

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GIULIO CESAR GEQUELIM

AVALIAÇÃO MORFOQUANTITATIVA DE FIBRAS COLÁGENAS, ELÁSTICAS E
CÉLULAS MUSCULARES LISAS AO LONGO DO PROCESSO DE
ENVELHECIMENTO DA PARTE DESCENDENTE DA ARTÉRIA AORTA
TORÁCICA DE RATOS *WISTAR*

CURITIBA

2018

GIULIO CESAR GEQUELIM

AVALIAÇÃO MORFOQUANTITATIVA DE FIBRAS COLÁGENAS, ELÁSTICAS E
CÉLULAS MUSCULARES LISAS AO LONGO DO PROCESSO DE
ENVELHECIMENTO DA PARTE DESCENDENTE DA ARTÉRIA AORTA
TORÁCICA DE RATOS *WISTAR*

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina
Interna pelo Programa de Pós-Graduação em
Medicina Interna do Departamento de Medicina
Interna, Setor de Ciências da Saúde da
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof Dr Ronaldo da Rocha Loures
Bueno

Co-orientador: Prof Gustavo Lenci Marques

Co-orientadora: Profª Drª Djanira Aparecida da Luz
Veronez

CURITIBA

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE, BIBLIOTECÁRIA: RAQUEL PINHEIRO COSTA
JORDÃO CRB 9/991 COM OS DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

G353 Gequelim, Giulio Cesar

Avaliação morfoquantitativa de fibras colágenas, elásticas e células musculares lisas ao longo do processo de envelhecimento da parte descendente da artéria aorta torácica de ratos *wistar* / Giulio Cesar Gequelim. – Curitiba, 2018.

51 f. il.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo da Rocha Loures Bueno.

Coorientador: Prof. Gustavo Lenci Marques

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Djanira Aparecida da Luz Veronez
Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

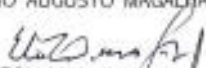
1. Envelhecimento. 2. Aorta torácica. 3. Músculo liso vascular.
4. Tecido elástico. 5. Colágeno. I. Bueno, Ronaldo da Rocha Loures.
II. Marques, Gustavo Lenci. III. Veronez, Djanira Aparecida da Luz.
IV. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

NLMC: WT 104

PARECER

Aos vinte e dois dias do mês de março do ano de dois mil e dezoito, a banca examinadora constituída pelos Professores: Dr. Tiago Augusto Magalhães (InCor/HCFMUSP), Dr. Emilton Lima Junior (Depto. de Clínica Médica/UFPR) e Dr. Ronaldo da Rocha Loures Bueno (Depto. de Clínica Médica/UFPR e orientador), exarou o presente parecer sobre a dissertação de mestrado elaborado por GULIO CESAR GEQUEUM, aluno concluinte do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna – Mestrado e Doutorado da Universidade Federal do Paraná, intitulada: "AVALIAÇÃO MORFOQUANTITATIVA DE FIBRAS COLÁGENAS, ELÁSTICAS E CÉLULAS MUSCULARES LISAS AO LONGO DO PROCESSO DE ENVELHECIMENTO DA PARTE DESCENDENTE DA ARTÉRIA AORTA TORÁCICA DE RATOS WISTAR". A Banca examinadora considerou que o aluno apresentou trabalho adequado para dissertação, e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas de modo a merecer a sua **aprovação**, sendo recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de **Mestre em Medicina Interna e Ciências da Saúde**. A banca considerou o trabalho de grande relevância à Saúde Pública, e recomendam a publicação de artigo em revista técnico-científica com corpo editorial depois de incorporadas às sugestões apresentadas no decurso das arguições, cumpridas outras exigências previstas em normativas da pós-graduação.


TIAGO AUGUSTO MAGALHÃES


EMILTON LIMA JUNIOR


RONALDO DA ROCHA LOURES BUENO

Dedico este trabalho à memória de Walden Thoreau e à divulgação do conhecimento da sua vida, obra e pensamento.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof Dr Ronaldo da Rocha Loures Bueno pela orientação no trabalho.

Aos co-orientadores Prof Dr Gustavo Lenci Marques e Prof^a Dr^a Djanira Aparecida da Luz Veronez, e ao Prof Dr Rogério de Fraga, por confiarem a mim o material de pesquisa e me darem a capacitação e o suporte para estudá-lo.

Ao Biotério do Hospital Angelina Caron pelo cuidado com os animais durante o período do estudo.

Ao Prof Dr Emilton Lima Junior, do Departamento de Clínica Médica da Universidade Federal do Paraná, pelas discussões e amizade, e por fazer parte da banca interna.

Ao Dr Tiago Augusto Magalhães pesquisador colaborador no Instituto do Coração (InCor/HC-FMUSP), pela amizade e por fazer parte da banca externa.

Ao Laboratório de Microscopia Confocal Multifotônica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná pelo processo de escaneamento das lâminas.

A Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Medicina Interna por apoiar a realização deste trabalho.

RESUMO

Alterações relacionadas à idade envolvendo as células e a matriz extracelular da camada média da aorta estão ligadas a vários processos fisiológicos e patológicos observados no envelhecimento. Este estudo teve como objetivo avaliar e descrever quantitativamente as mudanças histológicas que ocorrem no processo de envelhecimento aórtico normal, mediante a mensuração da espessura da camada média da aorta torácica, número de células musculares lisas, e concentração de fibras colágenas e elásticas, em diferentes grupos etários, em um modelo experimental com ratos. Os animais do estudo (n=60) foram separados em cinco grupos de 12, alocados para diferentes tempos de vida (3, 6, 9, 18 e 24 meses), e ao final os animais passaram por eutanásia, sendo um segmento do primeiro centímetro da aorta descendente coletado e preparado para análise histológica com as colorações hematoxilina & eosina, tricrômico de Masson e Weigert. Imagens teciduais foram escaneadas, e campos aleatórios foram analisados por computador para medir a espessura da camada média, contar as células musculares lisas por campo, e quantificar as fibras elásticas e colágenas como proporção da área dos campos ocupadas por tais componentes. Como resultados: os grupos etários mais idosos demonstraram, espessura aumentada da camada média e contagem diminuída das células musculares lisas por campo, além de diminuição da proporção de fibras elásticas por campo. Tanto a redução da contagem de células musculares lisas quanto a da concentração de fibras elásticas tiveram significância estatística a partir do nono mês, e prosseguiram com o tempo. Notou-se uma tendência de aumento da proporção de fibras colágenas, sem atingir a significância estatística. Finalmente, com o envelhecimento, ocorre um aumento da matriz extracelular da camada média da aorta descendente, levando ao espessamento da mesma. Este espessamento deve-se ao conteúdo de colágeno, e esse processo resulta na diminuição da concentração de fibras elásticas e do número de células musculares lisas. Estas análises replicam achados de estudos prévios, de importantes implicações fisiológicas e patológicas em fenômenos vasculares e hemodinâmicos relacionados ao envelhecimento.

Palavras-chave: envelhecimento, aorta torácica, camada média, espessura, músculo liso vascular, fibras elásticas, colágeno vascular.

ABSTRACT

Age-related alterations involving aortic media layer's cells and extracellular matrix are linked to several physiological and pathological processes observed with aging. This study aimed to assess and quantitatively describe histological changes in normal aortic aging process through measurement of thoracic aorta's media layer thickness, media layer smooth muscle cell count, collagen and elastic fibers concentration, across different ages, in an experimental rat model. Study animals (n=60) were separated in five groups of 12, each ascribed a different lifetime (3, 6, 9, 18 and 24 months, respectively), at the completion of which animals underwent euthanasia and a segment of descending aorta's first centimeter was harvested and prepared for histological analysis with hematoxylin & eosin, Masson's trichrome and Weigert's stains. Tissue images were scanned and random fields underwent software analysis to measure media layer thickness, count smooth muscle cells per field and quantify elastic fibers and collagen, each of these expressed as the proportion of the fields' area occupied by these components. Results were as follows: older age groups exhibited, as compared to the younger, increased media layer thickness and decreased smooth muscle cell counts per field and decreased elastic fiber proportion per field. Both reductions on smooth muscle cell count and elastic fiber concentration were noted with statistical significance since month 9 and evolved thereafter. Collagen fibers showed a tendency to increase, without reaching statistical significance. In conclusion, with aging, descending aorta media layer extracellular matrix increases, leading to layer thickening. This increase is driven by the collagen content, and this process results in decreased elastic fiber concentration and smooth muscle cell count. These results have replicated findings from previous researches, and such findings have important physiologic and pathologic implications on age-related vascular and hemodynamic phenomena.

Key-words: aging, thoracic aorta, media layer, thickness, vascular smooth muscle cells, elastic fibers, vascular collagen.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- PEÇAS EXTRAÍDAS EM UMA BANCADA	24
FIGURA 2 - AORTA EM MEIO DE BOUIN, LOGO APÓS EXTRAÇÃO	25
FIGURA 3 - LÂMINAS CORADAS EM TRICRÔMIO DE MASSON, WEIGERT E HE.....	26
FIGURA 4 - LÂMINA CORADA EM HE SUBMETIDA A ANÁLISE MORFOQUANTITATIVA NO PROGRAMA IMAGE-PRO PLUS	27
FIGURA 5 - LÂMINA COM COLOCAÇÃO DE WEIGERT E ÁREA DE INTERESSE A SER EXAMINADA.....	28
FIGURA 6 - DEFINIÇÃO DA FAIXA DE CORES QUE REPRESENTAM AS FIBRAS ELÁSTICAS NO DIAGRAMA HSI.....	29
FIGURA 7 - COMANDO DE CONTAR OS OBJETOS DA FAIXA DE CORES PRÉ-DEFINIDA QUE CAEM NA ÁREA DE INTERESSE	30
FIGURA 8 – ESTATÍSTICAS DA CONTAGEM	31

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - NÚMERO DE ANIMAIS (N) POR GRUPO E TEMPO DE VIDA.....23

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	- analysis of variance (análise de variância)
HE	- Hematoxilina & eosina
LSD	- Least significance difference (diferença de menor significância)
mo	- months (meses)
SMC	- smooth muscle cell (célula muscular lisa).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 O PAPEL DAS FIBRAS ELÁSTICAS NA BIOMECÂNICA DA AORTA	17
2.2 O ENRIJECIMENTO DA AORTA NO ENVELHECIMENTO E SUA IMPLICAÇÃO PATOLÓGICA	18
2.3 AS ALTERAÇÕES NAS FIBRAS ELÁSTICAS E MÚSCULO LISO DA CAMADA MÉDIA DA AORTA QUE OCORREM AO LONGO DO PROCESSO DE ENVELHECIMENTO E LEVAM AO ENRIJECIMENTO DA AORTA	18
2.4 AS FIBRAS ELÁSTICAS PODEM ESTAR ENVOLVIDAS NA REGULAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS NA CAMADA MÉDIA DA AORTA	21
3 HIPÓTESE E IMPORTÂNCIA DO ESTUDO	22
4 OBJETIVOS	23
4.1. OBJETIVO GERAL	23
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
5 MATERIAIS E MÉTODOS	24
5.1 DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO EXPERIMENTAL	24
5.2 METODOLOGIA DA ANÁLISE MORFOMÉTRICA E MORFOQUANTITATIVA	25
5.2.1 <i>PREPARAÇÃO DO MATERIAL</i>	25
5.2.2 <i>COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA & EOSINA (HE)</i>	26
5.2.3 <i>COLORAÇÃO DE TRICRÔMICO DE MASSON</i>	27
5.2.4 <i>COLORAÇÃO DE WEIGERT</i>	28
5.2.5 <i>TÉCNICA DAS ANÁLISES MORFOMÉTRICA E MORFOQUANTITATIVA</i>	29
5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
7 CONSIDERAÇÕES GERAIS	42
8 CONCLUSÕES.....	43
REFERÊNCIAS.....	44
APÊNDICE I - DADOS BIOMÉTRICOS DOS ANIMAIS DE TODOS OS GRUPOS.	50
APÊNDICE II – ACEITE PARA PUBLICAÇÃO DOS RESULTADOS DO ESTUDO EM REVISTA CIENTÍFICA	51

1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento é um processo biológico complexo, resultante de um acúmulo de transformações que culminam em quebra progressiva dos mecanismos de homeostase e perda de função celular (CHIAO e RABINOVITCH, 2015). Tal processo é intensamente estudado, pois a sua compreensão é necessária para lançar bases teóricas que possam fundamentar o desenvolvimento de estratégias para reduzir o impacto das doenças características do fim da vida (GEMS, 2015). Destas, destacam-se as doenças cardiovasculares, que continuam a ser uma das principais causas de mortalidade e incapacidade em todas as regiões do mundo (ROTH, JOHNSON e ABAJOBIR, 2017).

Do ponto de vista da biologia celular e molecular, já foram caracterizados vários processos relacionados ao envelhecimento, como a instabilidade genômica, alterações epigenéticas, senescência celular, metabolismo desregulado, exaustão das células-tronco, perda da proteostase e disfunção mitocondrial (RUAN, ZHANG e LI, 2018).

No sistema cardiovascular, o impacto do envelhecimento se dá não apenas pelo acúmulo de fatores de risco para doenças cardiovasculares que ocorre, mas também por um efeito direto da idade no coração e nos vasos sanguíneos (IZZU et al., 2018).

A parede arterial é composta por três camadas concêntricas: íntima, média e adventícia, o envelhecimento da parede arterial ocasiona alterações nas camadas íntima e média (IZZU et al., 2018). Na estrutura da camada íntima estrutural, observa-se um espessamento funcional devido a disfunção endotelial e microvascular. Esta disfunção caracteriza-se pela diminuição da vasodilatação mediada pelo endotélio, que é mediada pelo óxido nítrico, molécula que apresenta menor biodisponibilidade em idosos (LAKATTA e LEVY, 2003). Na camada média, também ocorre espessamento, assim como alterações na celularidade e na composição da matriz extracelular, além de outros fenômenos como a ocorrência de calcificações, senescência das células musculares lisas e aumento do estresse oxidativo (LYLE e RAAZ, 2017). O efeito dessas alterações é o aumento da rigidez da parede arterial (LAKATTA e LEVY, 2003).

O aumento da rigidez arterial com o envelhecimento foi demonstrado não apenas em modelos experimentais com animais (HAIDET et al., 1996), mas também *in vivo* no ser humano, por meio de técnicas não invasivas de mensuração da rigidez

arterial, das quais a principal é a medida da velocidade da onda de pulso (ZHANG et al., 2014). O aumento da rigidez da parede arterial leva a alterações hemodinâmicas tais como a alteração do acoplamento ventrículo-arterial e a perda do efeito *Windkessel* (LYLE e RAAZ, 2017). O efeito *Windkessel* resulta da elasticidade da raiz aórtica, e consiste na acomodação de parte do volume sistólico durante a sístole, e impulsão deste volume na diástole movido pela retração elástica da raiz aórtica, sendo esse efeito responsável por diminuir as oscilações de fluxo e pressão entre sístole e diástole na vasculatura distal (MEI, ZHANG e JING, 2018). Tais alterações hemodinâmicas resultam em efeitos como: hipertensão sistólica isolada, declínio cognitivo e acidentes vasculares cerebrais, insuficiência cardíaca, doença renal crônica e formação de aneurismas (LYLE e RAAZ, 2017).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O PAPEL DAS FIBRAS ELÁSTICAS NA BIOMECÂNICA DA AORTA

As lamelas elásticas são compostas por uma massa de fibras elásticas interligadas. Essas fibras se organizam incorporando-se a uma matriz de fibrilas de fibrilina previamente secretada na matriz extracelular. Tanto estas quanto aquelas são produzidas pelos fibroblastos e células musculares lisas. As fibras elásticas dispõem-se em mola, graças à sua composição, formada de aminoácidos glicina, prolina e lisina, sendo que os últimos frequentemente ocorrem em pares, e se oxidam formando um grupo aldeído entre si. As interligações entre as fibras elásticas se dão através de ligações covalentes entre estes resíduos de prolina oxidados, formando anéis de desmosina e isodesmosina (MESCHER, 2013a).

A aorta e as demais artérias elásticas são compostas por três camadas concêntricas (MESCHER, 2013b):

- I. íntima ou interna, composta por uma camada de células endoteliais, uma camada de tecido conjuntivo subendotelial contendo células musculares lisas e uma camada de fibras elásticas dispostas circunferencialmente, chamada de lâmina interna;
- II. a média, composta por lamelas de fibras elásticas e camadas de células musculares lisas, todas dispostas longitudinalmente, além de colágeno;
- III. adventícia, composta por colágeno do tipo I e fibras elásticas, e contendo fibroblastos.

As artérias elásticas caracterizam-se por uma camada média proeminente, à custa do alto conteúdo de fibras elásticas. Tais fibras dispõem-se em lamelas, que são folhas fenestradas. Este alto conteúdo de fibras elásticas serve à função de manter um fluxo anterógrado contínuo de sangue através das artérias: durante a sístole, parte da energia do sangue ejetado na aorta ascendente é convertida em energia elástica pela distensão da artéria; durante a diástole, o recolhimento elástico das fibras elásticas presentes na parede da artéria converte-se em energia cinética que mantém o fluxo de sangue durante essa fase (MESCHER, 2013b).

2.2 O ENRIJECIMENTO DA AORTA NO ENVELHECIMENTO E SUA IMPLICAÇÃO PATOLÓGICA

A parede arterial analisada como um todo apresenta um padrão não linear de relação estresse-estiramento, sendo que o módulo elástico da parede apresenta um padrão incremental à medida que se aplica mais estresse a ela (KOHN, LAMPI e REINHART-KING, 2015). Isso ocorre porque nos níveis baixos de distensão essa mecânica é dominada pelas fibras elásticas, mais complacentes, enquanto nos níveis mais altos ocorre recrutamento das fibras colágenas, mais rígidas (KOHN LAMPI e REICHART-KING, 2015).

À luz das alterações das fibras de elastinas descritas anteriormente, do já citado fato de aumento de conteúdo de colágeno na parede arterial com a idade, e também do aumento do fato de produtos finais de glicosilação avançada presentes nas fibras colágenas fazerem *crosslinking* não enzimático entre si em número crescente com o avançar da idade, conferindo maior rigidez à estrutura (ARONSON, 2003), acredita-se que a aorta apresente aumento progressivo da rigidez com o envelhecimento.

Esse enrijecimento, mais comumente avaliado pelo método de medida da velocidade da onda de pulso, que aumenta com a rigidez do vaso (BENETOS et al., 2002), de fato ocorre, principalmente após os 55 anos (BENETOS et al., 2002). O enrijecimento da aorta relacionado à idade está relacionado à hipertensão arterial (KAESS et al., 2012), principalmente ao aumento da pressão arterial sistólica e da pressão de pulso (WEISBROD, SHIANG e SAYAH, 2013), e está relacionado à aterogênese (RUDJANTO, 2007) a aumento da morbimortalidade cardiovascular (LAURENT et al., 2001).

2.3 AS ALTERAÇÕES NAS FIBRAS ELÁSTICAS E MÚSCULO LISO DA CAMADA MÉDIA DA AORTA QUE OCORREM AO LONGO DO PROCESSO DE ENVELHECIMENTO E LEVAM AO ENRIJECIMENTO DA AORTA

Sabe-se que a taxa de síntese de elastina na parede arterial humana é desprezível após o período neonatal (GODFREY et al., 1993), por isso as lamelas elásticas do indivíduo estão expostas por toda a vida aos fatores associados ao processo de envelhecimento. São descritas várias alterações das fibras elásticas da aorta humana no decorrer de tal processo. Demonstrou-se, inicialmente, que a

concentração de fibras elásticas nas camadas íntima e média da aorta torácica humana cai com a idade, sem que o conteúdo total de fibras elásticas caia (SPINA et al., 1983); esse processo se explica pela deposição de colágeno que ocorre entre as lamelas de elastina (SPINA et al., 1983). Deve-se levar em conta que este estudo quantificou a elastina presente nas lamelas elásticas da parede arterial, e os seus achados devem ser interpretados à luz dos seguintes fatos posteriormente observados: mais de 30% do conteúdo de elastina da parede arterial da aorta humana está organizado na forma de fibras interlamelares (O'CONNELL et al., 2008), e FRITZE et al. (2012) demonstraram que com o envelhecimento ocorre um progressivo aumento das distâncias interlamelares às custas da deposição de proteoglicanos entre as lamelas, observando substituição praticamente total da elastina nessa região.

Posteriormente, WATANABE et al. (1996) demonstrou uma diminuição progressiva do conteúdo de desmosina e isodesmosina, quantificados por radioimunoensaio, em hidrolisados de elastina extraídos da parede de aorta torácica humana com o aumento da idade, refletindo uma diminuição da quantidade de *crosslinks* entre as fibras elásticas, processo que levaria à perda de elasticidade da fibra. É digno de nota que FRITZE et al. (2012) repetiram a quantificação de desmosina por radioimunoensaio utilizando o mesmo método de Watanabe, sem encontrar redução do conteúdo de desmosina com a idade.

Além disso, acredita-se que a reação glico-oxidativa (também chamada de Maillard), que ocorre nas estruturas proteicas, principalmente aquelas com baixo *turnover*, ao longo do envelhecimento, fato que já foi demonstrado nas fibras colágenas da parede arterial, ocorra também nas fibras elásticas (SAWABE et al., 2010). Esta hipótese é suportada pelos achados de KONOVA et al. (2004) que demonstraram um aumento progressivo com a idade de produtos finais da glicosilação avançada na elastina da aorta torácica humana.

Postula-se, também, que ocorra progressiva fragmentação das fibras elásticas com o envelhecimento, fato que se explicaria por dois mecanismos: a fadiga mecânica da fibra, submetida a sucessivos ciclos de distensão e relaxamento, e o aumento da atividade das metaloproteinases da matriz (MMPs) (GREENWALD, 2007). Esse último mecanismo estaria ligado a um desbalanço que ocorre no envelhecimento entre a presença de MMPs e dos seus inibidores (FRITZE et al., 2012), além de um possível aumento da atividade das MMPs associado à calcificação das fibras elásticas. A calcificação das fibras elásticas é um dado observado não apenas no processo de

aterosclerose, mas também no envelhecimento tido como normal, e recebe o nome de elastocalcinose (BIELAK et al., 2004). Ainda quanto à cumulativa fragmentação das fibras elásticas com o envelhecimento, em nossa revisão da literatura e nas demais revisões que consultamos, encontramos um único estudo original (TODA et al., 1980), que observou essa fragmentação em análise morfométrica com microscopia eletrônica da parede da aorta torácica humana coletada em diferentes idades. Após esse estudo, encontramos um único estudo, realizado com animais de espécies diferentes, cada uma com uma frequência cardíaca basal, que demonstrou uma associação entre o número de batimentos cardíacos calculado para o animal até o momento do seu sacrifício à desorganização interna das fibras de elastina (AVOLIO, JONES e RAFAZZOLI-SHADPOUR, 1998). Este é o único estudo que conhecemos que testou *in vivo* a hipótese da fadiga mecânica das fibras. A desorganização das fibras foi quantificada por um método de dimensionamento fractal desenvolvido previamente pelos próprios autores para esse fim. Outros estudos utilizaram a dimensão fractal para quantificar a desorganização das proteínas da matriz extracelular (CHOW et al., 2014).

As alterações descritas acima vêm ao encontro do fato de se observar progressivo aumento da rigidez da aorta com a idade, sobre o qual discorreremos abaixo. A perda de estrutura das fibras elásticas levaria à perda da sua elasticidade, com consequente maior transmissão das forças ao colágeno arterial, estrutura mais rígida, elevando, assim, o módulo elástico de toda a parede arterial. (TSAMIS, KRAWIEC e VORP, 2013).

Há que se notar que, embora o aumento da rigidez da aorta seja tradicionalmente associado a alterações da matriz extracelular da parede arterial, um estudo *in vitro* demonstrou que células musculares lisas extraídas da parede vascular de aortas de macacos idosos têm módulo elástico maior do que aquelas extraídas de macacos jovens, o que se observou tanto nas células isoladamente quanto em um modelo de tecido no qual elas foram incluídas (QIU, ZHU e SUN, 2010). Tal diferença não permaneceu após a dissolução do citoesqueleto de actina (QIU, ZHU e SUN, 2010). Esse estudo dá suporte à hipótese de que alterações nas células musculares lisas também contribuem em algum grau para o enrijecimento da parede aórtica com o envelhecimento.

2.4. AS FIBRAS ELÁSTICAS PODEM ESTAR ENVOLVIDAS NA REGULAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS NA CAMADA MÉDIA DA AORTA

Em um artigo de revisão, LANNOY, SLOVE e JACOB (2014) pontuam alguns fatos interessantes: LI et al., 1998, demonstraram que ratos com deleção de ambos os alelos do gene da elastina *ELN*^{-/-} apresentam proliferação das células musculares lisas da parede arterial, que culmina na obliteração da aorta ascendente e é incompatível com a vida. WAGENSEIL et al. (2010) além de repetir esse achado em ratos, estudaram também o desenvolvimento de ratos hemizigóticos para o gene da elastina *ELN*^{+/-}, encontrando diminuição do conteúdo de elastina, proliferação de células musculares lisas e aumento da resistência vascular também nesses ratos, embora em menor gravidade. Em humanos, a deleção de um dos genes da elastina é a causa da estenose aórtica supravalvar (LI et al., 1997), doença que ocorre isoladamente ou como parte da síndrome de Williams-Beuren, e se caracteriza pela proliferação de células musculares lisas na parede arterial da aorta ascendente. Importaneamente, KARNIK et al. (2003) isolaram as células musculares lisas, hiperproliferativas, de ratos *ELN*^{-/-}, e as expuseram *in vitro* à tropoelastina. A adição da proteína inibiu a proliferação das células, além de regular alguns sinais de migração celular e induzir a organização das fibras de actina.

Analisando estes achados em uma revisão, LANNOY, SLOVE e JACOB (2014) sugerem que a elastina tem uma ação parácrina na parede arterial, controlando a proliferação das células musculares lisas. Na mesma revisão, o autor propõe o mecanismo para isso, citando os trabalhos que demonstraram que há numerosos domínios nas fibrilas de fibrilina que servem como sítios de ligação covalente para as proteínas ligadoras do fator de crescimento transformador beta (TGF- β) (HORIGUCHI, OTA e RIFKIN, 2012). Tais fibrilas, mediante interações com outras proteínas, portanto, regulariam a disponibilidade local do TGF- β , aumentando ou diminuindo a ativação da proliferação das células musculares lisas por esse fator (LANNOY, SLOVE e JACOB, 2014).

3. HIPÓTESE E IMPORTÂNCIA DO ESTUDO

Há grande interesse científico na compreensão do processo de envelhecimento para estabelecer estratégias de prevenção e promoção da saúde (SANTOS FILHO et al., 2006).

Como o aumento de idosos na população mundial é um fenômeno crescente, todos os processos relacionados ao envelhecimento necessitam ser cada vez mais estudados, assim como as ações relativas à promoção de saúde e prevenção de doenças.

Segundo dados obtidos no DATASUS (2018), as doenças cardiovasculares são a principal causa de morbi-mortalidade no Brasil, fato que ocorre após a nossa transição demográfica e envelhecimento populacional.

Em virtude destas alterações, o presente estudo busca descrever alguns pontos importantes relativos às alterações histológicas que ocorrem na vasculatura em processo de envelhecimento, delimitando também o momento em que ocorrem e o caráter progressivo ou não.

O presente trabalho é um estudo histológico do envelhecimento vascular, obtendo daí certas variáveis quantitativas citadas a seguir, e se presta a testar a interação de tais variáveis com a variável independente idade. O resultado é um retrato histológico do envelhecimento vascular em um modelo experimental com ratos *Wistar*.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Realizar uma avaliação morfoquantitativa de fibras elásticas, colágenas e musculares lisas e da espessura da parte descendente da artéria aorta torácica de ratos *Wistar* ao longo do processo de envelhecimento.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o conteúdo de fibras elásticas na camada média da parede da parte descendente da artéria aorta torácica ao longo do processo de envelhecimento.
- Quantificar as fibras colágenas da camada média da parede da parte descendente da artéria aorta torácica ao longo do processo de envelhecimento.
- Investigar a ocorrência de hiperplasia (aumento do número de células) das fibras musculares lisas nas camadas íntima e média da aorta torácica ao longo do processo de envelhecimento.
- Desenvolver um estudo morfométrico da espessura da parede da parte descendente da artéria aorta torácica.
- Correlacionar temporalmente as alterações morfológicas da parte descendente da artéria aorta torácica no processo natural do envelhecimento.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Realizou-se uma análise morfométrica do diâmetro e da espessura da parede da parte descendente da artéria aorta torácica de ratos sacrificados em diferentes idades, bem como análise morfoquantitativa das fibras elásticas, colágenas e musculares lisas da mesma.

5.1. DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 60 ratos albinos da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia, Mammalia), do sexo masculino, mantidos em gaiolas com as mesmas condições ambientais, ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo água e ração padrão *ad libitum* durante todo o período do experimento. Os animais foram separados em 6 grupos, mantidos todos nas mesmas condições, e sacrificados em diferentes tempos de vida, sendo a única variável a diferir entre os grupos o tempo de vida (TABELA 1).

Grupo	n	Idade
1	12	3 meses
2	12	6 meses
3	12	9 meses
4	12	18 meses
5	12	24 meses

Tabela 1: Número de animais (n) por grupo e tempo de vida.

Os animais foram pesados em balança de precisão semi-analítica (Shimadzu®, BL220S) e medidos com régua milimetrada. Foram então destinados à eutanásia com perfusão sob anestesia com a solução de Cetamina a 10% e Xilazina a 2% diluídas em solução salina para obter a solução final a 300 mg de Cetamina e 30 mg de Xilazina por ml, com aplicação de 1 ml / 1000 g de peso vivo, via intraperitoneal. Posteriormente, os animais foram dissecados para remoção das artérias aortas para estudo morfológico, morfométrico e estereológico.

5.2 METODOLOGIA DA ANÁLISE MORFOMÉTRICA E MORFOQUANTITATIVA

5.2.1 PREPARAÇÃO DO MATERIAL

Após a eutanásia, dissecação e remoção das artérias aortas, foi seccionado um segmento de 1 cm da parte descendente da artéria aorta torácica, iniciando-se imediatamente ao final do arco aórtico. Esses segmentos foram pesados em balança de precisão semi-analítica (Shimadzu®, BL220S) e suas dimensões determinadas através de paquímetro digital Digimess® (FIGURA 1).

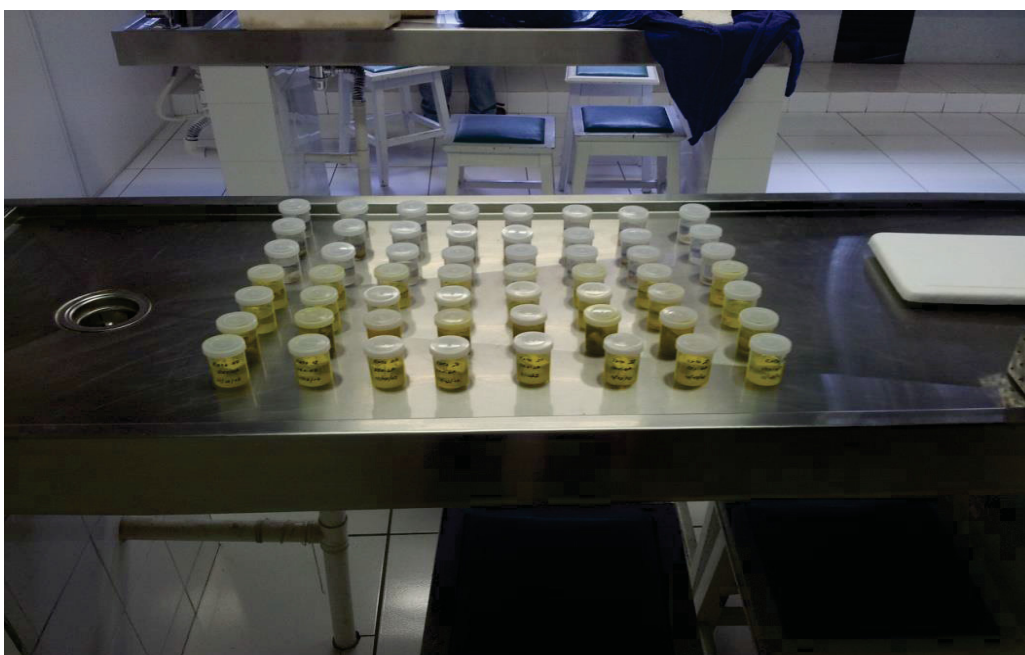


Figura 1- Peças extraídas em uma bancada.

Em seguida, as artérias foram submersas e fixadas em solução de Bouin (ácido picríco, formaldeído a 40% e ácido acético) por 18 horas (FIGURA 2).

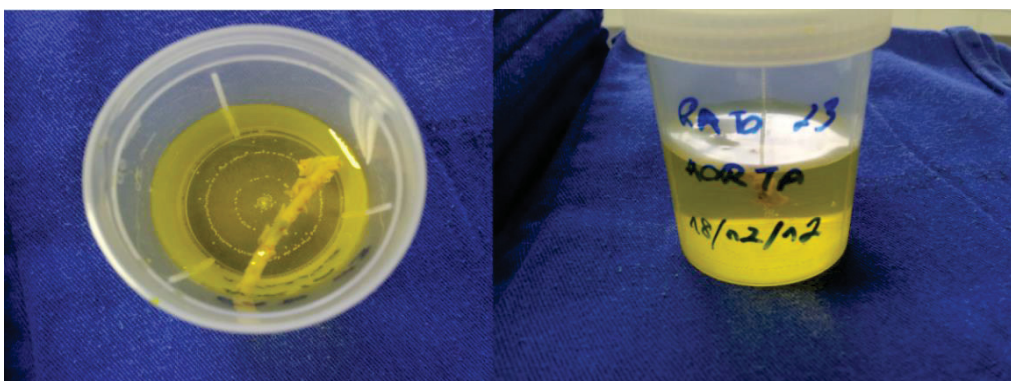


Figura 2 - Aorta em meio de Bouin, logo após extração.

Após a fixação, as aortas permaneceram em álcool 70% e em seguida esse material foi desidratado em uma série decrescente de xilol e álcool (solução de xilol 1, solução de xilol 2, solução de álcool etílico absoluto e xilol, álcool absoluto 1,2 e 3, álcool 95%, álcool 90%, álcool 80%, álcool 70%, água corrente, água destilada; 1 a 2 horas em cada solução).

Após essa etapa, as aortas foram incluídas em paraplast e emblocados para serem submetidas aos cortes sucessivos em micrótomo com 5 µm de espessura (American Optical®, Spencer AO 820).

Para obtermos cortes aleatórios e uniformemente isotrópicos (cortes AUI) utilizou-se o método do Orientator. Os cortes foram obtidos a partir da aplicação da técnica aleatória Ortotrip. As aortas foram seccionadas com dez cortes consecutivos para determinação dos parâmetros quantitativos tridimensionais das estruturas da parede do vaso.

Posteriormente, as lâminas histológicas foram montadas com quatro cortes de cada amostragem para a execução das técnicas histoquímicas Hematoxilina & Eosina (HE), Tricrômico de Masson, Wiegert e Tricrômico de Picrosírius.

5.2.2 3

Para coloração de HE, seguiu-se o protocolo clássico com algumas adaptações. Após hidratação, as lâminas foram coradas por um minuto em solução de Hematoxilina de Harris. Em seguida, lavadas em água corrente por 5 minutos, e, em seguida, coradas com Eosina-Floxina por 45 segundos e lavadas com água destilada, para serem desidratadas em série alcoólica crescente, diafanizadas e montadas. Com essa coloração, poderemos analisar a morfologia das células endoteliais e da camada íntima (FIGURA 3).

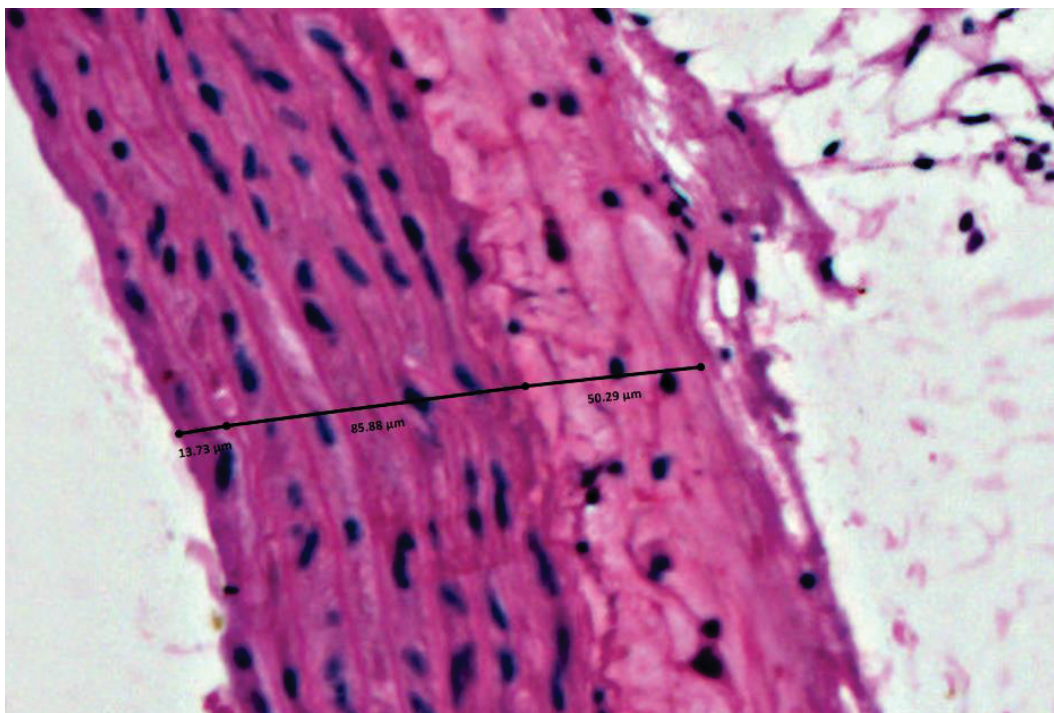


Figura 3 - Imagem de lâmina corada em HE submetida a análise morfoquantitativa no programa VSViewer (aumento 40x). FONTE: AUTOR (2018).

5.2.3 COLORAÇÃO DE TRICRÔMICO DE MASSON

As lâminas histológicas foram coradas, por 2 minutos, com Hematoxilina-Harris. Em seguida, lavadas em água corrente por 10 minutos. As lâminas foram lavadas em água destilada por 2 vezes, e, em seguida, coradas através da Fucsina Ácida de Ponceau durante 1 minuto. Posteriormente, as lâminas permaneceram por 3 minutos em ácido fosfomolibdico. Em seguida as lâminas ficaram por 1 minuto em água acética e álcool acético por 1 minuto. Por fim, as lâminas foram desparafinadas, desidratadas em soluções decrescentes de álcoois a partir de 95% até chegar a 10% e montadas. Com essa coloração, foi possível analisar a morfologia das fibras colágenas e musculares lisas, bem como a sua disposição na parede do vaso (FIGURA 4).

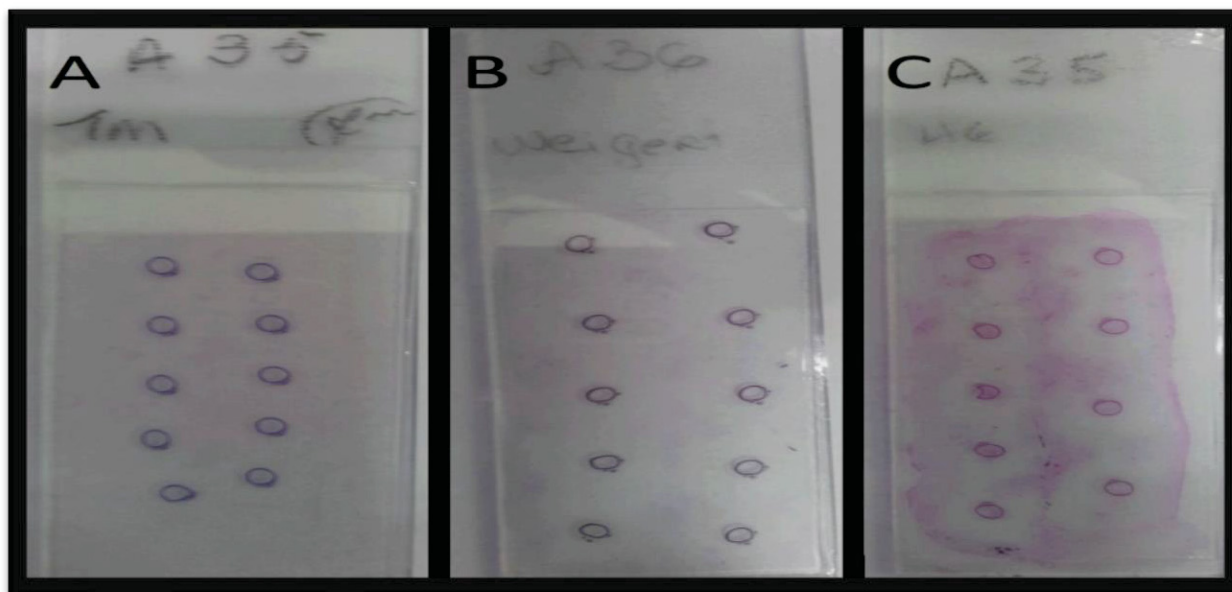


Figura 4 – Lâminas coradas em Tricrômio de Masson (A), Weigert (B) e HE (C). FONTE: AUTOR (2018).

5.2.4 COLORAÇÃO DE WEIGERT.

A solução foi preparada a partir Fucsina Básica 2 g e Resorcina 4 g misturadas em 200 ml de água destilada, aquecida até entrar em estado de ebulição por 1 minuto, quando foram adicionado 25 ml de Cloreto Férrico a 29%. O resultado dessa solução foi filtrado, e o líquido filtrado foi desprezado. O precipitado restante no papel filtro foi diluído em 200 ml de álcool a 95% e aquecido até dissolver completamente o precipitado. A solução foi, então, resfriada naturalmente, e a ela foram adicionados 4 ml de Ácido Clorídrico e álcool 95%, até completar 200ml de solução. As lâminas foram submersas nessa solução para serem coradas, permitindo a visualização das fibras elásticas (FIGURA 5).

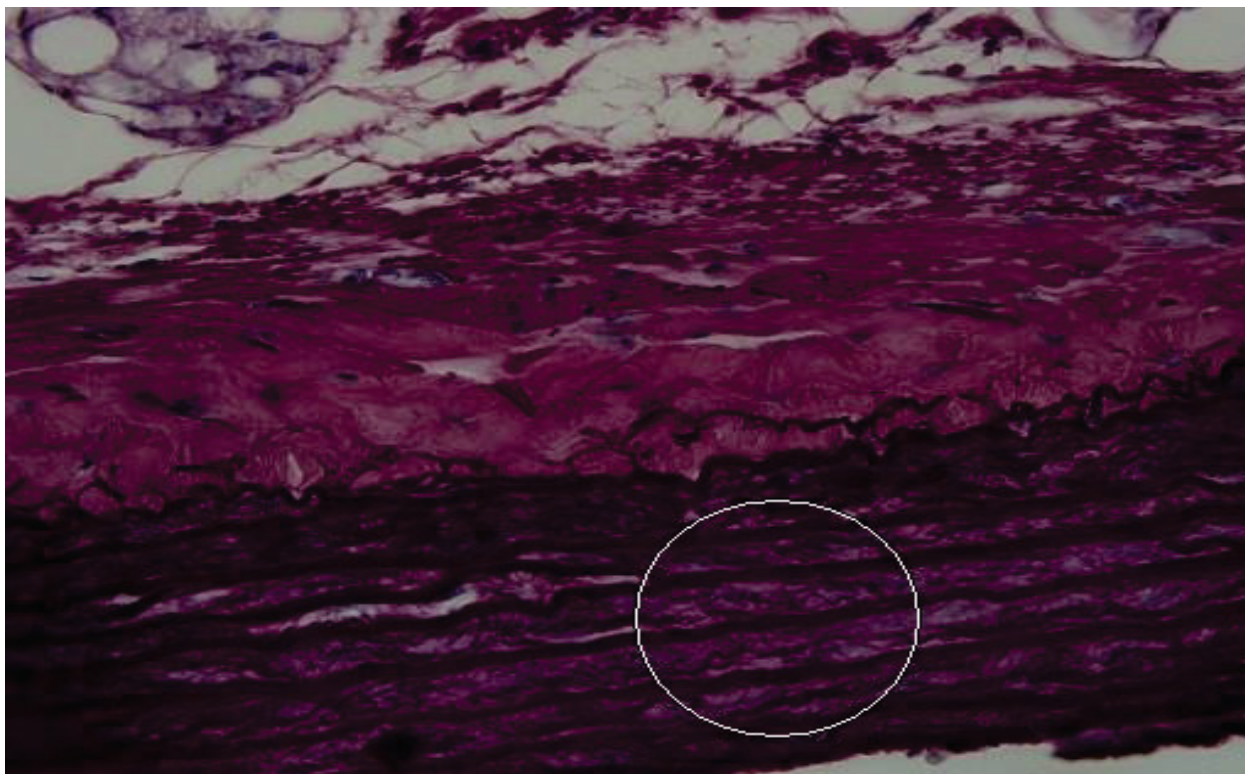


Figura 5 - Imagem de lâmina com colocação de Weigert e área de interesse a ser examinada (círculo branco), (Aumento 40x). FONTE: AUTOR (2018).

5.2.5 TÉCNICA DAS ANÁLISES MORFOMÉTRICA E MORFOQUANTITATIVA

Para análise das lâminas, foi utilizado um microscópio Olympus® BX50 com câmeras de captura DP71 3CCD *pro series* e enviadas para um monitor Sony Trinitron® colorido, congeladas e digitalizadas por uma placa digitadora Oculus TCX (Coreco®). O programa de obtenção das imagens foi o VSViewer versão 2.1.102 da MetaSystems®.

As mensurações para a análise morfométrica foram efetuadas com este mesmo programa. Foi medida a espessura da túnica íntima, média e adventícia da aorta na lâmina corada em HE, tendo sido realizadas cinco medições por túnica por animal, utilizando cortes alternados, obtendo-se assim um valor médio para cada animal, expresso em micrômetros.

Para a análise morfoquantitativa, foram capturadas imagens da túnica média da seguinte forma: para contagem de células musculares lisas, cinco capturas com

0,0080 mm² cada, em uma mesma posição em cortes alternados, para cada lâmina corada com HE; para quantificação do colágeno, cinco capturas com 0,0100 mm² cada, em uma mesma posição em cortes alternados, para cada lâmina corada com tricrômico de Masson; para quantificação das fibras elásticas, 10 capturas com 0,0042 mm² cada, em 10 posições padronizadas ao longo da circunferência da túnica média, para cada lâmina corada com Weigert.

Os dados morfoquantitativos foram obtidos em cada uma dessas imagens da seguinte forma: para a contagem de células musculares lisas, foi realizada contagem manual nos núcleos em cada imagem, e o resultado expresso como número de células por área de 0,0080 mm²; para a quantificação das fibras elásticas e colágenas, partiu-se do princípio que a elastina se cora de roxo na coloração de Weigert e o colágeno de azul no tricrômico de Masson, e utilizou-se o programa Image-Pro Plus para Windows versão 6.0 da Media Cybernetics® para mensuração da área da imagem ocupada por cada uma dessas cores. Para a quantificação das fibras elásticas e colágenas, utilizou-se segmentação de cores baseada em histograma HSI, após equalização da imagem no mesmo programa (FIGURA 6).

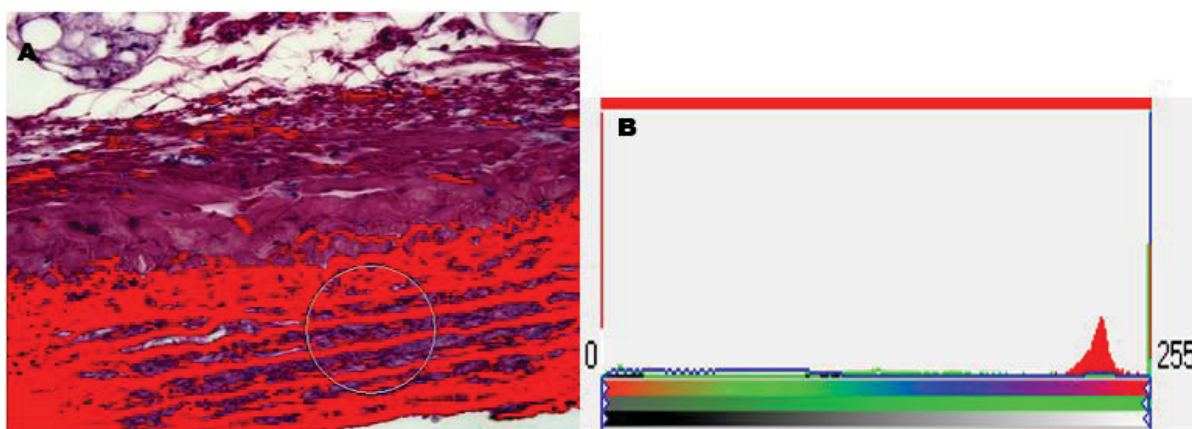


Figura 6 – Definição da faixa de cores que representam as fibras elásticas no diagrama HSI. A: O programa aplica uma “máscara” vermelha sobre a região. B: diagrama HSI. FONTE: AUTOR (2018).

O emprego desta técnica baseia-se no fato de a elastina corar-se em roxo escuro com o Weigert, e o colágeno em azul no tricrômico de Masson empregado. O roxo da elastina foi definido empiricamente na faixa HSI de (0-255, 255-255, 0-255) e a coloração azul, correspondente ao colágeno, foi definida empiricamente na faixa HSI de (60-180, 70-255, 65-160), e os espaços em branco na faixa de (10-255, 0-40, 220-255) (FIGURA 6).

Todas as demais faixas de cores possíveis, com exceção dos espaços em branco, correspondem ao restante dos componentes da túnica média. Obteve-se a área da lâmina ocupada por cada um desses elementos e a quantificação foi expressa em percentual da área de tecido corada para cada elemento de interesse, da seguinte forma: $\{100 * [\text{área de fibras elásticas}] / [(\text{área de fibras elásticas}) + (\text{área do restante})]\}$ e $\{100 * [\text{área do colágeno}] / [(\text{área do colágeno}) + (\text{área do restante})]\}$. O processo de obtenção dos dados morfoquantitativos com o programa Image-Pro Plus, conforme descrito acima (FIGURAS 7 e 8).

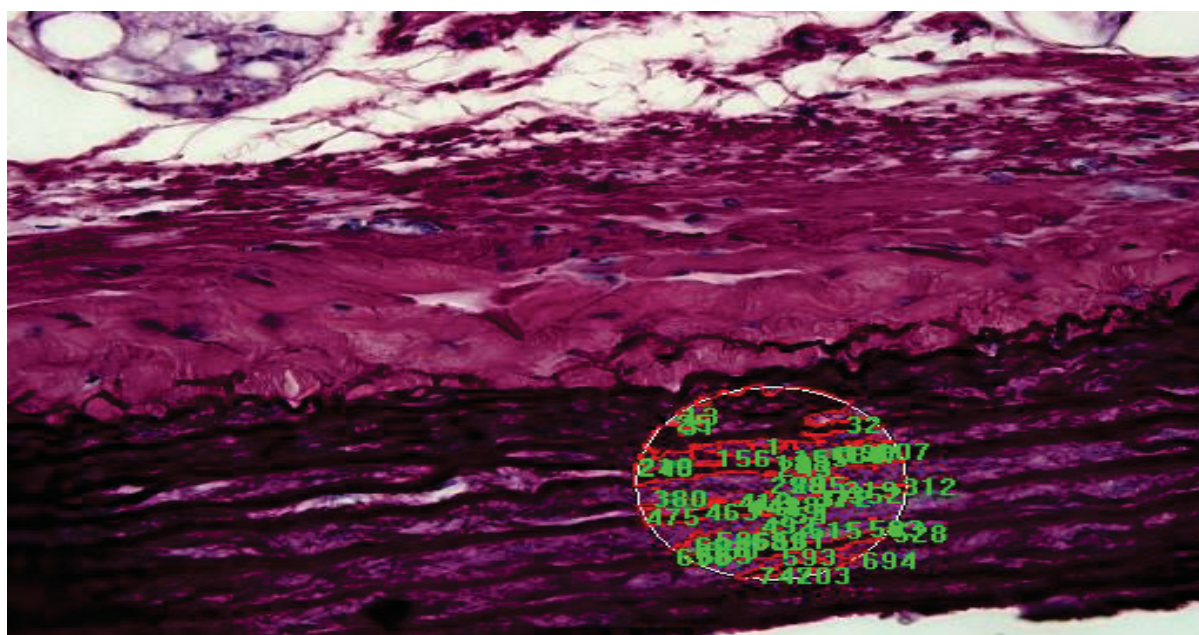


Figura 7 - Comando de contar os objetos da faixa de cores pré-definida que caem na área de interesse. Visualização da área ocupada por fibras elásticas delimitadas pelo círculo, aumento 40x. FONTE: AUTOR (2018).

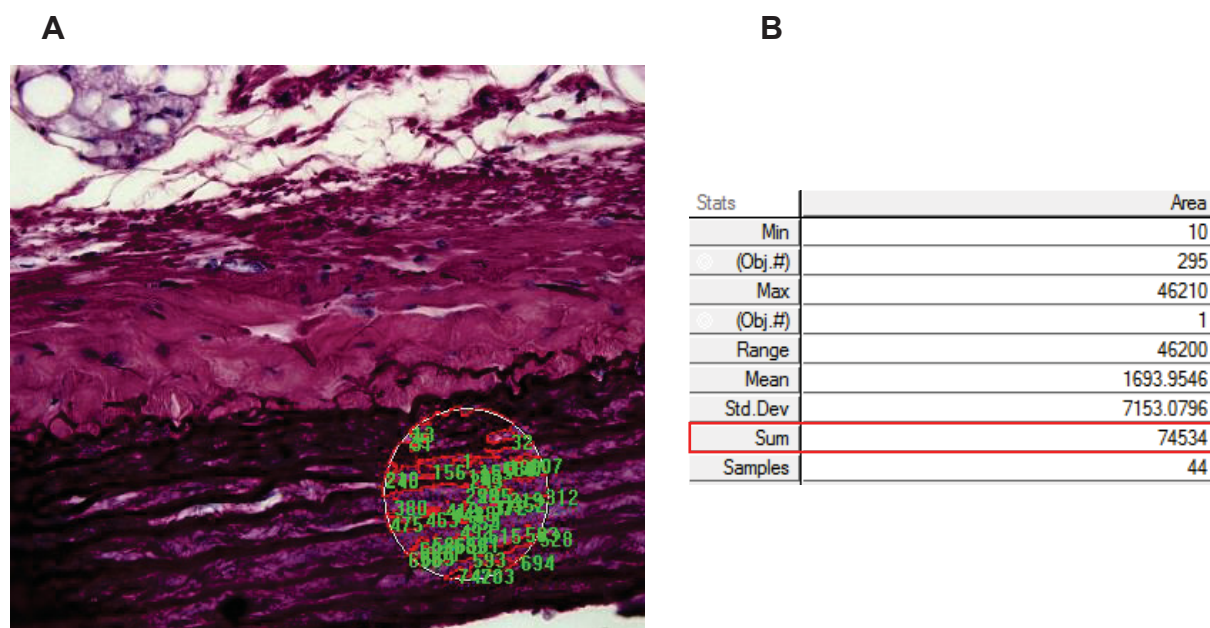


Figura 8 – Estatísticas da contagem. Visualização da área ocupada por fibras elásticas delimitadas pelo círculo (A). O parâmetro de interesse é “Sum”, que é a soma da área dos objetos, designa a cor das fibras elásticas. A soma estatística da área ocupada por fibras elásticas está contida no retângulo vermelho (B). (Aumento 40x). FONTE: AUTOR (2018).

5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados com o programa computacional IBM® SPSS Statistics v.20. Os resultados obtidos das variáveis do estudo foram descritos por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões. Para a comparação dos grupos definidos pelo tempo de vida foi usado o modelo de análise da variância (ANOVA) com um fator e o teste LSD (*least significance difference*) para as comparações múltiplas *post-hoc*. A condição de normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O projeto foi submetido à análise pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais e foi aprovado, no processo número 23075.031142/2013-73, recebendo o certificado número 732. A execução da metodologia deu-se entre 2012 e 2016.

Os dados biométricos dos animais estão tabulados no APÊNDICE I.

Será apresentado nas páginas seguintes o artigo científico com os Resultados e Discussão do estudo, intitulado **“Thoracic aorta thickness and histological changes with aging: an experimental rat model”**, aceito para publicação pela revista **Journal of Geriatric Cardiology** (APÊNDICE II), classificada como Qualis B2 (Medicina I).



Thoracic aorta thickness and histological changes with aging: an experimental rat model.

Giulio Cesar Gequelim^{1*}
 Djanira Aparecida da Luz Veronez²
 Gustavo Lenci Marques³
 Camila Harumi Tabushi⁴
 Ronaldo da Rocha Loures Bueno⁵

¹ Master's degree student in Postgraduate Program of Internal Medicine, Federal University of Paraná (UFPR), Medical Resident in Cardiology in Hospital de Clínicas UFPR, Curitiba-PR, Brazil.

² PhD, Associate Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, UFPR, Curitiba-PR, Brazil.

³ Master's degree in Internal Medicine, Adjunct Professor, Department of Internal Medicine, School of Medicine, UFPR, Curitiba-PR, Brazil.

⁴ Student, voluntary.

⁵ Doctor's degree in Health Sciences, Associate Professor III, Department of Internal Medicine, School of Medicine, UFPR, Curitiba-PR, Brazil

* Address correspondence to this author at 181 General Carneiro St., Alto da Gloria, Curitiba, PR, Brazil, Zip Code: 80.060-900; Phone no: +55 41 3360-1887; Fax: +55 41 3360-7832; E-mail: giuliogequelim@gmail.com

Sources of support: All resources for this research were provided by the Animal Facility Services of Angelina Caron Hospital and by the Biological Sciences Sector of Federal University of Paraná.

Word count: 1744.

Number of figures: 1.

Number of tables: 5.

Conflict of interest declaration: The authors confirm that this article content has no conflict of interest.

ABSTRACT

Objective

To assess and quantitatively describe histological changes in normal aortic aging process through measurement of thoracic aorta's media layer thickness, media layer smooth muscle cell count, collagen and elastic fibers concentration, across different ages, in an experimental rat model.

Methods

Study animals (n=60) were separated in five groups of 12, each ascribed a different lifetime (3, 6, 9, 18 and 24 months, respectively), at the completion of which animals underwent euthanasia and a segment of descending aorta's first centimeter was harvested and prepared for histological analysis with hematoxylin & eosin, Masson's trichrome and Weigert's stains. Tissue images were scanned and random fields underwent softwar analysis to measure media layer thickness, count smooth muscle cells per field and quantify elastic fibers and collagen, each of these expressed as the proportion of the fields' area occupied by these components.

Results

Older age groups exhibited, as compared to the younger, increased media layer thickness and decreased smooth muscle cell counts per field and decreased elastic fiber proportion per field. Both reductions on smooth muscle cell count and elastic fiber concentration were noted with statistical significance since month 9 and evolved thereafter. Collagen fibers showed a tendency to increase, without reaching statistical significance.

Conclusion

With aging, descending aorta media layer extracellular matrix increases, leading to layer thickening. This increase is driven by the collagen content, and this process results in decreased elastic fiber concentration and smooth muscle cell count. These results have replicated findings from previous researches, and such findings have important physiologic and pathologic implications on age-related vascular and hemodynamic phenomena.

Keywords: Aging, aorta, vascular, elastic fibers, vascular collagen, vascular smooth muscle cells, rats.

RESULTS

All study animals remained alive for the lifetime ascribed for each of them. Two animals from group 18 months were found to have tumors by the time of the tissue harvest, not affecting any aspects of the research's methodology. Number of subjects (n) per group differed from 12 in individual analyses due to the presence of artifacts compromising the analysis of histological specimens. Notably, the entire 18 months group was excluded from elastic fiber analysis, and the entire 24 months group from collagen analysis for this reason.

Media layer thickness had a statistically significant increase with age (TABLE 2), and comparisons between individual groups are presented on a separate table (TABLE 3). SMC count and elastic fiber concentration decreased, whereas collagen concentration had a tendency to increase that did not reach statistical significance (TABLES 4 and 5).

Table 2: Media layer thickness in micrometers.

Group	n	Media layer thickness (μm)		p-value*
		Mean	SD	
3 mo	11	89.67	12.09	
6 mo	12	101.70	13.42	
9 mo	12	106.38	14.02	
18 mo	10	121.42	18.81	
24 mo	12	114.36	17.47	<0.001

*One-way ANOVA, $p < 0.05$

Table 2: Media layer thickness in micrometers. SD: standard deviation; μm : micrometer.

TABLE 3: Comparison of media layer thickness between individual groups.

Compared groups	p-value*
	Media layer thickness
3 mo x 6 mo	0.065
3 mo x 9 mo	0.012
3 mo x 18 mo	<0.001
3 mo x 24 mo	<0.001
6 mo x 9 mo	0.457
6 mo x 18 mo	0.004
6 mo x 24 mo	0.048
9 mo x 18 mo	0.026
9 mo x 24 mo	0.206
18 mo x 24 mo	0.286

*LSD test, $p < 0.05$

Table 3: Comparison of media layer thickness between individual groups.

Table 4: Results of the quantitative analysis.

SMC count					Elastic fibers (%)				Collagen (%)			
Group	n	Mean	SD	p-value*	n	Mean	SD	p-value*	n	Mean	SD	p-value*
3 mo	12	32.1	3.4		10	62.03	6.04		12	19.06	7.63	
6 mo	12	28.5	4.1		9	57.89	9.04		12	27.35	10.55	
9 mo	12	27.6	3.7		10	53.26	4.48		10	21.63	8.70	
18 mo	12	31.3	6.0		11	46.28	6.67		0	-	-	
24 mo	12	20.9	4.4	<0.001	0	-	-	<0.001	12	26.57	6.91	0.068

*One-way ANOVA, $p < 0.05$

Table 4: Results of smooth muscle cell (SMC) count, elastic fiber and collagen quantitative analysis. SMC count is presented as number of cells per per 0.0080 mm² field. Elastic fiber and collagen quantification is given as the proportion of the sample field occupied by each component.

Table 5: Comparisons between individual groups.

Compared groups	p-value*	
	SMC	Elastic fibers
3 mo x 6 mo	0.057	0.185
3 mo x 9 mo	0.017	0.006
3 mo x 18 mo	0.672	<0.001
3 mo x 24 mo	<0.001	
6 mo x 9 mo	0.612	0.140
6 mo x 18 mo	0.134	<0.001
6 mo x 24 mo	<0.001	
9 mo x 18 mo	0.047	0.022
9 mo x 24 mo	<0.001	
18 mo x 24 mo	<0.001	

*LSD test, $p < 0.05$

Table 5: Comparisons of smooth muscle cell (SMC) count and elastic fiber proportion between individual groups. Study results are summarized in (Figure 1).

Study results are summarized in Figure 1.

Figure 1: Study variables per age group.

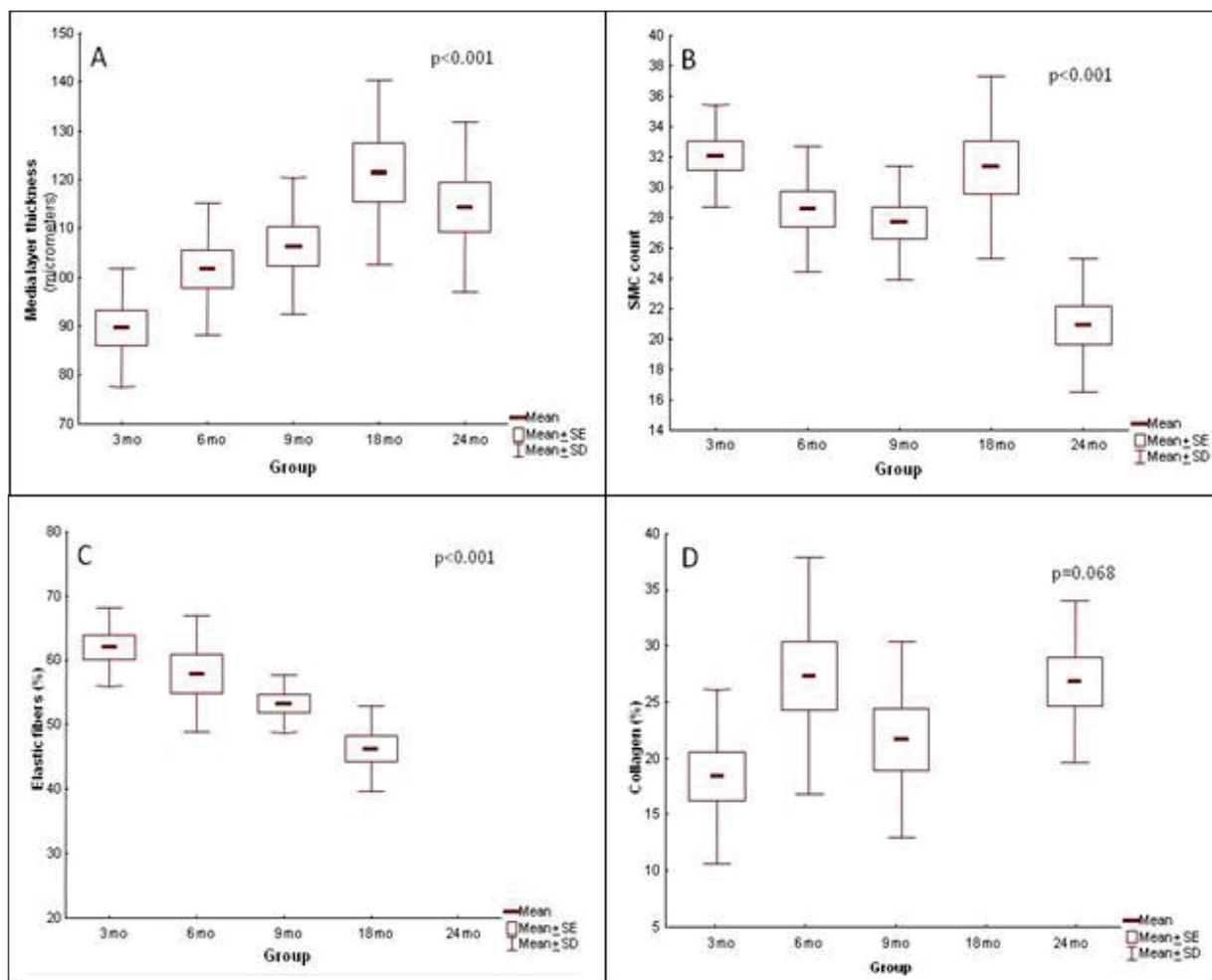


Figure 1: Study variables per age group. A: media layer thickness; B: SMC count per 0,0080 mm² field; C: elastic fiber concentration (%); D: collagen concentration (%). SMC: smooth muscle cell; SE: standard error; SD: standard deviation.

DISCUSSION

Our study has built a model of aortic arterial wall aging in rats that allowed us to both describe the increment in media layer thickness that occurs during normal aging, and quantitatively assess the changes in elastic and collagen fibers and SMC, namely a decrease in elastic fibers and SMC content. As relative elastic fiber content decreased while media layer thickness increased, such thickening is supposed to have been at the expense of increased collagen fiber content (i.e., fibrosis), a trend that was observed in our results, though without reaching statistical significance.

From the quantitative point of view, although the total content of elastic fibers in elastic lamellae remain constant throughout life (SPINA et al., 1983), its concentration reduces, as a result of increased collagen synthesis between lamellae, (SPINA et al., 1983) and almost complete substitution of elastic fibers by collagen and proteoglycans in the interlamellar space (FRITZE et al., 2012). From a qualitative standpoint, phenomena as altered aminoacid crosslink (WATANABE et al., 1996), glyco-oxidative reaction, (KONOVA et al., 2004; SAWABE et al., 2010) fragmentation, (GREENWALD, 1980; AVOLIO, JONES and TAFAZZOLI-SHADPOUR, 1998) increase matrix metalloproteinases (MMP) activity (GREENWALD, 1980; FRITZE et al., 2012) and calcification have been observed (BIELAK et al., 2004).

Media layer elastic module has two components: elastic fibers account for the first component, physiological, with a flatter stress-strain relationship, while collagen fibers account for the second component, whose stress-strain relationship is steeper. (KOHN, LAMPI and REINHART-KING, 2015). Age-related elastic fiber changes (KONOVA et al., 2004; SAWABE et al., 2010) are thought to account for loss of its elastic properties (WATANABE et al., 1996), as a consequence, transmitting of hemodynamic forces to underlying, stiffer, (KOBIELARZ et al., 2015) media layer collagen fibers, (CHOW et al., 2014), resulting in increased blood vessel stiffness (ARONSON, 2003; TSAMIS, KRAWIEC and VORP, 2011; NINOMIYA et al., 2015).

Collagen fiber staining involved more steps than other employed staining, thus increasing the possibility of artifact insertion, such that more laminae had to be excluded from the analysis due to presence of artifacts, thus possibly lowering the sample power to detect a significant change in collagen fiber content between groups. Moreover, Masson's trichromic, the stain we utilized in our analysis, is less specific, for quantitative purposes, than Picrosirius' red stain (DRIFKA et al., 2016; WEGNER et al., 2017) which has been successfully employed in other study (WHEELER et al., 2015) to quantitatively assess collagen content in aortic media layer and make comparisons between groups.

Recent data propose a possible link between loss of elastin concentration and integrity to smooth cell growth signaling (LI et al., 1998; WAGENSEIL et al., 2017). This link has been suggested based on findings that normal elastin interacts with growth factors in the paracellular level in the aortic media layer (HORIGUCHI, OTA and RIFKIN, 2012; LANNOY, SLOVE and JACOB, 2014). Others researchers have found that aortic media layer SMC themselves become stiffer with aging, raising the

possibility of a direct contribution of the cellular component of the media layer to arterial stiffening besides stiffening of the extracellular matrix (QIU et al., 2010). Media layer cellularity, which is made up predominantly by SMC, was found to decrease with age (COLLINS et al., 2014) though the mechanism for this remains to be elucidated. Importantly, SMC dysfunction has a potential pathogenic role in atherosclerosis and aneurysm formation (ALBINSSON and SWARD, 2013).

In the present study, rats have been raised up to the age of 24 months, which has been shown to parallel human 60-year age (Andreollo et al., 2012). Therefore, although our data can be regarded as reflecting the aging process through adulthood to old age, but not necessarily its continuation from that point on. On the other side, since we found statistical significance, our results may signal to possible future studies that that age is enough time to wait for aging changes in rats.

The present study described age-related histological alterations in the thoracic aorta in an experimental model with rats. Extracellular matrix increases were observed, leading to layer thickening. This increase seems to be driven by the collagen content, resulting in decreased elastic fiber concentration and smooth muscle cell count.

7. CONSIDERAÇÕES GERAIS

As idades em que os ratos do estudo foram sacrificados correspondem às idades de 18 a 45 anos em seres humanos (ANDREOLLO et al., 2012). O aumento da espessura da parede arterial que observamos é verificado também em humanos durante essa faixa etária (OXENHAM e SHARPE, 2013).

8. CONCLUSÕES

As alterações observadas com o envelhecimento na camada média da aorta descendente de ratos *Wistar* foram:

- Diminuição do conteúdo de fibras elásticas.
- Tendência a aumento do conteúdo de fibras colágenas, que não foi estatisticamente significativo no nosso estudo.
- Diminuição do número de células musculares lisas por campo.
- Aumento da espessura da camada média.
- As alterações no conteúdo de fibras elásticas, células musculares lisas e espessura da camada média foram todas observadas com diferença estatisticamente significativa a partir do nono mês, em comparação com os ratos mais jovens.

Tais resultados harmonizam-se com o atual conhecimento a respeito do envelhecimento da aorta, e podem ser correlacionados entre si na forma da seguinte conclusão: com a idade, ocorre um aumento progressivo da matriz extracelular da camada média, possivelmente às custas de deposição de colágeno, levando a espessamento da camada e redução da concentração dos demais componentes (fibras elásticas e células musculares lisas).

REFERÊNCIAS

- ALBINSSON, S.; SWARD, K. Targeting smooth muscle microRNAs for therapeutic benefit in vascular disease. **Pharmacol. Res**, v. 75, p. 28-36, 2013.
- ANDREOLLO, N.A.; SANTOS, E.F.; ARAUJO, M.R.; LOPES, L.R. Rat's age versus human's age: what is the relationship? **Arq. Bras. Cir. Dig**, v. 25, n.1, p. 49-51, 2012.
- AVOLIO, A.; JONES, D.; TAFAZZOLI-SHADPOUR, M. Quantification of Alterations in Structure and Function of Elastin in the Arterial Media. **Hypertension**, v. 32, p.170-175, 1998.
- ARONSON, D. Cross-linking of glycated collagen in the pathogenesis of arterial and myocardial stiffening of aging and diabetes. **J. Hypertens**, v. 21, p. 3-12, 2003.
- BALDWIN, A.K.; SIMPSON, A.; STEER, R.; CAIN, S.A.; KIELTY, C.M. Elastic fibres in health and disease. **Expert. Rev. Mol. Med**, v. 15, e8, 2013.
- BENETOS, A.; WEBER, B.; IZZO, J.; MITCHELL, G.; RESNICK, L.; ASMAR. Influence of age, risk factors, and cardiovascular and renal disease on arterial stiffness: clinical applications. **Am. J. Hypertens**, p. 1101-1108, 2002.
- BIELAK, L.F.; TURNER, S.T.; FRANKLIN, S.S.; SHEEDY, P.F II.; PEYSER, P.A. Age-dependent associations between blood pressure and coronary artery calcification in asymptomatic adults. **J. Hypertens**, v. 22, n 4, p. 719-725, 2004.
- CHIAO, Y.A.; RABINOVITCH, P.S. The Aging Heart. **Cold. Spring. Harb. Perspect. Med**, v. 5: a025148, 2015.
- CHOW, M.J.; TURCOTTE, R.; LIN, C.P.; ZHANG, Y. Arterial Extracellular Matrix: A Mechanobiological Study of the Contributions and Interactions of Elastin and Collagen. **Biophys. J**, v. 106, n. 12, p. 2684-2692, 2014.

CHUNG, J.; LACHAPELLE, K.; CARTIER, R.; MONGRAIN, R.; LEASK, R.L. Loss of mechanical directional dependency of the ascending aorta with severe medial degeneration. **Cardiovasc. Pathol**, v. 26, p. 45-50, 2017.

COLLINS, J.A.; MUNOZ, J.V.; PATEL, T.R.; LOUKAS, M.; TUBBS, R.S. The anatomy of the aging aorta. **Clin. Anat**, v. 27, n. 3, p. 463-466, 2014.

DRIFKA, C.R.; LOEFFLER, A.G.; MATHEWSON, K. Comparison of Picrosirius Red Staining With Second Harmonic Generation Imaging for the Quantification of Clinically Relevant Collagen Fiber Features in Histopathology Samples. **J. Histochem. Cytochem**, v. 64, n. 9, p. 519-529, 2016.

FRITZE, O.; ROMERO, B.; SCHLEICHER, M.; JACOB, M.P.; OH, D.Y.; STARCHER, B.; SCHENKE-LAYLAND, K.; BUJAN, J.; STOCK, U.A. Age-Related Changes in the Elastic Tissue of the Human Aorta. **J. Vasc. Res**, v. 49, p. 77-86, 2012.

GEMS, D. The aging-disease false dichotomy: understanding senescence as pathology. **Front. Genet**, v. 6, p. 212, 2015.

GODFREY, M.; NEJEZCHLEB, P.A.; SCHAEFER, G.B.; MINION, D.J.; WANG, Y.; BAXTER, B.T. Elastin and fibrillin mRNA and protein levels in the ontogeny of normal human aorta. **Connect. Tissue. Res**, v. 29, p. 61-69, 1993.

GREENWALD, S.E. Ageing of the conduit arteries. **J. Pathol**, v. 211: 157-172, 2007.

HAIDET, G.C.; WENNERBERG, P.W.; FINKELSTEIN, S.M.; MORGAN, D.J. Effects of aging per se on arterial stiffness: systemic and regional compliance in beagles. **Am. Heart. J**, v. 132, n. 2 Pt 1, p. 319-327, 1996.

HORIGUCHI, M.; OTA, M.; RIFKIN, D.B. Matrix control of transforming growth factor- β function. **J. Biochem**, v. 152, n. 4, p. 321-329, 2012.

IZZO, C.; CARRIZZO, A.; ALFANO A, VIRTUOSO N, CAPUNZO M, CALABRESE M, DE SIMONE E, SCIARRETTA S, FRATI G, OLIVETI M, DAMATO A, AMBROSIO M,

DE CARO F, REMONDELLI P, VECCHIONE C. The Impact of Aging on Cardio and Cerebrovascular Diseases. **Int. J. Mol. Sci**, v. 19, n. 2, p. 481, 2018.

KAESS, B.M.; RONG, J.; LARSON, M.G.; HAMBURG, N.M.; VITA, J.A.; LEVY, D.; BENJAMIN, E.J.; VASAN, R.S.; MITCHELL, G.F. Aortic stiffness, blood pressure progression, and incident hypertension. **J. Am. Med. Assoc**, v. 308, p. 875-881, 2012.

KARNIK, S.K.; BROOKE, B.S.; BAYES-GENIS, A.; SORENSEN, L.; WYTHER, J.D.; SCHWARTZ, R.S.; KEATING, M.T.; LI, D.Y. A critical role for elastin signaling in vascular morphogenesis and disease. **Development and Disease**, v. 130, p. 411-423, 2003.

KOBIELARZ, M.; CHWIŁKOWSKA, A.; TUREK, A.; MAKSYMOWICZ, K.; MARCINIAK, M. Influence of selective digestion of elastin and collagen on mechanical properties of human aortas. **Acta. Bioeng. Biomech**, v. 17, n. 2, p. 55-62, 2015.

KOHN, J.C.; LAMPI, M.C.; REINHART-KING, C.A. Age-related vascular stiffening: causes and consequences. **Front. Genet**, v. 6, p. 112, 2015.

KONOVA, E.; BAYDANOFF, S.; ATANASOVA, M.; VELKOVA, A. Age-related changes in the glycation of human aortic elastin. **Exp. Gerontol**, v. 39, n. 2, p. 249-254, 2004.

LANNOY, M.; SLOVE, S.; JACOB, M.P. The function of elastic fibers in the arteries: Beyond elasticity. **Pathologie. Biologie**, v. 62, p. 79–83, 2014.

LAURENT, S.; BOUTOUYRIE, P.; ASMAR, R.; GAUTIER, I.; LALOUEX, B.; GUIZE, L.; DUCIMETIERE, P.; BENETOS, A. Aortic stiffness is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients. **Hypertension**, v. 37, p. 1236-1241, 2001.

LI, D.Y.; BROOKE, B.; DAVIS, E.C.; MECHAM, R.P.; SORENSEN, L.K.; BOAK, B.B.; EICHWALD, E.; KEATING, M.T. Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis. **Nature**, v. 393, p. 276-280, 1998.

LAKATTA EG, LEVY D. Arterial and Cardiac Aging: Major Shareholders in Cardiovascular Disease Enterprises. Part I: Aging Arteries: A “Set Up” for Vascular Disease. **Circulation**, v 107, p. 139-146, 2003.

LYLE, AN.; RAAZ, Y. Killing Me Unsoftly. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular **Biology**, v. 37, p. e1-e11, 2017.

MAROULES, C.D.; KHERA, A.; AYERS, C.; GOEL, A.; PESHOCK, R.M.; ABBARA, S.; KING, K.S. Cardiovascular outcome associations among cardiovascular magnetic resonance measures of arterial stiffness: the Dallas heart study. **J. Cardiovasc. Magn. Reson**, v. 16, p. 33, 2014.

MEI, C.C.; ZHANG, J.; JING, H.X. Fluid mechanics of Windkessel effect. **Med. Biol. Eng. Comput**, 2018. [Publicado eletronicamente antes da edição impressa <https://doi.org/10.1007/s11517-017-1775-y>

MESCHER, A.L. Ch. 5: Connective tissue. In: MESCHER, AL. Junqueira’s Basic Histology, 13e: Text and Atlas. **McGrall. Hill**, 2013a.

MESCHER AL. Ch. 11: The circulatory system. In: Mescher, AL. Junqueira’s Basic Histology, 13e: Text and Atlas. **McGrall. Hill**, New York, NY, 2013b.

NINOMIYA, O.H.; TAVARES, M. J.A.; HIGUCHI, M.D.E, L.; PUECH-LEÃO, P.; DE LUCCIA, N.; RAGHAVAN, M.L.; DA SILVA, E.S. Biomechanical Properties and Microstructural Analysis of the Human Nonaneurysmal Aorta as a Function of Age, Gender and Location: An Autopsy Study. **J. Vasc. Res**, v. 52, n. 4, p. 257-264, 2015.

Ministério da Saúde. DATASUS. <https://goo.gl/UzsNVX>. Acesso: 01/09/2017.

O’CONNELL, M.K.; MURTHY, S.; PHAN, S.; XU, C.; BUCHANAN, J.; SPILKER, R.; DALMAN, R.L.; ZARINS, C.K.; DENK, W.; TAYLOR, C.A. The three-dimensional micro- and nanostructure of the aortic medial lamellar unit measured using 3D confocal and electron microscopy imaging. **Matrix. Biol**, v. 27, p. 171-181, 2008.

OXENHAM, H.; SHARPE, N. Cardiovascular aging and heart failure. **Eur. J. of Heart. Fail.**, v. 5, n. 4, p. 427-434, 2003.

QIU, H.; ZHU, Y.; SUN, Z. Short communication: Vascular Smooth Muscle Cell Stiffness as a Mechanism for Increased Aortic Stiffness with Aging. **Circ. Res.**, v. 107, n. 5, p. 615-619, 2010.

ROTH, A.G.; JOHNSON, C.; ABAJOBIR A. Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. **J. Am. Col. Cardiol.**, v. 70, n. 1, p. 1-25, 2017.

RUDJANTO, A. The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis. **Acta. Med. Indones**, v. 39, p. 86-93, 2007.

RUAN, L.; ZHANG, X.; LI, R. Recent insights into the cellular and molecular determinants of aging. **J. Cell. Science**, v. 131, n. 3, p. jcs210831, 2018.

SANTOS-FILHO, S.D.; MANOEL, C.V.; SILVA, G.A.; DUARTE, V.S.; RODRIGUES, G.N.; ANDRADE, M.L. The scientific interest in the study of the aging and prevention in biomedical sciences. **Revista. Brasileira de Ciências do Envelhecimento Humano**, v. jul-dez, p. 70-78, 2006.

SAWABE, M. Vascular aging: from molecular mechanism to clinical significance. **Geriatr. Gerontol**, In_.10 (Suppl 1): S213-220, 2010.

SPINA, M.; GARBISA, S.; HINNIE, J.; HUNTER, J.C.; SERAFINI-FRACASSINI, A. Age-Related Changes in Composition and Mechanical Properties of the Tunica Media of the Upper Thoracic Human Aorta. **Arterioscler**, v. 3, p. 64-76, 1993.

STREET, J.M.; SOUZA, A.C.; ALVAREZ-PRATS, A.; HORINO, T.; HU, X.; YUEN, P.S.; STAR, R.A. Automated quantification of renal fibrosis with Sirius Red and polarization contrast microscopy. **Physiol. Rep**, v. 2, n. 7, p. e12088, 2014.

TODA, T.; TSUDA, N.; NISHIMORI, I.; LESZCZYNSKI, D.E.; KUMMEROW, F.A. Morphometrical analysis of the aging process in human arteries and aorta. **Acta. Anat. (Basel)**, v. 106, n. 1, p. 35-44, 1980.

TSAMIS, A.; KRAWIEC, J.T.; VORP, D.A. Elastin and collagen fibre microstructure of the human aorta in ageing and disease: A Review. **J. R. Soc. Interface**, v. 10, p. 20121004, 2013.

WAGENSEIL, J.E.; CILIBERTO, C.H.; KNUTSEN, R.H.; LEVY, M.A.; KOVACS, A.; MECHAM, R.P. The importance of elastin to aortic development in mice. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **Physiol**, v. 299, p. H257–H264, 2010.

WATANABE, M.; SAWAI, T.; NAGURA, H.; SUYAMA, K. Age-related alteration of cross-linking amino acids of elastin in human aorta. *Tohoku. J. Exp. Med*, v. 180, n. 2, p. 115-30, 1996.

WEGNER, K.A.; KEIKHOSRAVI, A.; ELICEIRI, K.W.; VEZINA, C.M. Fluorescence of Picrosirius Red Multiplexed With Immunohistochemistry for the Quantitative Assessment of Collagen in Tissue Sections. **J. Histochem. Cytochem**, v. 658, p. 479-490, 2017.

WEISBROD, R.M.; SHIANG, T.; AL SAYAH, L. Arterial stiffening precedes systolic hypertension in diet-induced obesity. **Hypertension**, v. 62, p. 1105-1110, 2013.

WHEELER, J.B.; MUKHERJEE, R.; STROUD, R.E.; JONES, J.A.; IKONOMIDIS, J.S. Relation of Murine Thoracic Aortic Structural and Cellular Changes With Aging to Passive and Active Mechanical Properties. **J. Am. Heart. Assoc**, v. 4, n. 3, p. e001744, 2015.

ZHANG, Y.; AGNOLETTI, D.; XU, Y.; WANG, J.G.; BLACHER, J.; SAFAR, M.E. Carotid-femoral pulse wave velocity in the elderly. **J. Hypertens**, v. 32, n. 8, p. 1572-1576, 2014.

APÊNDICE I - DADOS BIOMÉTRICOS DOS ANIMAIS DE TODOS OS GRUPOS.

Grupo I	Peso do Animal (g)	Estatura do Animal (cm)	Grupo III	Peso do Animal (g)	Estatura do Animal (cm)
Rato 1	376	21	Rato 25	481	26,8
Rato 2	408	24	Rato 26	509	27
Rato 3	383	22,5	Rato 27	474	27,5
Rato 4	353	21,5	Rato 28	543	27,5
Rato 5	328	21	Rato 29	464	25
Rato 6	343	22	Rato 30	589	27
Rato 7	386	23,5	Rato 31	471	25,5
Rato 8	376	23,5	Rato 32	473	26
Rato 9	396	22,5	Rato 33	531	26,5
Rato 10	438	24	Rato 34	551	28
Rato 11	367	22	Rato 35	537	26,5
Rato 12	395	21	Rato 36	545	27,5
Grupo II	Peso do Animal (g)	Estatura do Animal (cm)	Grupo IV	Peso do Animal (g)	Estatura do Animal (cm)
Rato 13	499	23,5	Rato 37	592	30
Rato 14	422	24	Rato 38	564	27,5
Rato 15	422	25	Rato 39	510	29
Rato 16	406	23	Rato 40	575	26,5
Rato 17	555	26,5	Rato 41	610	28
Rato 18	481	25,5	Rato 42	573	27
Rato 19	453	23,7	Rato 43	562	27,5
Rato 20	404	23,5	Rato 44	540	24
Rato 21	432	23,1	Rato 45	549	26,5
Rato 22	494	24,2	Rato 46	586	26
Rato 23	445	25	Rato 47	520	26
Rato 24	476	23,4	Rato 48	485	26

Grupo V	Peso do Animal (g)	Estatura do Animal (cm)
Rato 49	592	29
Rato 50	470	26
Rato 51	441	26
Rato 52	573	27
Rato 53	520	27
Rato 54	673	28
Rato 55	412	27
Rato 56	478	28
Rato 57	570	29
Rato 58	618	26
Rato 59	531	26
Rato 60	634	28

APÊNDICE II – ACEITE PARA PUBLICAÇÃO DOS RESULTADOS DO ESTUDO EM REVISTA CIENTÍFICA

Dear Dr. Giulio Cesar Gequelim,

After consideration, I am pleased to tell you that your manuscript **No. 20170904001**, entitled

Thoracic aorta thickness and histological changes with aging: an experimental rat model.

has been accepted for publication in Journal of Geriatric Cardiology (JGC). JGC is a monthly, open-access and peerreviewed journal published by China Science Publishing Group™.

We will contact you soon with regard to proofs and other business matters.

Thanking you once again for having submitted your manuscript to JGC, and we look forward to your continued contributions to our journal.

Yun-Dai CHEN, MD, PhD

Editor-in-Chief

Journal of Geriatric Cardiology

Institute of Geriatric Cardiology,

Chinese PLA General Hospital,

28 Fuxing Road, 100853 Beijing, China

Telephone: +86-10-68295464

Fax: +86-10-66936756 Email: jgc@jgc301.com <http://www.jgc301.com/ch/index.aspx>

February 08, 2018