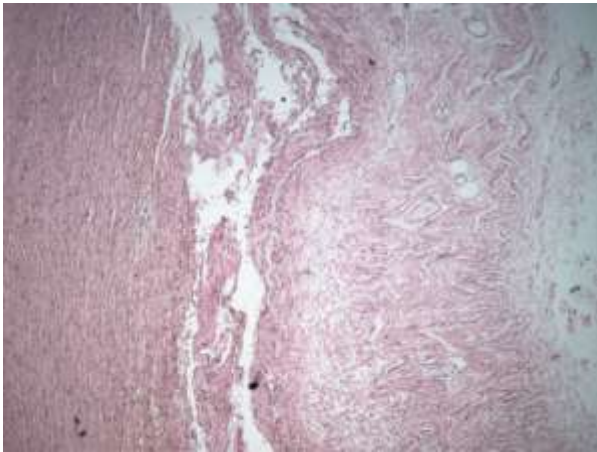


Figure 4- Syphilitic Aneurysm (H.E) 4X

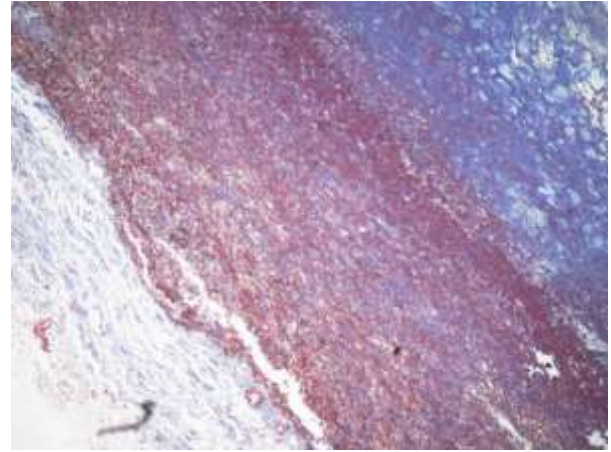


Figure 5- Syphilitic Aneurysm (T.M) 4X

The histopathological study was conducted by means of hematoxylin eosin (HE) and Masson trichrome (TM). Through HE staining, we observed an area of dissection, i.e., a separation of the intima and adventitia with hematoma formation in the medial layer of the vessel, was evident. The necrosis was present, however, it was not evidenced an inflammatory process. Whereas through the TM staining it was not observed in this case changes in the arrangement of collagen fibers and elastin (Figures 4 and 5).

Second case

Female cadaver, 50 years old, married, dark-skinned and low educational level, with a history of diabetes, hypertension and smoking, moments before the death was rescued with numbness in her legs, cough and pain. Through the macroscopic analysis of aorta, it was evidenced moderate atheromatous impairment, in addition to dissecting hematoma extending from the proximal segment until the abdominal aorta. It was also observed a dilation corresponding to the arch of the aorta where the intima acquired aspect of longitudinal striation, in addition to collapse of the adventitia near the area of implantation of the left ventricle resulting in hemopericardium (Figures 6, 7 and 8).



Figure 6- **Intense Ateromatous Commitment**



Figure 7- **Thrombosis Mural**



Figure 8- Dissecting Hematoma

For this case, the histopathological analysis was conducted with the HE, TM and PAS stainings, in which it was demonstrated dissection between the intima and adventitia of the aorta, with formation of a hematoma in the media layer of the artery. The necrosis was present in every segment, besides the absence of inflammatory process. Through the TM staining it was evidenced an intense disorganization of the collagen, in spiral of anomalous conformation. Upon the PAS (periodic acid - Schiff-) staining, it was not evidenced a significant change in the amount of glycosaminoglycan (Figures 9 and 10).

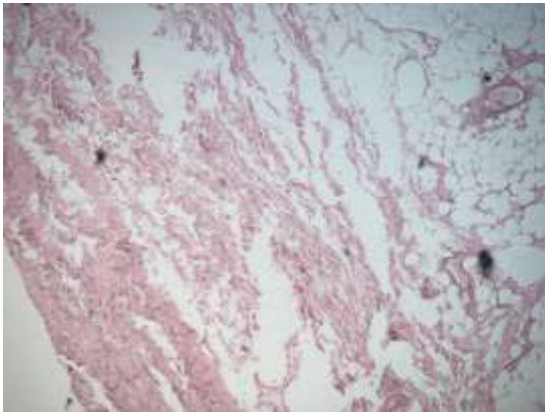


Figure 9- Syphilitic Aneurysm (H.E) 4X

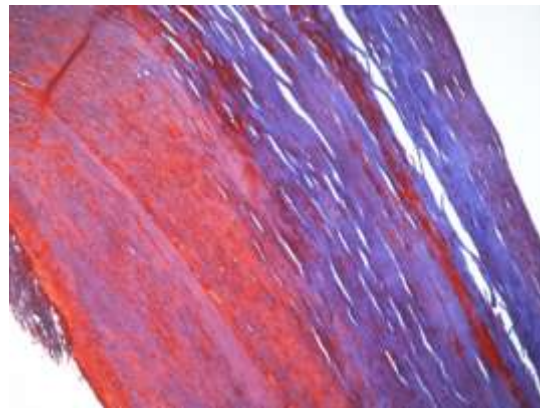


Figure 10- Syphilitic Aneurysm (T.M) 4x

Third case

Male cadaver, 91 years old, married, white, without educational level, with a history of hypertension, Smoking, drinking, loss of weight, cough and expectoration. Two weeks before death he had flu, cough and made use of antihypertensive drugs. At the macroscopic examination the aorta was intensely impaired by atheromatous process, and additionally it was perceived a dissecting hematoma involving its thoracic segment beyond an aneurismatic dilation with mural thrombosis superimposed on the segment of the arch (Figure 11 and 12).



Figure 11- Intense Atheromatous Process



Figure 12- Aneurysmal Dilatation

There was a marked hypertrophy of the left ventricle and a rupture of the adventitia near the area of implantation of the left ventricle that originated the hemopericardium. Through the histopathological analysis, by means of HE (Figure 13) and TM (Figure 14) stainings, it was evidenced dissection between the intima and adventitia, with formation of hematoma in the middle layer of the artery, in addition to necrosis in all its segment and absence of inflammatory process. Still regarding the TM staining it was not observed in the selected segment changes in the arrangement of collagen fibers and elastina.

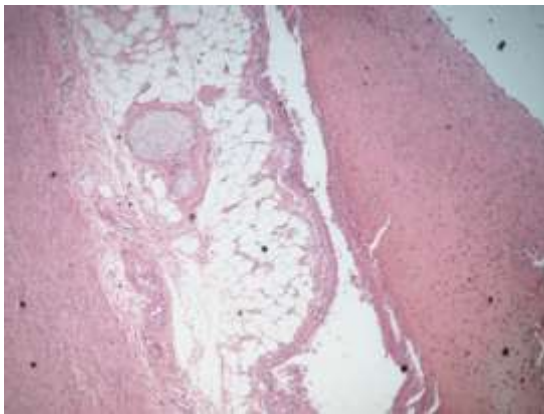


Figure 13- Syphilitic Aneurysm (H.E) 4X



Figure 14- Syphilitic Aneurysm (T.M) 4X

DISCUSSION

Syphilis is a sexually transmitted disease caused by the bacterium *Treponema pallidum*,

classified in stages I through IV, based on the clinical course and its stage [10]. The syphilitic aneurysm is characterized as a manifestation of tertiary syphilis and currently represents an extremely rare cause of aneurysms of the aorta [11]. Unlike other infectious aneurysms, this type affects the ascendant and thoracic parts, in addition to possessing very specific pathological and histopathological characteristics. Our study corroborates the work published by Robert, (2015) [9], in which it was revealed that the syphilitic aneurysm involves the ascendant portion of the aorta in all cases [9]. The mean age in our study was 74 years, and the males preponderant 2:1 in relation to females, a result that is also consistent with data from the literature in which there may be a manifestation in a period from 5 to 40 years after the initial infection [1].

There are epidemiological reports of a worldwide increase in the absolute number of cases of primary and secondary syphilis in the last decade, coinciding the worsening of the AIDS epidemic, bringing back the need for communitary investigation in the near future [12]. The predilection of spirochetes for small vessels of the *vasa vasorum*, leads to a chronic inflammation of adventitia particularly involving small arteries and arterioles that perfuse the median layer [11].

The *vasa vasorum* undergoes a process of Endarteritis Obliterans, necrosis of the middle layer mesoarteritis, and infiltrate of plasma cells. The elastic tissue is destroyed and replaced by a healing tissue. Such inflammatory process may continue for a long time, and it can be found until 25 years after the initial infection [13]. Rizas, (2009) [14] ratifies this inflammatory process, indicating that at the site of the injury one of the findings is the lymphoplasmocytic infiltrate. Contrary to reports in the literature, in all three possible cases of syphilitic aneurysm was not demonstrated an inflammatory process.

CONCLUSION

In our service of autopsy, we assessed 3 cases potentially suspicious of aortic syphilitic aneurysm. We verified that the characteristics identified in pathological histopathological assessments are important and indispensable in the preliminary diagnosis of syphilitic aneurysm in the routine of necropsies.

REFERENCES

- 1-Israel Nilton de Almeida Feitosa, Magda Dantas Leite Figueiredo, Lucia de Sousa Belem, Antônio Wilon Evelin Soares Filho. Rara apresentação de aneurisma sífilítico roto de aorta com pseudoaneurisma. Revista Portuguesa de Cardiologia, Volume 34, Issue 11, Pages 691.e1–691.e4, 2015.
- 2-Wei Li, Xiu-Jun Yin, Hua-Ying Liu and Rong Yang Syphilitic aortic aneurysm with a pulmonary lesion: a case report and literature view **SpringerPlus**, 5:1725, 2016.
- 3-Satyendra Tewari, Nagaraja Moorthy. Cardiovascular syphilis with coronary stenosis and aneurysm. Indian heart journal, 66: 735-736, 2014.

- 4-Braunwald E, Zipes D, Bonow R. Braunwald - **Tratado de doenças cardiovasculares**, 2 Volumes - 9^a Ed. p. 1458-65, 2013.
- 5-Ramalho, L.S. Análise Morfométrica de Mastócitos na Aorta de Pacientes Autopsiados. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2010.
- 6-Tenório, P. P. Aspectos anatomopatológicos, ultraestruturais e histoquímicos do aneurisma dissecante da artéria aorta humana. **Dissertação de Mestrado**, UFPE, 2012.
- 7-Ferraz, M.L.F. Avaliação Morfológica da Aterosclerose em Aortas de Pacientes Autopsiados. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, 2008.
- 8-Clark, G. Staining procedures, Williams & Wilkins, **Baltimore**, 1981.
- 9-Roberts WC, Barbin CM, Weissenborn MR, Ko JM, Henry AC. Am J Cardiol. Syphilis as a Cause of Thoracic Aortic Aneurysm, 15;116 (8):1298-303, 2015.
- 10-Buchacz K, Klausner JD, Kerndt PR, et al. HIV incidence among men diagnosed with early syphilis in Atlanta, San Francisco, and Los Angeles, 2004 to 2005. J Acquir Immune Defic Synd, 47: 234-40, 2008.
- 11-Stone, Bruneval, Angeline, et al. Consensus statement on surgical pathology of the aorta from the Society for Cardiovascular Pathology and the Association for European Cardiovascular Pathology: I. Inflammatory diseases. **Pathology Cardiovascular**, Sep-Oct; 24(5):267-78, 2015.
- 12-Shota Yasuda, Kiyotaka Imoto, Keiji Uchida, et al. Stent-graft Implantation for Clinically Diagnosed Syphilitic Aortic Aneurysm in an HIV-infected Patient Ann Thorac Cardiovasc Surg, 862–866, 2014
- 13-Roberto Santos Saraiva; Claudio Albernaz César, et al. Aortite sífilítica: diagnóstico e tratamento. Relato de caso. Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular, 25:3, 2010.
- 14-Rizas KD, Ippagunta N, Tilson MD, 3rd Immune cells and molecular mediators in the pathogenesis of the abdominal aortic aneurysm. Cardiol Rev, 17:201–210, 2009.
- ALBERGA, A. S. et al. Overweight and obese teenagers: why is adolescence a critical period?