

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E ANATOMIA

**INVESTIGAÇÃO DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA E MEDIADORES
INFLAMATÓRIOS NA FISIOPATOLOGIA DO ANEURISMA DE AORTA
ABDOMINAL EM HUMANOS: UMA ABORDAGEM BIOQUÍMICA E
HISTOLÓGICA**

Ribeirão Preto

2023

CARLOS ALEXANDRE CURYLOFO CORSI

Investigação do sistema renina angiotensina e mediadores inflamatórios na fisiopatologia do aneurisma de aorta abdominal em humanos: uma abordagem bioquímica e histológica

Versão Original

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Clínica Cirúrgica

Orientador: Profa. Dra. Christiane Becari

Ribeirão Preto

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Corsi, Carlos Alexandre Curylofo

Investigação do sistema renina angiotensina e mediadores inflamatórios na fisiopatologia do aneurisma de aorta abdominal em humanos: uma abordagem bioquímica e histológica. Ribeirão Preto, 2023.

108 p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Cirúrgica.

Orientadora: Becari, Christiane.

1. Aneurisma de aorta abdominal; 2. Sistema renina angiotensina; 3. Cultura celular de músculo liso vascular; 4. Aorta; 5. ex-vivo; 6. Interleucinas; 7. Doadores de tecidos humanos; 8. Inibidor da enzima conversora de angiotensina; 9. bloqueador do receptor de angiotensina 1

FOLHA DE APROVAÇÃO

CORSI, Carlos Alexandre Curylofo

Investigação do sistema renina angiotensina e mediadores inflamatórios na fisiopatologia do aneurisma de aorta abdominal em humanos: uma abordagem bioquímica e histológica

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Clínica Cirúrgica

Aprovado em/...../ 2023

Comissão Julgadora

Profa. Dra.

Instituição:

Profa. Dra.

Instituição:

Prof. Dr.

Instituição:

Profa. Dra.

Instituição:

Prof. Dr.

Instituição:

Trabalho realizado no Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP, sob a orientação da Profa. Dra. Christiane Becari, com apoio financeiro da Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - Processos n° 2017/21539-6 e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha mãe **Vanilda Curylofo** (in memoriam) que passou por esta vida tão brevemente para me ensinar a forma mais simples, humilde e profunda o que é o amor. Saudades eternas, mãe! Te amo!*

*A todos os **doadores de órgãos e tecidos**,*

*E a cada **família doadora de órgãos e tecidos** que, em um ato de infinita bondade renunciaram sua dor, estendendo suas mãos aos inúmeros desconhecidos que esperavam por um ato de infinita bondade.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela infinita bondade de me escolher e me capacitar para o chamado de fazer ciência, transformando vidas por meio delas.

Ao meu pai, José Carlos Moreno Corsi, por sempre confiar em mim e estar sempre ao meu lado.

Aos meus irmãos Elisângela, Estevão e Ricardo Corsi por partilhar os momentos mais lindos da vida e, em especial, à minha irmã **Tatiane Corsi Ziquiel**, por não soltar minha mão e mesmo quando eu mesmo não acreditava sempre acreditou por mim. Meu maior presente na vida. Te amo!

Aos meus sobrinhos, em especial, **Letícia Ziquiel e Caroline Corsi** pelo acolhimento, amizade e inspiração e aos pequenos que tanto amo: Cauã, Sophia, Yasmim, Valentina e Estevão Corsi.

À minha orientadora Christiane Becari, pelos ensinamentos e orientações no decorrer deste trabalho.

Ao professor Paulo Évora, pela gentileza em me receber e pela sabedoria mediada em cada conversa e ensinamento.

Aos membros da banca, pelo aceite e apoio.

Aos queridos amigos do Laboratório de Doenças Vasculares e Função Endotelial FMRP-USP: Fabíola Mestriner, Vinícius Flora, Lígia Campos, Ariel Emiliano, Pedro Bruch, Daniely Franco, Jociany Lopes; do Departamento de Cirurgia e Anatomia: Claudia Sares, Rebeca Figueira, Vanessa Nakagi e Agnes Fagundes; e da vida: Alex Násare, Alan Assunção, Aline Martins, Adailson Dias, Matheus Lima e Vinícius Gonçalves, que me acompanharam e contribuíram muito nessa trajetória.

Às minhas amigas mais chegadas que irmãs, que ganhei de presente nessa jornada: Jessyca Michelin, Marelaine Prandi e Tauana Vasconcelos. Agradecer vocês é pouco perto de tudo aquilo que vocês me proporcionaram sentir e viver junto com vocês. Obrigado por tanto! Amo vocês!

À Cecília Jordani, minha amiga que se dedicou ao máximo para me ajudar nos momentos mais desafiadores. Muito obrigado pela sensibilidade, carinho e dedicação.

Aos queridos professores, que compartilharam experiências e conhecimentos, principalmente à equipe da Cirurgia Vascular, Professores Edwaldo Joviliano e Maurício Ribeiro.

Aos funcionários e amigos do Banco de Tecidos Humanos HCRP-USP: Katia Scarpelini, Rodolfo Bento e Dr. Gustavo Gazoni; ao Hospital das Clínicas FMRP-USP e ao Departamento de Cirurgia e Anatomia, especialmente às secretarias Juliana e Suelen, e aos técnicos Carlos, Daniel, Luciana, Andreia, Clarice e Jorge pela paciência, prontidão e dedicação constantes.

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Capex e FAPESP**, agradeço às agências de fomento por contribuir com meu estudo e formação!

Por fim, a **todos os pacientes e familiares** que fizeram parte desse estudo, com altruísmo e aceitação para essa pesquisa, onde pessoas ajudam pessoas. Obrigado pelo amor e fraternidade.

“Educação não transforma o mundo. Educação muda as pessoas. Pessoas transformam o mundo”
(FREIRE, 1979)

Escrevendo um Currículo

(Wisława Szymborska)

O que é preciso?
É preciso fazer um requerimento
e ao requerimento anexar um currículo.

O currículo tem que ser curto
mesmo que a vida seja longa.

Obrigatória a concisão e seleção dos fatos.
Trocam-se as paisagens pelos endereços
e a memória vacilante pelas datas imóveis.

De todos os amores basta o casamento,
e dos filhos só os nascidos.

Melhor quem te conhece do que o teu conhecido.
Viagens só se for para fora.
Associações a quê, mas sem por quê.
Distinções sem a razão.

Escreva como se nunca falasse consigo
e se mantivesse à distância.

Passe ao largo de cães, gatos e pássaros,
de trastes empoeirados, amigos e sonhos.

Antes o preço que o valor
e o título que o conteúdo.
Antes o número do sapato que aonde vai,
esse por quem você se passa.

Acrescente uma foto com a orelha de fora.
O que conta é o seu formato, não o que se ouve.
O que se ouve?
O matraquear das máquinas picotando o papel.

(SZYMBORSKA; PRZYBYCIEN, 2011)

RESUMO

CORSI, C. A. C. **Investigação do sistema renina angiotensina e mediadores inflamatórios na fisiopatologia do aneurisma de aorta abdominal em humanos: uma abordagem bioquímica e histológica.** 2023. 108 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Introdução: O aneurisma de aorta abdominal (AAA) é uma doença degenerativa progressiva, caracterizada por processo inflamatório crônico, resultante de enfraquecimento gradual da parede da aorta, podendo chegar a ruptura e óbito. O sistema renina angiotensina (SRA) participa de inúmeros processos fisiológicos nos sistemas cardiovascular e renal, além de apresentar importância central na fisiopatologia de doenças vasculares, sendo correlacionado, também, à patogênese e progressão do AAA. Atualmente, nenhum fármaco eficaz foi identificado para o tratamento de AAA a fim de inibir seu crescimento, progressão e/ou risco de ruptura. **Objetivo:** O presente estudo tem como objetivo investigar, de forma bioquímica e histológica, a participação do sistema renina angiotensina e mediadores inflamatórios na fisiopatologia do AAA em humanos. **Metodologia:** Foram coletados fragmentos de aorta de pacientes submetidas a correção aberta do AAA (grupo AAA) no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCRP-USP) e também fragmentos de aorta de pacientes sem AAA (grupo não AAA), diagnosticados com morte encefálica, submetidos à cirurgia de captação de órgãos no mesmo serviço. Os tecidos aórticos foram utilizados para a realização de diferentes abordagens experimentais como cultura primária de músculo liso, *ex-vivo*, análises histológicas e ensaios imunoenzimáticos para citocinas. A primeira etapa do projeto foi a padronização de qual seria a melhor maneira de preservar o tecido aórtico para a realização da cultura primária de músculo liso vascular e os experimentos *ex-vivo*. Os resultados obtidos nessa etapa, na qual foram avaliados a formação de creatinina quinase (CK), razão nitrato e nitrito (NOx), mostraram que o melhor meio para captação e preservação do tecido aórtico foi solução de Custodiol em detrimento das outras soluções, Ringer lactato ou solução salina. Para avaliar a participação do SRA e a relação com os mediadores inflamatórios, foram realizados experimentos *ex-vivo*, onde um fragmento da aorta foi incubado em meio de cultura na ausência e presença de inibidores do SRA. Posteriormente, foram analisados os mediadores inflamatórios, como as interleucinas-(IL-)1, IL-6, IL-8 e IL-10 secretados para o meio de cultura na presença dos inibidores do SRA. Os dados demográficos, também foram coletados, analisados e comparados entre os participantes, traçando o perfil dos pacientes incluídos, bem como foram realizadas análises histológicas. **Resultados e Discussão:** Os achados histológicos indicam diferenças morfológicas entre as aortas com AAA e sem AAA, assim como expressão diminuída de células musculares lisas nas amostras do grupo com AAA em relação ao grupo sem AAA. Os experimentos *ex-vivo* demonstraram as interações nos diferentes alvos do SRA. Os dados sugerem que as aortas com AAA apresentaram aumento tecidual na secreção dos mediadores inflamatórios IL-1, IL-8 e IL-10 em resposta aos inibidores do SRA. Além disso, também foi realizada a cultura primária de músculo liso vascular obtida de aorta de humanos. **Conclusão:** Desta forma, os resultados mostraram a participação e importância dos componentes do SRA influenciando os mediadores inflamatórios locais na fisiopatologia do AAA.

Palavras-chave: Aneurisma de aorta abdominal; Sistema renina angiotensina; cultura celular de músculo liso vascular; Aorta; *ex-vivo*; Interleucinas; Doadores de tecidos humanos; Inibidor da enzima conversora de angiotensina; Bloqueador do receptor de angiotensina 1

ABSTRACT

CORSI, C. A. C. **Investigation of the Renin-Angiotensin System and Inflammatory Mediators in the Pathophysiology of Abdominal Aortic Aneurysm in Humans: A Biochemical and Histological Approach.** 2023. 108f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Introduction: Abdominal aortic aneurysm (AAA) is a progressive degenerative disease characterized by chronic inflammatory processes resulting from the gradual weakening of the aortic wall, which may lead to rupture and death. The renin-angiotensin system (RAS) plays a role in numerous physiological processes in the cardiovascular and renal systems and is centrally important in the pathophysiology of vascular diseases, also being correlated with the pathogenesis and progression of AAA. **Objective:** We sought to investigate how the renin-angiotensin system could modify the inflammatory mediators in the aorta of AAA humans. **Methodology:** Aortic fragments were collected from patients undergoing open AAA correction (AAA group) at the Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCRP-USP), and aortic fragments from patients without AAA (non-AAA group), diagnosed with brain death, undergoing organ procurement surgery in the same service. Aortic tissues were used for various experimental approaches, including primary smooth muscle cell culture, ex-vivo experiments, histological analyses, and enzyme-linked immunosorbent assays for cytokines. The first stage of the project involved standardizing the best way to preserve aortic tissue for primary vascular smooth muscle cell culture and ex-vivo experiments. Data from creatine kinase (CK), nitrate, and nitrite ratio (NO_x) formation showed that the Custodiol solution was the better medium for aortic tissue collection and preservation than other solutions such as lactated Ringer's or saline. To assess the involvement of RAS and inflammatory mediators, ex-vivo experiments were conducted where an aortic fragment was incubated in a culture medium in the absence and presence of RAS agonists and inhibitors, as angiotensin I, angiotensin II, angiotensin 1-7, captopril, chymostatin, losartan, PD123319, A779. Subsequently, inflammatory mediators such as interleukins (IL-1, IL-6, IL-8, and IL-10) secreted into the culture medium in the presence of RAS inhibitors were analyzed. Demographic data were analyzed, and histological analyses were performed. **Results and Discussion:** Primary vascular smooth muscle cell culture was also performed using human aortic tissue. Histological data indicate morphological differences between AAA and non-AAA aortas, and decreased expression of smooth muscle cells in samples of the AAA group compared to the non-AAA group. Ex-vivo data demonstrated interactions at different RAS targets and inflammatory cytokines. These data showed that AAA aortas showed increased tissue secretion of the inflammatory mediators IL-1, IL-8, and IL-10 in response to RAS inhibitors. **Conclusion:** Together, our data showed the involvement and importance of RAS components changing and influencing aorta local inflammatory mediators in AAA pathophysiology.

Keywords: Abdominal aortic aneurysm; Renin angiotensin system; Vascular smooth muscle cell culture; Aorta; Ex-vivo culture; Interleukins; Human tissue donors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema simplificado do SRA.....	14
Figura 2 -	Fotos ilustrativas da manipulação do tecido aórtico em fluxo laminar para realização <i>ex-vivo</i> dos experimentos.....	24
Figura 3 -	Equipamento de criocorte (Leica CM 1.850). B) Tecido sendo cortado, sinalizado em amarelo.....	25
Figura 4 -	Tecidos fixados em lâminas.....	26
Figura 5 -	Desenho experimental <i>ex-vivo</i> , protocolo II em 6 e 12 horas.....	31
Figura 6 -	Metodologia para cultura primária.....	32
Figura 7 -	Determinação da atividade da isoenzima Creatina Quinase (CK-NAC) nas soluções preservantes (Salina, Ringer Lactato e Custodiol) incubados com um fragmento da aorta abdominal humana obtida de pacientes com AAA.....	39
Figura 8 -	Histologia do tecido da aorta abdominal de indivíduos adultos, pertencentes ao Grupo Controle e Grupo AAA, corados em H/E.	40
Figura 9 -	Fotomicrografia da caracterização de alfa-actina no segmento da aorta abdominal de indivíduos adultos, pertencentes ao Grupo Controle e Estudo.....	43
Figura 10 -	Fotomicrografia da caracterização de angiotensinogênio no segmento da aorta abdominal de indivíduos adultos, pertencentes ao Grupo Controle e Estudo.	44
Figura 11 -	Fotomicrografia da caracterização de renina no segmento da aorta abdominal de indivíduos adultos, pertencentes ao Grupo Controle e Estudo.....	45
Figura 12 -	Fotomicrografia da caracterização de ECA no segmento da aorta abdominal de indivíduos adultos, pertencentes ao Grupo Controle e Estudo.....	46
Figura 13 -	Fotomicrografia da caracterização de ECA II no segmento da aorta abdominal de indivíduos adultos, pertencentes ao Grupo Controle e Estudo.....	47
Figura 14 -	Células de VSMCs humanas em cultura.....	49

Figura 15 -	Desenvolvimento de VSMCs subconfluentes (100µm), evidenciando mioblastos proliferativos e multinucleados.....	50
Figura 16 -	Concentração de mediadores inflamatórios no meio de cultura de aortas do grupo controle e grupo AAA, analisados por ELISA.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Tabelas dos anticorpos utilizados na IH.....	28
Tabela 2 -	Características demográficas, sociais e clínicas de todos os pacientes dos grupos AAA e ME.....	36

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 - Padronização e fluxo dos experimentos.....	20
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -SMA	Alfa-actina de Músculo Liso
AAA	Aneurisma de Aorta Abdominal
ADP	Adenosina Difosfato
AIT	Ataque Isquêmico Transitório
Ang	Angiotensina
ANOVA	Análise de Variância
AT1R	Receptor de Angiotensina AT ₁
AT2R	Receptor de Angiotensina AT ₂
ATP	Adenosina Trifosfato
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BSA	Proteína Albumina do Soro Bovino
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CK	Creatina Quinase
CPA	Carboxipeptidase
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindol,2-(4-Amidinofenil)-6-indolecarbamidina
DM	Diabetes Mellitus
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ECA-2	Enzima Conversora de Angiotensina-2
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELA-2	Elastase-2
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
FBS	Soro Fetal Bovino
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
H/E	Hematoxilina/Eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
HCFMRP- USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

HTK	Histidina-Triptofano-Cetogluturato
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
ICC	Insuficiência Cardíaca Congestiva
iECA	Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina
IF	Imunofluorescência
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
IMC	Índice de Massa Corporal
KCl	Cloreto de Potássio
MASR	Receptor MAS
MFI	Média da Intensidade de Fluorescência
MOI	Microscópio Óptico Invertido
NaC ₃ H ₅ O ₃	Lactato de Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NH ₄ Cl	Cloreto de Amônia
NO	Óxido Nítrico
NOx	Razão Nitrato e Nitrito
OPO	Organização de Procura de Órgãos
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride (Fenilmetilsulfonil Fluor)</i>
SEM	Desvio Padrão da Média
SRA	Sistema Renina Angiotensina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF β	Fator de Crescimento Transformador Beta
TNF α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
VSMCs	Cultura Primária de Células do Músculo Liso Vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
1.1	O Sistema Renina Angiotensina (SRA).....	12
2	JUSTIFICATIVA.....	15
3	OBJETIVO.....	16
3.1	Objetivos Específicos.....	16
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
4.1	Abordagem clínica.....	17
4.1.1	População e amostra.....	17
4.1.2	Critério de inclusão.....	18
4.1.3	Critérios de exclusão.....	18
4.1.4	Riscos e confidencialidade.....	18
4.1.5	Desenho experimental de padronização da pesquisa.....	19
4.2	Viabilidade e dosagem da degradação tecidual pré experimentos.....	20
4.2.1	Coleta e processamento da aorta abdominal.....	22
4.3	Histologia.....	25
4.3.1	Coloração de histologia básica - Hematoxilina-Eosina (H/E), em aortas....	26
4.3.2	Imunofluorescência (IH).....	27
4.3.2.1	Análises da IH.....	29
4.4	Cultura celular <i>ex vivo</i>	29
4.5	Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA).....	31
4.6	Cultura Primária de Células Músculo Liso (VSMCs) de aortas abdominais humanas.....	32
4.7	Análises estatísticas.....	33
5	RESULTADOS.....	35
5.1	Dados demográficos e clínicos.....	35
5.2	Dosagem CK-Total.....	39
5.3	Histologia H/E.....	40
5.4	Imunofluorescência (IH).....	41
5.5	Cultura de célula primária de VSMCs.....	48
5.6	Mediadores inflamatórios do meio de cultura em <i>ex-vivo</i>	50
6	DISCUSSÃO.....	53
7	CONCLUSÃO.....	59
	REFERÊNCIAS.....	60
	APÊNDICES.....	71
	ANEXOS.....	75

1. INTRODUÇÃO

O aneurisma de aorta abdominal (AAA) é uma doença degenerativa e progressiva, sendo o tipo mais comum entre os aneurismas das aortas e com mais de 90% dos casos ocorrentes abaixo do nível das artérias renais (DE ASSIS; DUQUE, 2020; JOHNSTON et al., 1991). Caracteriza-se por um processo inflamatório crônico, com depleção de células musculares lisas e degradação da matriz extracelular, comumente resultando em um enfraquecimento gradual e alargamento da parede aórtica com eventual ruptura e alto risco de mortalidade, se não tratado em tempo hábil (DAVIS; RATERI; DAUGHERTY, 2014; LI et al., 2020, p. 20).

Estima-se que a prevalência de AAA é maior entre homens adultos com mais de 60 anos, atingindo em torno de 4 a 8% dessa população (KHOURY; STRANZ; LIU, 2020; LIU et al., 2020). Já entre as mulheres na mesma faixa etária, a prevalência chega de 0,5 a 1,5% (KHOURY; STRANZ; LIU, 2020). A causa mais comum de morte em pacientes com AAA é a ruptura assintomática do aneurisma, sendo essa responsável por aproximadamente 60% da mortalidade e os principais fatores de risco incluem indivíduos do sexo masculino, tabagistas, histórico familiar de doenças vasculares e o envelhecimento natural (ARNAOUTAKIS; UPCHURCH, 2019; KHOURY; STRANZ; LIU, 2020).

No Brasil, a mortalidade por AAA foi estimada entre os anos de 2000 - 2016, com um total de 69.513 óbitos registrados, correspondendo a taxas de 2,45 óbitos por 100.000 habitantes, dentre eles, 65,4% homens e 34,6% mulheres, com 60,6% da população afetada na região Sudeste. A idade média de mortalidade geral foi de 71 anos, sendo 70 anos para homens e 72,5 anos para mulheres. A ruptura do vaso ocorreu em 64,3% dos óbitos em que AAA foi a causa principal e em 18 % quando o AAA foi por causas associadas (SANTO; PUECH-LEÃO; KRUTMAN, 2021).

A patogênese do AAA é complexa e não está totalmente conhecida, porém, sabe-se que os processos de depleção progressiva, alteração celular e tecidual estão associados à inflamação e fibrose dos vasos (ARNAOUTAKIS; UPCHURCH, 2019). Dessa forma, o processo de dilatação da aorta advém de um processo inflamatório crônico cujos desencadeadores parecem ter influência genética, além de apresentarem fatores de risco bem estabelecidos como o tabagismo, hipercolesterolemia, hipertensão arterial essencial, entre outros (AMARAL; FERNANDES; ALVES, 2021; AMBLER et

al., 2015; BARBOSA, 2022), sendo seus diagnósticos comumente achados acidentais, na maioria dos casos assintomáticos (AMARAL; FERNANDES; ALVES, 2021; BARBOSA, 2022; BOESE et al., 2018).

O tratamento do AAA estabelecido é por meio de abordagem cirúrgica, com a inserção de um enxerto intraluminal, via acesso aberto à aorta aneurismática, ou pela correção da aorta por meio de próteses endovasculares (PATEL; DEEB, 2008; WRITING COMMITTEE MEMBERS et al., 2023). Entretanto, ambos procedimentos cirúrgicos por cirurgia aberta ou endovascular são inadequados para tratar fases iniciais da doença, implicando assim, em riscos operatórios potenciais para esses pacientes (GOLLEDGE, 2019).

Nesse sentido, o desenvolvimento de métodos menos invasivos torna-se uma necessidade premente a fim de melhorar a detecção precoce e o tratamento do AAA, os quais poderiam impactar positivamente na evolução dos AAA em situação de risco de ruptura, facilitando uma intervenção profilática precoce e não cirúrgica (SVENSJÖ; BJÖRCK; WANHAINEN, 2014). Entretanto, até o presente momento, nenhuma abordagem eficaz farmacológica e conservadora foi identificada para inibir a progressão ou o risco de ruptura do AAA (POULSEN; STUBBE; LINDHOLT, 2016). Isso decorre, provavelmente, da complexa fisiopatologia das doenças aneurismáticas e da falta de conhecimentos mais aprofundados dos múltiplos mecanismos envolvidos em sua iniciação e expansão (GOLLEDGE, 2019; LIU et al., 2020; YUAN et al., 2021). Portanto, o melhor entendimento da fisiopatologia do AAA é de grande valia e permitirá a caracterização de possíveis alvos farmacológicos, bem como a identificação de biomarcadores.

1.1 O Sistema Renina Angiotensina (SRA)

O SRA participa de inúmeros processos fisiológicos nos sistemas cardiovascular e renal, além de apresentar importância central na fisiopatologia de doenças cardiovasculares (DE GASPARO et al., 2000, 2002; FOUNTAIN; KAUR; LAPPIN, 2023; MARCHESI; PARADIS; SCHIFFRIN, 2008, 2008; WU et al., 2021), sendo relacionado, também, à patogênese do AAA (DAUGHERTY; MANNING; CASSIS, 2000; INVESTIGATORS et al., 2015; POULSEN; STUBBE; LINDHOLT, 2016; WU et al., 2021, 2021).

O SRA é considerado parte do sistema hormonal responsável por participar, dentre outras funções, na regulação da pressão arterial, desempenhando papel importante na homeostase (ZHANG et al., 2018). Inicialmente, o SRA foi descrito como uma cascata de ativação enzimática que se inicia pela liberação da renina oriunda das células justaglomerulares renais no sangue. A renina, por sua vez, entra na circulação sanguínea e, encontra-se com angiotensinogênio circulante, produzido principalmente pelo fígado, convertendo-o em Angiotensina (Ang) I (BADER; GANTEN, 2008; BECARI; OLIVEIRA; SALGADO, 2011). Consecutivamente, a Ang I é metabolizada pelas enzima conversora de angiotensina (ECA), Quimase e/ou Elastase-2 (ELA-2) (BECARI; OLIVEIRA; SALGADO, 2011), presentes principalmente nas células endoteliais, formando então Ang II. Dando continuidade à cascata, a Ang II exerce seus efeitos intracelulares, via ativação dos receptores de angiotensina AT₁ (AT1R) e receptores de angiotensina AT₂ (AT2R), tendo como resposta fisiológica a contração e relaxamento das células musculares lisas (BECARI et al., 2020; BECARI; OLIVEIRA; SALGADO, 2011; ZHANG et al., 2018) e tantos outros efeitos que são induzidos pela ativação do AT1R ou AT2R.

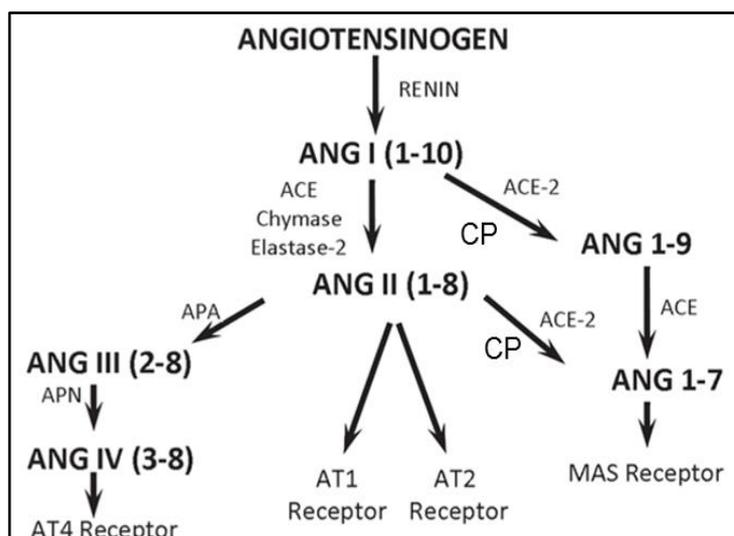
Nesse sentido, dados da literatura científica mostram inúmeras evidências de que a Ang II atua não somente como um hormônio circulante, mas também pode ser formada localmente em vários tecidos, atuando como hormônio autócrino ou parácrino, induzindo amplo espectro de efeitos fisiológicos (BADER; GANTEN, 2008; POULSEN; STUBBE; LINDHOLT, 2016). A Ang II é considerada a principal efetora do SRA e sua ação ocorre, direta e indiretamente, no coração, rins e vasos. Ela é de fundamental importância em processos como vasoconstrição, reabsorção de sódio, liberação de aldosterona, função mitocondrial, trombose, fibrose, hipertrofia, apoptose, dentre outros (INVESTIGATORS et al., 2015; KHOURY; STRANZ; LIU, 2020; RE; COOK, 2010).

Vários trabalhos mostraram que o SRA apresenta uma complexidade muito maior do que se imaginava (figura 1). De fato, emergiu um novo paradigma onde acredita-se que dois eixos principais modulam a função SRA: um eixo deletério composto por ECA, Ang II e AT1R, e outro eixo benéfico composto por ECA2, Ang 1-7 e receptor MAS (MASR) (FERREIRA et al., 2010, 2012; SANTOS et al., 2003b). Além disso, conforme ilustrado na figura 1, outros componentes e enzimas foram bem caracterizados como a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA-2), carboxipeptidase

(CPA) 1 e 2 (CPA2), que clivam Ang I e Ang II, formando Ang 1-9 e Ang 1-7, respectivamente (DONOGHUE et al., 2000; PEREIRA et al., 2012; TIPNIS et al., 2000).

Além da Ang II, outros peptídeos como Ang III, Ang IV e Ang 1-7 apresentam efeitos fisiológicos e fisiopatológicos (CHAI et al., 2004; DE GASPARO et al., 2000; FRAGA-SILVA; FERREIRA; DOS SANTOS, 2013; FYHRQUIST; SAIJONMAA, 2008; SANTOS, 2014). Ang III ativa os receptores AT1R e AT2R induzindo efeitos similares a Ang II nos seus respectivos receptores (BOSNYAK et al., 2011; FYHRQUIST; SAIJONMAA, 2008).

Vários estudos mostraram a participação de outras enzimas, além da ECA, na geração de Ang II, como as serino-proteases sensíveis à quimostatina, como a quimase humana (TAKAI et al., 1996; URATA et al., 1990) e a ELA-2 em ratos e camundongos (BECARI et al., 2005; PAULA et al., 1998; PRATES-COSTA et al., 2022; SANTOS et al., 2003b). Evidências sugerem, inclusive, que a quimase de mastócitos é a principal fonte de aumento de Ang II na AAA (IHARA et al., 1999). Outra importante via para geração de Ang II em ratos e camundongos é realizada pela ELA-2 (BECARI et al., 2017; BECARI; OLIVEIRA; SALGADO, 2011; SANTOS et al., 2003a). Estes aspectos funcionais recentemente descobertos do SRA não apenas expandem a nossa compreensão deste complexo sistema, mas também aumentam a gama de possíveis alvos para o tratamento de doenças cardiovasculares. Nesse sentido, investigar a participação dos componentes do SRA, como os peptídeos e enzimas que geram e degradam essas angiotensinas teciduais em humanos é de grande interesse para o entendimento da fisiopatologia do AAA.

Figura 1: Esquema simplificado do SRA

Fonte: Becari *et al* (2011). **Legendas:** *angiotensinogen* = angiotensinogênio; *renin* = renina; Ang = Angiotensina; *ACE* = Enzima Conversora de Angiotensina; *chymase* = quimase; CP = carboxipeptidase; *MAS Receptor* = Receptor MAS; APA = aminopeptidase A; APN = aminopeptidase N.

O uso dos inibidores da ECA para tratamento de doenças cardiovasculares como hipertensão, insuficiência cardíaca estão bem estabelecidos na literatura (LIU et al., 2015). Hackam, Thiruchelvam e Redelmeier (2006) relataram em um estudo de caso-controle uma associação preventiva entre inibidores da ECA e ruptura em pacientes com AAA. Eles analisaram a população de Ontário (Canadá) e compararam AAAs rompidos com AAAs não rompidos de 1992 a 2002 (HACKAM; REDELMEIER, 2006). Pacientes que receberam inibidores da ECA antes da admissão apresentaram probabilidade significativamente menor de apresentar aneurismas rotos (HACKAM; REDELMEIER, 2006).

Em contraste, vários estudos de coorte sugeriram que não havia associação entre os inibidores da ECA (iECA) com o crescimento de AAA (FERGUSON et al., 2010; SWEETING et al., 2010; THOMPSON et al., 2010). Ensaios clínicos sobre o uso de Losartan em pacientes adultos com síndrome de Marfan, doença genética propensa a degeneração aneurismática, mostraram um efeito notável na redução do aumento do diâmetro em aortas ascendentes (GROENINK et al., 2013; RADONIC et al., 2010).

Alguns estudos apontam que pacientes que utilizam inibidores da ECA têm maior propensão para o crescimento mais rápido de aneurismas, outros estudos, em contraponto, indicam que pacientes que utilizam inibidores da ECA têm menor probabilidade de apresentarem ruptura de aneurismas (SWEETING et al., 2010). Além

disso, ao comparar eficácia de fármacos utilizados em pós-operatórios de pacientes submetidos a cirurgias de AAA, os inibidores do SRA possuíram maior desempenho em comparação aos betabloqueadores, com menor mortalidade e risco de ruptura aneurismática (CHEN et al., 2021; ELSAYED et al., 2023). Ainda, há registros de associações do desenvolvimento e progressão do AAA com o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) *1166A>C* no gene do AT1R e na deleção de *287 pb* (alelo D) no gene da ECA, sendo este encontrado com maior frequência em pacientes com AAA quando em comparação aos pacientes sem AAA (CRKVENAC GREGOREK et al., 2016). Mediante isso, há uma necessidade urgente de estudos que avaliem os benefícios e malefícios dos inibidores da ECA, assim como, uma farmacoterapia eficaz para tratar AAA (SU; GUO; GU, 2022; SWEETING et al., 2010).

Existem dados contraditórios sobre os efeitos benéficos do iECA e antagonista AT1R no AAA em seres humanos e, portanto, são necessários mais ensaios clínicos e estudos laboratoriais e experimentais em modelo animal para o entendimento mais claro sobre a relação entre os inibidores do SRA e AAA (KUROSAWA; MATSUMURA; YAMANOUCHI, 2013).

1.2 Mediadores Inflamatórios Envolvidos nos AAA

O AAA, como já mencionado nesse estudo, é caracterizado como uma doença inflamatória crônica. Na fisiopatologia inicial do AAA, a inflamação na fase aguda é caracterizada por um aumento do fluxo sanguíneo, proporcionando aumento da permeabilidade vascular periférica, aumentando assim, acúmulos de leucócitos e mediadores inflamatórios (citocinas) (AMARAL; FERNANDES; ALVES, 2021). Em fases crônicas, observa-se um infiltrado inflamatório composto por macrófagos, leucócitos, plasmócitos e linfócitos, com liberação de mediadores inflamatórios. Essas respostas imunes e inflamatórias que ocorrem na aorta abdominal são fatores importantes relacionados ao desenvolvimento do AAA. Ainda, infiltração de neutrófilos é observada principalmente em locais de dano ao tecido (DAVIS; GALLAGHER, 2019; DAVIS; RATERI; DAUGHERTY, 2014).

Sabe-se que há diferentes tipos e famílias de citocinas com reações que afetam o sistema imunológico. Dentre as citocinas pró-inflamatórias, destacam-se a interleucina (IL) 1 (IL-1), a interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) (KASASHIMA et al., 2018). Outras citocinas como as interleucina-8 (IL-8),

interleucina-10 (IL-10) e o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) também contribuem no processo inflamatório, aumentando a adesão leucocitária, a síntese de mediadores químicos e a tentativa de reparo tecidual (DAVIS; GALLAGHER, 2019; KUMAR et al., 2019).

Nesse sentido, investigar a participação dos mediadores inflamatórios e a interação com componentes do SRA para o entendimento da fisiopatologia do AAA em humanos foi um dos objetivos deste estudo.

1.3 Ferramentas experimentais *ex-vivo* e *in-vitro* para estudar a fisiopatologia do AAA

1.3.1 *Ex-vivo*

Modelos teciduais vasculares *ex-vivo* que se assemelham aos processos fisiológicos, patológicos e estruturais dos tecidos *in vivo*, são ferramentas importantes para estudar a fisiopatologia do AAA, além de aproximarem-se muito de uma abordagem terapêutica translacional. Tais investigações devem mimetizar as condições encontradas em aortas nativas *in vivo*, com condições semelhantes de respostas fisiológicas intra/extracelulares e ativação de receptores por meio de agonista e antagonistas (CHEN et al., 2021).

O desenvolvimento de protocolos de bioengenharia de tecidos humanos contribui para a compreensão da morfologia celular, fisiologia e patologias associadas e novos estudos para tratamentos e intervenções farmacológicas (CHEN et al., 2021; DINARDO et al., 2014). Portanto, soluções de preservação tecidual em isquemia fria são importantes para preservar ou reparar danos teciduais, evitando consecutivamente edema, acidose, danos associados aos radicais livres e depleção tecidual (CORNER; BERWANGER; STANSBY, 2003; GARBE et al., 2011; SZILÁGYI et al., 2018). Para tanto, o sucesso dessas ferramentas depende de fatores importantes para o seu desenvolvimento, principalmente quanto à utilização de produtos e insumos que mantenham a vitalidade *in vitro* de células/tecidos *in vivo* (SMECELLATO et al., 2020).

A primeira etapa para a realização do estudo *ex-vivo*, é a definição da melhor maneira de captar, transportar e preservar o tecido aórtico humano e, nesse sentido, inúmeras soluções conservantes vêm sendo utilizadas para a preservação e transporte de

órgãos e tecidos para doação e transplantes (GATTI et al., 2020). As soluções comerciais utilizadas para esse fim incluem: Solução Fisiológica a 0,9% (Salina), Solução de Ringer Lactado (Ringer) e Solução de Histidina-Triptofano-Cetogluturato (HTK/Custodiol®) (BEKKELUND, 2020; COSENZA et al., 2013; GATTI et al., 2020; SMECELLATO et al., 2020).

Essas soluções são amplamente necessárias e utilizadas para transplantes de órgãos e tecidos, principalmente por apresentarem fatores de proteção, menor viscosidade, custos reduzidos, entre outros fatores (GATTI et al., 2020; SHERIFOVA; HOLZAPFEL, 2019; SMECELLATO et al., 2020). A escolha de meios de preservação específicos para o transporte, pré-cultura, baseou-se principalmente em estudos encontrados na literatura atual relacionados à fosforilação oxidativa através de parâmetros envolvidos na respiração e permeabilidade mitocondrial, além de determinações da capacidade de oxigenação, integridade morfológica, apoptose e presença de óxido nítrico (NO) em tecidos, utilizando essas soluções (COSENZA et al., 2013; SHERIFOVA; HOLZAPFEL, 2019; SMECELLATO et al., 2020).

No entanto, a importância dessas soluções para a obtenção de amostras para experimentos *ex-vivo* e culturas celulares não está completamente demonstrada, principalmente na aorta aneurismática (CHEN et al., 2021; DINARDO et al., 2014). Sendo assim, a avaliação e comparação das soluções Salina, Ringer e HTK como soluções de preservação do tecido do aneurisma da aorta abdominal humana são de grande valia e ainda necessitam ser comparadas (CORSI et al., 2023), para a proteção de lesões teciduais na manutenção e transporte da aorta abdominal humana, melhorando assim os experimentos *ex-vivo*.

1.3.2 *In vitro* - Cultura primária do músculo liso vascular

Outra parte importante dos desenhos experimentais atuais utilizados em pesquisas básicas como ferramentas para estudar doenças vasculares são as culturas celulares (CHEN et al., 2021; CORSI et al., 2023). A vasculatura da aorta desempenha funções essenciais na homeostase do corpo, assim entender o funcionamento fisiológico e as patologias vasculares em humanos é fundamental para identificar possíveis alvos terapêuticos para o tratamento e/ou cura de tais doenças (DINARDO et al., 2014). Os tratamentos farmacológicos podem inibir eficazmente o crescimento e a progressão de

várias patologias cardiovasculares. No entanto, quando se trata de determinadas doenças como os aneurismas da aorta abdominal, a complexidade no estudo e utilização de fármacos específicos aumenta, principalmente por se tratar de doenças com múltiplos mecanismos desencadeantes envolvidos na sua patologia que podem ser locais e/ou sistêmicos, genéticos, celulares e humorais, dificultando assim possíveis tratamentos e curas (INVESTIGATORS et al., 2015; LI et al., 2020).

Os modelos de tecidos humanos experimentais *in vitro*, que se assemelham aos processos fisiológicos, patológicos e estruturais dos tecidos *in vivo*, ainda são escassos e mais estudos são necessários para desenvolver e padronizar técnicas que proporcionem ambientes semelhantes à fisiologia da vasculatura humana (SHERIFOVA; HOLZAPFEL, 2019). O desenvolvimento de protocolos e ferramentas para estudar alterações cardiovasculares pode contribuir para a compreensão da biologia e fisiopatologia vascular e possíveis tratamentos farmacológicos para doenças cardiovasculares (DINARDO et al., 2012, 2014). Os seus mecanismos e propriedades celulares realizam a manutenção hemodinâmica e regulatória *in vitro*, sendo possível averiguar a angiogênese do músculo liso, bem como o enrijecimento cardiovascular senescente, a perda de elasticidade e a complacência da parede do vaso em condições patológicas (CHEN et al., 2021; DINARDO et al., 2012).

A cultura primária de células do músculo liso vascular (VSMC) *in vitro* foi demonstrada anteriormente em algumas espécies: ratos, porcos e cães (DINARDO et al., 2012; KWARTLER et al., 2016; OOSTERHOFF et al., 2019; VANERIO et al., 2020). No entanto, os protocolos para estabelecer uma VSMC primária viável da aorta humana são escassos (LIU et al., 2020; MEEKEL et al., 2018). Embora as abordagens animais sejam essenciais para estudar metodologias, elas podem ser incapazes de manter as funções complexas do tecido aórtico humano em todas as suas funções e remodelação constante do tecido (LIU et al., 2020; SHERIFOVA; HOLZAPFEL, 2019). Portanto, uma abordagem terapêutica translacional pode ser capaz de melhorar a total compreensão desses aspectos, os quais, em uma perspectiva futura, possibilitem diagnósticos mais efetivos nos tratamentos farmacológicos vindouros (MEEKEL et al., 2018; OOSTERHOFF et al., 2019). Assim, neste estudo, também, foi estabelecido um protocolo para o crescimento e manutenção das VSMC primárias obtidas de aortas humanas.

Portanto, torna-se necessária a identificação de novos mecanismos moleculares e bioquímicos envolvidos na patologia do AAA, o que permitirá uma melhor

compreensão de sua fisiopatologia e, em uma perspectiva futura, possibilitando diagnósticos mais efetivos e menos invasivos, assim como a possibilidade de novos tratamentos farmacológicos.

Assim, a hipótese do presente estudo é que a inibição das enzimas e receptores do SRA levará a alteração das interleucinas inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8 e IL-10) no tecido aneurismático da aorta abdominal, constituindo, portanto, marcadores e/ou agentes envolvidos nos processos de desenvolvimento do AAA.

Em conjunto, o presente projeto tem como objetivo avaliar a participação e importância dos componentes do SRA influenciando os mediadores inflamatórios locais na fisiopatologia do AAA.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi avaliar a participação e importância dos componentes do SRA influenciando os mediadores inflamatórios locais na aorta abdominal na fisiopatologia do AAA em humanos.

2.1 Objetivos Específicos

1. Analisar os dados clínicos e demográficos de pacientes portadores de AAA e pacientes sem AAA;
2. Analisar e padronizar a melhor maneira de captação, preservação e manutenção das aortas humanas pela comparação de diferentes soluções preservantes;
3. Padronizar e realizar cultura primária de células de músculo liso vascular (VSMCs) de aorta abdominal humana;
4. Caracterizar e comparar histologicamente as aortas abdominais obtidas de pacientes com AAA e pacientes sem AAA;
5. Quantificar a secreção tecidual de mediadores inflamatórios (IL-1, IL-6, IL-8 e IL-10) nos meios de cultura pela incubação das aortas *ex-vivo* com e sem AAA, na presença de agonistas e antagonistas do SRA.

3. METODOLOGIA

A metodologia serão apresentadas em:

3.1 População e amostras;

3.2 Dados demográficos e clínicos dos pacientes;

3.3 Padronização do protocolo de captação e manutenção das aortas humanas;

3.4 Cultura Primária de Células de Músculo Liso Vascular (VSMCs) de aorta abdominal humana;

3.5 Análises histológicas das aortas obtidas de pacientes com AAA e sem AAA;

3.6 Cultura ex-vivo;

3.7 Análises estatísticas

3.1 População e amostra

O presente trabalho caracteriza-se como um estudo observacional, com aplicação de tratamentos diversos em amostras de aortas abdominais oriundas de pacientes submetidos à cirurgia para correção do AAA (grupo AAA) e pacientes diagnosticados com morte encefálica (grupo sem AAA ou não AAA). O recrutamento das participantes, assim como a coleta de dados, foi realizado a partir do mês de setembro de 2019 até julho de 2022.

O presente estudo integra-se a um projeto de pesquisa abrangente, intitulado: “Contribuição do Sistema Renina Angiotensina na Fisiopatologia do Aneurisma de Aorta Abdominal”, desenvolvido no Laboratório de Doenças Vasculares e Função Endotelial do Departamento de Clínica Cirúrgica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, onde se objetivou selecionar dois grandes grupos de pacientes, sendo: 1) pacientes submetidos à cirurgia para correção do AAA (grupo AAA) e de pacientes diagnosticados com morte encefálica (sem AAA). Os pacientes do grupo AAA consentiram e assinaram o termo de consentimento livre esclarecido (Anexo A). Os pacientes do grupo controle participaram

do estudo com o consentimento da família e/ou responsável que assinaram e concordaram com o termo de consentimento livre esclarecido (Anexo B).

Os pacientes foram selecionados por amostragem de conveniência, onde os pesquisadores selecionaram os membros (pacientes) da população no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo [HCFMRP-USP], com perfil de inclusão para as coletas e aceitação de participação na pesquisa. Este projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP (CAAE: 82879518.6.0000.5440) (Anexo C).

3.1.1 Amostras

Foram captadas aortas obtidas dos pacientes pertencentes ao grupo sem AAA e do grupo AAA. A fim de construir um grupo controle (sem AAA) mais homogêneo, dentre as amostras captadas e armazenadas no Biorrepositório, houve o cuidado de selecionar para a realização dos experimentos as amostras de pacientes que não obtiveram diagnóstico de óbito decorrente de doenças vasculares, como o Acidente Vascular Cerebral (AVC). Sendo assim, as amostras foram selecionadas após a captação e estão apresentadas por experimentos, a seguir:

1. Análises de creatina quinase (CK) e razão nitrato e nitrito (NOx) para padronização do protocolo de captação e manutenção das aortas humanas: utilizando-se apenas do grupo AAA, os experimentos incluíram dosagem de CK (n = 4), NOx (n = 6) e imunofluorescência (IF) (n = 3).
2. Cultura de VSMCs: amostras de pacientes sem AAA (n=10).
3. Histologia por Hematoxilina/Eosina (H/E) e Imunofluorescência (IF): pacientes com AAA (n=9) e pacientes sem AAA (n=9).
4. Cultura *ex-vivo*: para estudo *ex-vivo* foram utilizadas aortas obtidas de pacientes com AAA (n=8) e pacientes sem AAA (n=7).

3.1.2 Critérios de inclusão do estudo

Grupo sem AAA: foram incluídos pacientes com diagnóstico de morte encefálica, elegíveis como potenciais doadores de órgãos e tecidos para doação e

transplante. Todos os casos foram recrutados pela Organização de Procura de Órgãos (OPO) e Banco de Tecidos Humanos do HCFMRP - USP, após autorização por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelos familiares do doador (Anexo B).

Grupo AAA: foram incluídos pacientes com diagnóstico de AAA infrarrenal de etiologia degenerativa elegíveis para correção cirúrgica aberta convencional, respeitando as indicações de tratamento vigentes na atualidade. Todos os casos foram recrutados do Ambulatório de Cirurgia Vascular e Endovascular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, após autorização por meio da assinatura do TCLE pelo paciente (Anexo A).

3.1.3 Critérios de exclusão

Grupo sem AAA: foram excluídos pacientes que apresentassem AAA como causa morte laudada e/ou identificação desta patologia durante o ato cirúrgico de captação.

Grupo AAA: foram excluídos indivíduos com aneurisma roto, com aneurisma em qualquer outro território arterial que não na aorta infrarrenal.

3.1.4 Riscos e confidencialidade

Riscos: Os riscos esperados envolvem o manuseio de dados de identificação dos participantes e com relação a coleta dos tecidos. Quanto ao primeiro, foram tomadas todas as medidas para se preservar o sigilo e a confidencialidade dos dados. Os dados foram acessados apenas pelos pesquisadores cadastrados e todas as formas de comunicação científica dos resultados previstos não levaram qualquer dado que possa identificar algum participante. Quanto à coleta de amostra de aorta, esse estudo não trouxe risco adicional aos indivíduos daquele já existente do procedimento de correção cirúrgica de AAA.

Confidencialidade: A garantia de sigilo dos dados, o direito da confidencialidade dos dados e respeito à privacidade foi assegurado de acordo com as normas brasileiras.

Os tubos coletados foram numerados, sendo de conhecimento exclusivo do pesquisador principal a que paciente correspondeu o número identificador.

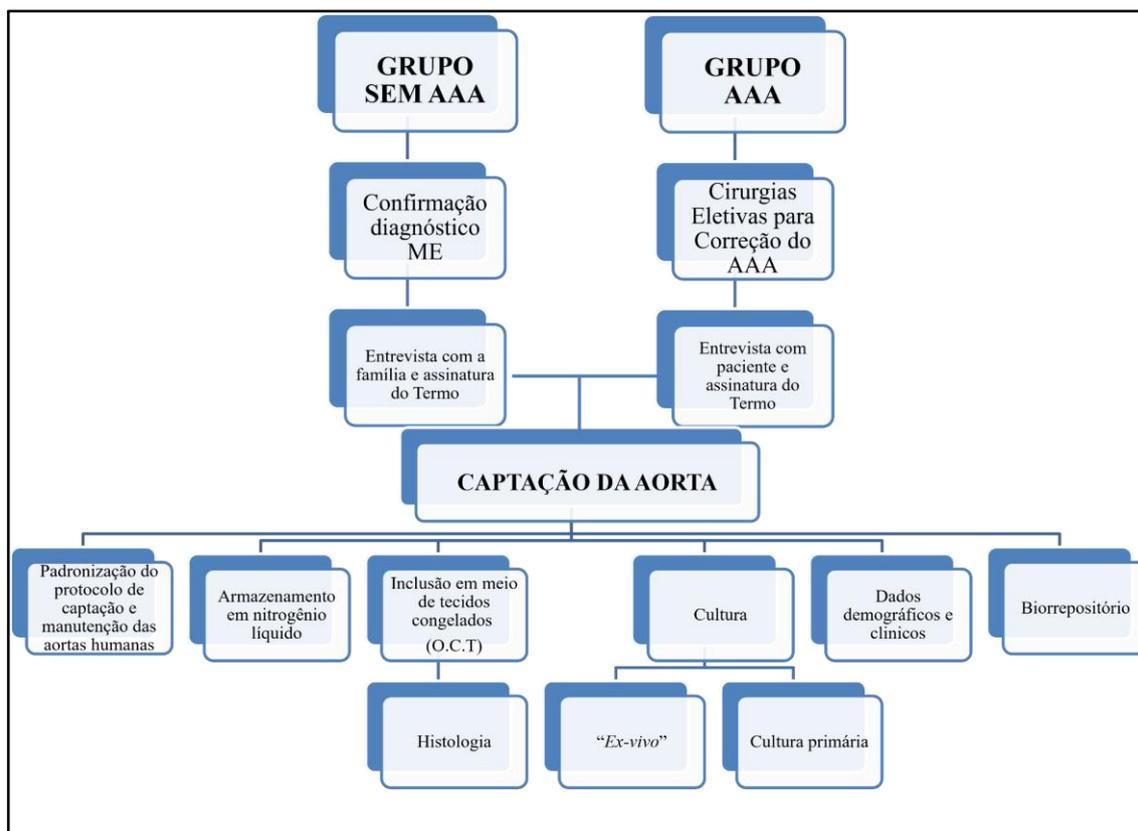
3.2 Dados demográficos e clínicos

Os dados demográficos e clínicos foram obtidos através do banco de dados digital do hospital pela análise dos prontuários. Os parâmetros analisados foram: idade; sexo; raça; tabagismo (atual ou passado); hipertensão (HAS); sobrepeso (índice de massa corpórea (IMC) $>25\text{kg/m}^2$); doença arterial coronariana; doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC); infarto do miocárdio (IAM); doença arterial periférica; diabetes mellitus (DM); insuficiência cardíaca congestiva (ICC); arritmia; AVC; uso de iECA, uso de antagonista do receptor de Ang II; uso de beta-bloqueadores; uso de bloqueador dos canais de cálcio; uso de diuréticos e; mortalidade na cirurgia. Os dados foram coletados, organizados e analisados em tabelas.

3.2.1 Desenho experimental da pesquisa

O processo de coleta das amostras, começou com a notificação e triagem, conforme os critérios estabelecidos, do potencial doador (nos casos do grupo sem AAA) e/ou com a confirmação da cirurgia de correção de AAA, pela equipe de Cirurgia Vascular ou pelo Sistema de Comunicação Hospitalar Interno do HCRP (CIH-HCRP). Sendo assim, após contato e consentimento, o termo foi assinado e os pacientes foram incluídos na pesquisa. Foram realizadas as coletas de aortas para a realização de diferentes protocolos experimentais, a saber: análises histológicas, bioquímicas e culturas celulares (*ex-vivo* e cultura primária), conforme ilustrado no Fluxograma 1.

Fluxograma 1: Padronização e fluxo dos experimentos.



Fonte: do autor, 2023.

3.3 Padronização do protocolo de captação e manutenção das aortas humanas

A primeira etapa deste projeto foi estabelecer um protocolo de captação e manutenção das amostras de aortas humanas obtidas durante a cirurgia de forma acondicionada e segura, colocando-as em líquido preservante específico para manter a viabilidade das amostras para serem usadas nos diferentes protocolos experimentais, especialmente as culturas celulares. Após retirada da aorta do paciente, as aortas foram colocadas em tubo com líquido preservante e transportadas para o laboratório em caixa térmica de transporte com temperatura mantida a temperatura de 2 a 8°C.

Por se tratar de um tecido fresco, com mecanismos de manejo e de degradação ainda pouco descritos na literatura, muitos dos ensaios de incubação não progrediram de forma satisfatória no primeiro momento deste trabalho. Sendo assim, foram necessários

ensaios prévios de testagens e padronização, no qual foram incubados fragmentos da aorta abdominal em 3 diferentes soluções preservantes (descritas abaixo). Além disso, também foi avaliado e padronizado diferentes tempos (0, 6, 24 e 48 horas) de preservação e manutenção das aortas nas diferentes soluções para evitar degradação tecidual.

A escolha de determinados meios de cultura para transporte se deu, principalmente, por intermédio da descrição de seus benefícios encontrados e comparados na literatura atual, assim como, pela disponibilidade, fácil acesso e custo/benefício destes produtos *in loco* no centro cirúrgico e/ou no laboratório. As soluções preservantes testadas foram:

1. Solução Fisiológica 0,9% (Salina), composição: 9 mg/mL Cloreto de Sódio (NaCl) (Sódio (Na⁺): 154 mEq/L + Cloreto (Cl⁻): 154 mEq/L) + 1 mL de Água para injeção (q.s.p).
 - Solução repositora de água, eletrólitos e controle de alcalose metabólica com osmolaridade de 308 mOsm/L e pH: 4,5 – 7,0 (BEKKELUND, 2020).
2. Solução de Ringer com Lactato (Ringer), composição: Cada 100 mL contém: 0,6 g Cloreto de Sódio (NaCl) + 0,03 g de Cloreto de Potássio (KCl) + 0,02 g de Cloreto de Cálcio (CaCl₂) + 0,32 g Lactato de sódio (NaC₃H₅O₃) + Água para injeção (q.s.p).
 - Solução de reidratação repositora e restabelecimento do equilíbrio hidroeletrólítico, quando há perda de líquidos e de íons cloreto, sódio, potássio e cálcio. Profilaxia e tratamento da acidose metabólica com osmolaridade de 274,4 mOsm/L e pH: 6,0 – 7,5 (COSENZA et al., 2013).
3. Histidina-Triptofano-Cetoglutarato (HTK) (Custodiol®) (Pharma, Newtown, PA, USA), composição: 15 mEq/L de Sódio + 10 mEq/L de potássio + 0,015 mmol/Kg de Cálcio.
 - Solução cardioplégica intracelular para preservação de órgãos, em forma de cristalóide com baixa concentração de sódio e cálcio, atuando na depleção de sódio dos espaços extracelulares e causando a hiperpolarização da membrana plasmática dos miócitos, favorecendo assim proteção à isquemia (GATTI et al., 2020). Amplamente utilizada no transporte de órgãos para transplante.

Após a incubação da aorta em diferentes meios e tempos, foram coletadas as soluções e realizadas as quantificações de creatinina quinase (CK), um marcador de injúria tecidual, e a medida indireta de formação de óxido nítrico pela quantificação de nitrito e nitrato, um marcador de hipóxia (DWEIK et al., 1998; LUNDBERG et al., 2009; LUNDBERG; WEITZBERG; GLADWIN, 2008; WALTZ et al., 2015). Tais métodos de investigação são utilizados como diagnóstico para marcação de lesão tecidual, como descrito na literatura (BEKKELUND, 2020; DWEIK et al., 1998; ZWIRNER et al., 2021). Além disso, para caracterizar e avaliar a integridade morfológica do tecido, foram realizados ensaios de IF com dupla marcação para alfa-actina do músculo liso vascular e marcação para núcleo com 4',6-Diamidino-2-fenilindol, 2-(4-Amidinofenil)-6-indolecarbamidina (DAPI).

3.3.1 Quantificação de Creatina Quinase

O ensaio de atividade da CK foi realizado pelo método de ensaio cinético Ultravioleta – UV (340 nm) para uso diagnóstico *in vitro*, com o auxílio do aparelho CELM SB-190 como analisador semiautomático e o protocolo foi feito conforme a instrução do kit CK-NAC (*LabTest* - nº Ref: 117-2/30, MG, Brasil). No aparelho, a CK catalisa a fosforilação da Adenosina Difosfato (ADP), obtendo a creatina e a Adenosina Trifosfato (ATP). A concentração catalítica é determinada ao empregar reações associadas de hexoquinase e glicose-6-fosfato, a partir da velocidade de formação da Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADPH), medida por incremento de absorvância a 340 nm, sendo esta proporcional à quantidade de CK existente na amostra. Os valores séricos ou plasmáticos de referência em humanos são de 26 a 189 U/L para homens e 26 a 155 U/L para mulheres.

3.3.2 Análise de Nitrato e Nitrito

A investigação de NO_x trata-se de uma análise indireta da formação do NO (radical livre gasoso e inorgânico presente nos processos intracelulares e extracelulares). O NO desempenha papel fundamental no sistema vascular com ação na angiogênese tecidual (BOUCHEMI et al., 2020; MATOS; GURGEL; CALLOU, 2019, 2019). As

amostras das soluções de preservação foram coletadas nos tempos correspondentes a 4°C e armazenadas a -80°C para a determinação do NO_x que foi realizada por quimioluminescência NO/Ozônio. A amostra (5µL) foi injetada na câmara de reação contendo o agente redutor (cloreto de vanádio 0,8% em HCl 1N) a 80°C, que converte o nitrato em óxido nítrico em quantidades equimolares. O óxido nítrico é dragado pelo gás nitrogênio para a câmara de quimioluminescência do Sievers NO Analyzer (Sievers 280i NOA, Sievers, Boulder, CO, EUA) onde ocorreu sua reação com o ozônio, emitindo luz vermelha: $\text{NO} + \text{O}_3 \rightarrow \text{NO}_2 + \text{O}_2$; $\text{NO}_2 \rightarrow \text{NO}_2 + \text{hv}$. O fóton emitido pela reação é detectado e convertido em sinal elétrico e analisado no computador. A área sob a curva gerada pela corrente elétrica corresponde à concentração de óxido nítrico da amostra. A concentração de NO_x foi calculada através de uma curva utilizando-se nitrato de sódio (100 a 1µM) como padrão. Os resultados obtidos foram expressos em µM (DWEIK et al., 1998).

3.3.3 Processamento da Aorta Abdominal

Após a captação da aorta de ambos os grupos, o tecido aórtico foi retirado após ablação cirúrgica, lavado imediatamente com Solução Salina Fisiológica (SF 0,9%) e imerso em solução de Custodiol® para transporte até o laboratório, mantendo-se refrigerado em temperatura entre 2 e 8°C. No laboratório, sob a câmara de fluxo laminar Bio Seg 12 – Classe II (Grupo VECO, Campinas, São Paulo, Brasil), com técnica asséptica, o tecido foi dissecado com auxílio de uma lâmina de bisturi, seguindo o sentido sagital/longitudinal da aorta, dividindo-a em seis partes de aproximadamente 2×2 mm, com preservação da espessura total da parede aórtica. O fragmento foi distribuído em 6 partes para que fosse possível realizar os experimentos propostos (fluxograma 1). Portanto, três fragmentos foram colocados em nitrogênio líquido (ebulição a 77 K [-196,15°C]) e guardados no Biorrepositório; um fragmento imerso em solução de meio inclusão para tecidos congelados (O.C.T), que foi destinado à técnica de histologia: H/E e/ou IF. (Figura 2). As outras duas partes do tecido foram destinadas para realização dos experimentos de culturas de células do músculo liso e “*ex-vivo*” (Figura 2). Estes protocolos estão descritos nos tópicos “Cultura ‘*ex vivo*’” e “Cultura primária de VSMCs”. Na figura 2 apresentamos um exemplo dos experimentos *ex vivo*’

As amostras também foram identificadas e catalogadas em caixa própria,

separadas por número (exemplo: D01ME para o grupo sem AAA e D01AAA para o grupo AAA) e armazenadas em ultrafreezer Thermo Scientific, modelo 706 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) a -80°C , sendo anotadas todas as informações no “Livro de Registro do Biorrepositório”, do Laboratório de Doenças Vasculares e Função Endotelial da FMRP-USP.

Figura 2: Manipulação do tecido aórtico em fluxo laminar para realização dos experimentos em *ex-vivo*.



Fonte: do autor, 2023.

A) Fragmento de aorta abdominal humana; B) Fracionamento do tecido e preparo da placa de cultura com DMEM GlutaMAX, enriquecido com Soro Fetal Bovino a 10% (FCS, Life Technologies) + L-Glutamina 584 mg/L (Gibco) + Solução antimicrobiana, Gentamicina 10 mg/mL (Life Technologies) + Solução antifúngica, Fungizone 250 ug/mL (Gibco); (C) placa com meio de cultura com fragmento de aorta na presença e ausência de diferentes drogas.

3.4 Cultura Primária de Células de Músculo Liso Vascular (VSMCs) de aorta abdominal humana

Para a realização da cultura primária de células humanas, as aortas foram mantidas em solução de Custodiol® até o momento de processamento. Após fragmentação da aorta abdominal humana, esta foi incubada em meio de cultura enriquecido em placa de Petri estéril durante 24 horas. Posteriormente, o fragmento de aorta foi retirado e o crescimento das VSMCs foi acompanhado diariamente durante 20 a 25 dias.

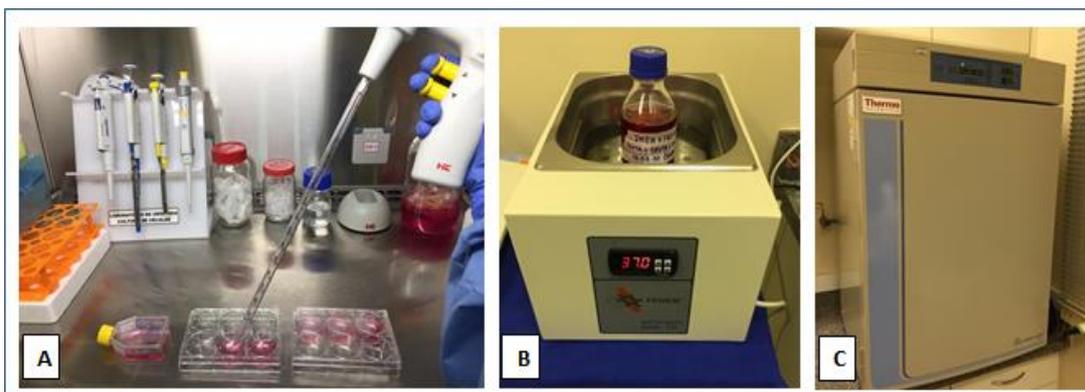
As VSMCs foram cultivadas em placas de cultura esterilizadas, pré-revestidas com gelatina a 0,1% (Sigma – Aldrich, Saint Louis, MO, Estados Unidos [EUA]) e em meio de crescimento de células DMEM GlutaMAX, enriquecido com Soro Fetal Bovino a 10% (FBS, Life Technologies) + L-Glutamina 584 mg/L (Gibco) + Solução antimicrobiana, Gentamicina 10 mg/mL (Life Technologies) + Solução antifúngica, Fungizone 250 ug/mL (Gibco). As placas de culturas foram incubadas em estufa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) a 37 °C com 5% de CO₂. (Figura 3 A, B e C).

O meio de cultura foi trocado em intervalos de 5 a 6 dias. As transferências de células de um recipiente para outro maior (passagem celular) foram utilizadas nas soluções de tripsina (0,05%) e solução salina balanceada de Hanks (Sigma – Aldrich, Saint Louis, MO, Estados Unidos). Primeiramente, o meio de cultura foi retirado dos poços das placas, onde estavam as células, sendo os mesmos lavados com solução salina balanceada de Hanks. Após, foi inserido 5 mL de solução de tripsina (0,05%) levando novamente a placa para estufa e esperando por 5 minutos. Em seguida, a placa foi retirada da estufa e a confirmação do desprendimento das células se deu por meio de análise óptica em MOI (Nikon®).

Isso feito, a placa foi colocada novamente sob fluxo laminar, sendo retirados os 5 mL de Tripsina juntamente com as células em suspensão, colocando-os em tubo Falcon de 15 mL e completando com 10 mL de meio de cultura. O tubo foi centrifugado por 10 minutos a 1000 rotações por minuto (RPM). Após, todo o líquido sobrenadante foi retirado, deixando apenas o sedimento tecidual (“*pellet*”) contido no fundo do tubo, onde as células estavam mantidas, sendo adicionado novamente 10 mL de meio de cultura enriquecido, agitando delicadamente. Parte dessa solução (200 µL) contendo as células foi separada e transferida para um eppendorf, onde acrescentou-se ao mesmo, 200 µL de solução de azul Trypan (0,4%) (Thermo Fisher Scientific - Waltham, Massachusetts, EUA), para a contagem celular. Incubando por 10 minutos esse homogenato de células, o conteúdo foi transferido para uma câmara de Neubauer (Sigma – Aldrich, Saint Louis, MO, Estados Unidos), onde se contou as células nos 8 quadrantes da câmara, chegando ao volume total celular por mL, semeando assim a cultura novamente, em uma placa maior.

O controle de crescimento e expansão celular das VSMCs foi realizado por meio de observação morfológica utilizando Microscópio Óptico Invertido (MOI) (Nikon®), e foi também realizado a contagem do crescimento celular.

Figura 3: Metodologia para cultura primária. A) Preparo da placa; B) Aquecimento do meio de cultura em Aparelho de Banho Maria e C) Estufa 37 ° C com 5% de CO₂.



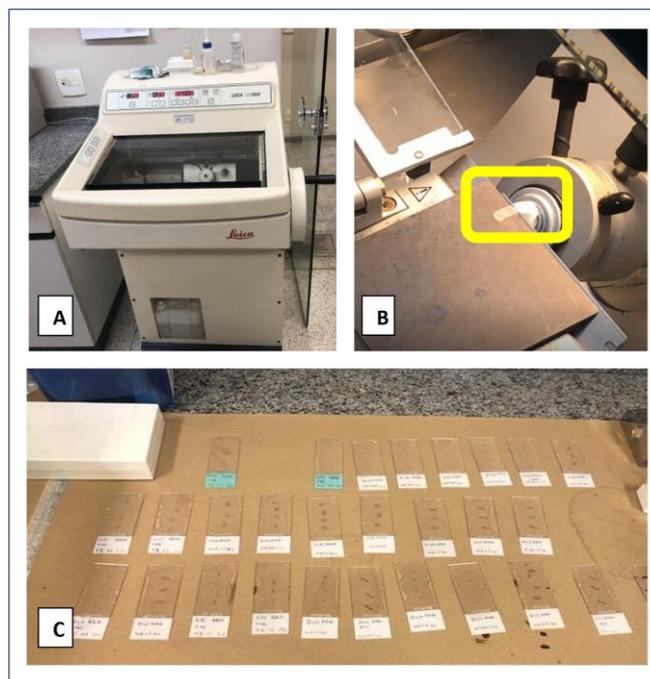
Fonte: do autor, 2023.

3.5 Análises histológicas das aortas obtidas de pacientes com AAA e sem AAA

A histologia foi realizada com o objetivo de investigar e comparar as alterações histológicas e morfológicas presentes nas aortas abdominais de pacientes com AAA em relação aos pacientes sem AAA. Foram realizadas análises histológicas para aortas do Grupo sem AAA e aortas do Grupo AAA. Após separação do tecido para inclusão em O.C.T., empregou-se a técnica de fixação, da seguinte maneira: previamente adicionou-se o solvente (O.C.T) em uma embalagem de comprimido vazia e, após, o tecido foi adicionado, orientando-o de forma que o endotélio se fixasse acima da abertura, cobrindo-o completamente com O.C.T. Colocou-se, então, a embalagem com o tecido no freezer -20°C por 3 horas e, após, armazenou-a em freezer a -80°C, até o momento do corte. Os cortes histológicos foram realizados no equipamento de criocorte (Leica CM 1.850) (Figura 4) em temperatura a -20°C, com 6 µm de espessura. Posteriormente, aproximou-se a lâmina de vidro sinalizada para aderência da amostra (Figura 4) e as lâminas foram mantidas refrigeradas a -20°C.

As lâminas com cortes histológicos obtidas das aortas foram utilizadas para realizar a coloração hematoxilina e eosina (H/E) e também foram e outras utilizadas para IF para alfa-actina e CD68.

Figura 4: Criocorte de lâminas para histologia



Fonte: do autor, 2023.

A) Equipamento de criocorte (Leica CM 1.850); B) Tecido sendo cortado, sinalizado em amarelo. C) Tecidos fixados em lâminas

3.5.1 Histologia coloração - Hematoxilina-Eosina (H/E)

Foram realizadas colorações com H/E, na qual a coloração observada em roxo/azul pela hematoxilina são os núcleos celulares e outras estruturas de natureza ácida, e as coradas em rosa pela eosina, são citoplasma e colágeno (do material extracelular).

Com auxílio de uma pipeta, foi aspirado em média de 2 a 3 mL de Acetona 60% (solução PA) e aspergido sobre as lâminas deixando-a por 10 minutos e após colocou-se as lâminas em um suporte (barca de lâminas), mergulhando-as em 30 mL de solução tampão de fosfato-salino (PBS 1x) por 5 minutos. Após 15 minutos, mergulhou-se as lâminas em 30 mL de hematoxilina por 10 min, lavando em água corrente por 10 minutos.

Feito isso, mergulhou-se as lâminas em 30 mL do corante Eosina por 2 minutos, enxaguando em H₂O destilada para retirada do excesso de Eosina, por 10 minutos. Sendo assim, foi observado em microscópio ótico comum (40x) rigorosamente esse tempo, para que os corantes não manchassem o tecido.

Concluída essa primeira etapa, mergulhou-se as lâminas em 30 mL de Etanol 70% por 10 minutos, seguidos de 30 mL de Etanol 100% por 10 minutos, 30 mL de Xilol 1 por 10 minutos, 30 mL de Xilol 2 por 10 minutos e 30 mL de Xilol 3 por 10 minutos, consecutivamente, até fixação dos colorantes nas lamínulas. Feito isso, as lâminas permaneceram secando por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se uma gota de Entellan em cada fragmento de aorta na lâmina e em sequência deslizou-se a lamínula sobre a lâmina a fim de retirar as bolhas de ar e o excesso do produto, deixando secar por 24 horas. Posteriormente, as lâminas foram limpas, estando sinalizadas e prontas para análise. As análises morfológicas foram realizadas e fotografadas em microscópio ótico invertido (Nikon®).

3.5.2 Imunofluorescência (IF)

O protocolo de IF foi estabelecido conforme descrito a seguir: adicionou-se aproximadamente 2-3 mL de acetona 60% (solução PA) e aspergiu-se sobre as lâminas deixando-a por 10 minutos e após lavou-as com por 2 vezes com 3 mL de solução tampão PBS, esperando por 5 minutos. Feito isso, adicionou-se de 3-4 mL de Cloreto de Amônia (NH₄Cl) deixando descansar por 5 minutos, lavando a seguir 5x com com PBS. Feito isso, incubou-se as lâminas com 4 mL de Interação da Proteína Albumina do Soro Bovino (BSA) 10% deixando descansar por 40 minutos. Após o bloqueio com BSA 10%, as lâminas foram incubadas com 10µl do anticorpo primário α -Actin (α -SMA, Abcam #7817), CD68 (Invitrogen #MA-532372) (ou conforme especificação do fabricante) e mantidas *overnight* a 4°C, posteriormente foram incubada com do anticorpo secundário, conforme Tabela 1, a seguir.

Tabela 1: Tabelas dos anticorpos utilizados na IF.

	Anticorpo	Tipo	Marca	Catálogo	Hospedeiro	Diluição
Primário	Actin (α -SMA)	Monoclonal	Abcam	#7817	anti-Mouse	1:100
Primário	CD68	Monoclonal	Invitrogen	#MA5-16674	anti-Rat (Mouse)	1: 50 a 1: 100
Secundário	Alexa Fluor 488	Polyclonal	Invitrogen	#A-11094	anti-Rabbit	1:100
Secundário	Alexa Fluor 350: Cross Adsorbed IgG (H+L)	Monoclonal	Invitrogen	#A-1104	anti-Mouse	1:100

Fonte: do autor, 2023

3.5.2.1 Análise da IF

As lâminas preparadas para imunofluorescência foram examinadas em microscópio invertido, modelo Axio Observer, com Sistema LSM 780 MP (by Carl Zeiss. Jena, Alemanha). As secções foram observadas com epifluorescência, usando um filtro de excitação (490-494 nm e 690-735 nm) para emissão dos feixes fluorescentes. Cada corte foi examinado no aumento de 10x para orientação dos tecidos e mapeamento das estruturas. Quando identificadas, usou-se de objetivas para 20x, 40x e 63x NA 1.4. No próprio microscópio foi inserido um software para a projeção da imagem (KONTRON KS400), sendo as mesmas realizadas em “corte Z” para melhor definição das imagens.

Depois de fixadas as projeções, as imagens foram salvas em disco rígido, configuradas quanto a luz e a nitidez, analisadas morfológicamente de forma comparativa às secções entre as diferenças fragmentares encontradas nas respectivas regiões do tecido. Evidenciando núcleo, largura e comprimento dos mecanorreceptores das fibras de actina do músculo liso, presença (ou não) de células endoteliais, e características morfológicas teciduais em ambos os grupos.

As edições das imagens foram realizadas por meio do *software* Fiji (*ImageJ*), o qual trata-se de um pacote de processamento de imagem com códigos variados agrupados e possibilidades de acessos abertos, baseado em sua versão anterior, o *software ImageJ*. Nessa plataforma também é possível identificar a Média de Intensidade de Fluorescência (Median Fluorescence Intensity) (MFI) das regiões selecionadas, além de projetar gráficos por meio de histogramas (TRIANA MARRERO; MARSÁN SUÁREZ; DUARTE PÉREZ, 2020).

Sendo assim, foram quantificados os valores de MFI por meio da ferramenta "Analysis / Tools / Roi Manager" dentro do programa. Dessa forma, em cada imagem, cinco quadrantes iguais foram projetados em diferentes pontos, gerando os resultados de MFI individualmente, sendo somados e retirados à média, comparados posteriormente com o auxílio do *software* GraphPad Prism 8.0.

4.6 Cultura *Ex Vivo*

Para cultura *ex-vivo*, o fragmento da aorta foi dividido em vários pedaços de tamanho similar e colocado em placa de cultura, contendo meio de cultura na presença de veículo e de agonistas ou antagonistas do SRA (Figura 5), permanecendo assim por 6 horas, incubadas em estufa à 37°C com 5% de CO₂. Após esse período, o tecido aórtico e o meio de cultura foram removidos separadamente da placa, identificados, congelados em nitrogênio líquido e guardados em freezer -80°C, para posteriores análises bioquímicas e moleculares.

A seguir apresentaremos as drogas utilizadas nos experimentos *ex-vivo*:

- Branco (meio de cultura sem o tecido, para controle de qualidade do experimento),
- Controle (tecido e meio de cultura sem drogas),
- Ang I (10⁻⁸ M),
- Ang II (10⁻⁸ M),
- Captopril (iECA, 10 uM),
- Losartan (antagonista do receptor AT1, 1 uM),
- PD123319 (PD antagonista do receptor AT2, 1 uM),
- Ang 1-7 (Ang I-7, 10⁻⁸ M),

- A779 (antagonista seletivo para receptor MAS, 10^{-8} M)
- Quimostatina (inibidor de quimase e elastase-2, 100 uM)
- Associações de Ang I + Captopril,
- Ang I + Quimostatina,
- Ang II + Losartan,
- Ang II + Captopril,
- Ang II + PD123319
- Ang 1-7 + A779.

Ao final dos experimentos, o *ex-vivo* foi coletado o meio de cultura para análises dos mediadores inflamatórios secretados pelo tecido, por ensaio de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), sendo as aortas armazenadas à -80°C .

Figura 5: Exemplo do desenho experimental *ex-vivo* utilizado em 6 e 12 horas

6 horas		
Controle	Ang I	Ang II
Captopril	Losartan	PD
Ang 1-7	A779	Quimo
Ang I + Qui	Ang I + Captopril	Ang II + Captopril
Ang II + Losartan	Ang II + PD	Ang 1-7 + A779

Fonte: do autor, 2023.

3.6.1 Mediadores inflamatórios do meio de cultura em "*ex-vivo*"

Nesta etapa realizamos as análises bioquímicas das citocinas inflamatórias IL-1, IL-6, IL-8 e IL-10, por ELISA, no meio de cultura no qual o fragmento de aorta obtido de paciente sem AAA e paciente AAA foi incubado. O tempo de incubação da aorta obtido dos grupos sem AAA e AAA, com e sem drogas, foi de seis horas.

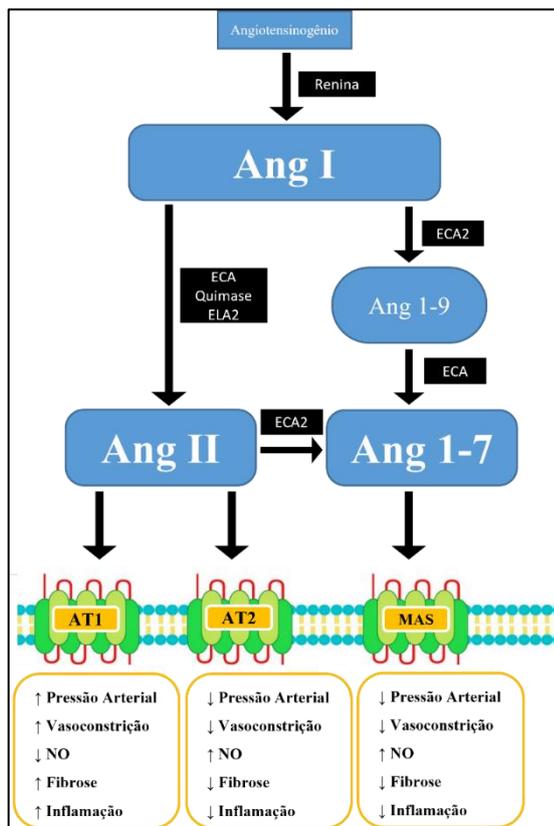
A fim de facilitar a apresentação dos resultados, dividiu-se as drogas descritas anteriormente e utilizadas em eixos (1, 2 e 3) do SRA (figura 6) para cada interleucina estudada abaixo:

Eixo 1) Via representativa da cascata de formação de Ang I: Controle, Ang I, Captopril (inibidor da ECA), Ang I + Captopril, Quimostatina (inibidor da elastase-2 e quimase) e Ang I + Quimostatina ;

Eixo 2) Via representativa da cascata de formação/regulação de Ang II: Controle, Ang II, Captopril, Ang II + Captopril, Losartan (antagonista do receptor AT1R), Ang II + Losartan, PD123319 (antagonista do receptor AT2R), Ang II + PD;

Eixo 3) Via representativa da cascata de formação de Ang 1-7: Controle, Ang 1-7, A779 (antagonista do receptor MAS), Ang 1-7 + A779.

Figura 6: Esquema simplificado da formação de Ang I, Ang II e Ang 1-7



Fonte: do autor, 2023.

3.6.2 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)

No meio de cultura onde o fragmento de aorta ficou emergido, conforme descrito no protocolo *ex vivo*, foram determinadas as seguintes citocinas inflamatórias: Interleucina-1, (IL-1), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-8 (IL-8) e Interleucina-10 (IL-10) por ELISA. Essas citocinas foram escolhidas por estarem relacionadas com o processo inflamatório no AAA, descrito anteriormente. O protocolo foi realizado conforme instrução dos kits de quantificação (DuoSet ELISA- *R&D System*), com nº de catálogo DY201 para IL-1, DY206 para IL-6, DY208 para IL-8 e DY217B para IL-10. A etapa final do ensaio foi realizada em um leitor de microplacas *VERSA max (Molecular Devices)*, os valores de densidade óptica foram lidos a 450 nm e foram calculados a partir de uma curva padrão de 4 parâmetros (*4-PL*) com o auxílio do software (*Softmax pro v5*). Os resultados obtidos foram expressos em pg/mL.

3.7 Análises estatísticas

Primeiramente os dados coletados, tanto os demográficos/clínicos quanto os resultados dos experimentos realizados, foram tabulados em planilha de Excel, por dupla digitação, e analisados por meio do software *GraphPad Prism* versão 8.0 (*GraphPad Software Inc.*, San Diego, Califórnia, EUA).

Os dados foram avaliados quanto à normalidade e à homocedasticidade pelos testes de Shapiro-Wilk e Brown-Forsythe, respectivamente. Para dados que apresentavam distribuição normal e homogênea foram utilizados testes estatísticos paramétricos (T de *Student*), e para os que não atingiram os requisitos ou que se tratava de variáveis categóricas foram utilizados testes estatísticos não paramétricos (*Mann Whitney*, qui-quadrado e teste exato de *Fisher*).

Para fins de caracterização dos grupos/amostras foram realizadas estatísticas descritivas incluindo medidas de tendência central, como média e desvio padrão da média (SEM), e dados referentes à frequência absoluta (n) e relativa (%). Foram utilizados o teste exato de Fisher para variáveis categóricas (frequência absoluta e/ou relativa) e o teste T de *Student* para variáveis contínuas (valor absoluto).

Após, para a abordagem experimental, utilizou-se o teste T de *Student*, e/ou o teste de Mann-Whitney para múltiplas comparações a fim de determinar a significância da diferença estatística por experimento, sendo:

1. Análises de CK e NOx para padronização do protocolo de captação e manutenção das aortas humanas: CK) *Mann-Whitney* (não paramétrico); NOx) *Mann-Whitney* (não paramétrico) e; IF) teste T de *Student*.
2. Histologia IF: teste T de *Student* (paramétrico).
3. Cultura *ex-vivo*: *Mann-Whitney* (não paramétrico).

O valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo e analisado por meio do software *GraphPad Prism* versão 8.0.1 (*GraphPad Software Inc.*, La Jolla, Califórnia, EUA). Os valores de média da intensidade de fluorescência (MFI) foram tabulados em planilha de Excel, por dupla digitação, e analisados por meio do software *GraphPad Prism* versão 8.0 (*GraphPad Software Inc.*, San Diego, Califórnia, EUA).

4. RESULTADOS

Os resultados serão apresentados:

4.1 Dados demográficos e clínicos dos pacientes;

4.2 Análises de CK e NOx para padronização do protocolo de captação e manutenção das aortas humanas;

4.3 Cultura de célula primária de VSMCs;

4.4 Análises Histológicas das Aortas obtidas de pacientes AAA e sem AAA;

4.5 Cultura ex-vivo.

4.1 Dados Demográficos e Clínicos

Na Tabela 2 estão apresentados os dados demográficos, sociais e clínicos dos grupos sem AAA e do grupo AAA. No grupo sem AAA, não foram incluídos os pacientes que obtiveram diagnóstico de óbito decorrente de doenças vasculares, como por exemplo o Acidente Vascular Cerebral (AVC).

Na casuística proposta, houve diferença estatística significativa na média da idade ($p= 0,0009$), sendo o grupo sem AAA mais jovem que o grupo AAA. Quanto ao sexo, houve distribuição igualitária no grupo AAA, e predomínio de pacientes do sexo masculino no grupo sem AAA, sem diferença estatística. A avaliação de fatores de risco indicou maior frequência de pacientes com HAS no grupo AAA em relação ao grupo sem AAA ($p= 0,0046$), sem diferença estatística nos índices de tabagismo, sobrepeso/obesidade e comorbidades. Apenas pacientes do grupo AAA faziam uso de iECA, antagonistas do receptor de Ang II, betabloqueadores, bloqueadores dos canais de cálcio e diuréticos, contudo, não houve diferença significativa na comparação com os pacientes sem AAA. Ainda, destaca-se que na casuística de pacientes AAA não houve caso de morte durante a cirurgia.

Sendo assim, na análise comparativa dos dados demonstra-se que, dentre a escolha dos participantes do grupo AAA e sem AAA, 66,67% eram do sexo masculino e 33,33% do sexo feminino, refletindo as descrições de AAA acometer mais indivíduos do sexo masculino. Dentre as manifestações dos fatores de risco e predisposições para AAA,

tais como HAS, tabagismo, e doenças cardiovasculares, o grupo com AAA também se apresenta maior, quando comparado ao grupo sem AAA. Apenas um indivíduo do grupo sem AAA apresentou diabetes (DM). O índice de massa corpórea (IMC) avaliado nos grupos AAA e sem AAA apresenta-se acima ou igual à 25 em maior frequência no grupo AAA, indicando maior prevalência de sobrepeso e obesidade. Quanto ao uso de medicamentos relacionados ao SRA, do total dos pacientes do grupo sem AAA, nenhum estava sob uso de iECA e/ou em uso do antagonista do receptor AT1. Avaliando o hábito tabagismo, nota-se prevalência no grupo AAA, sendo que dos 8 pacientes que compõem o grupo, 6 apresentam uso passado ou atual de tabaco (75%).

Tabela 2. Características demográficas, sociais e clínicas dos pacientes selecionados para os experimentos entre os grupos AAA e sem AAA.

	Grupo (AAA)			Grupo sem AAA			P value
	No.	%	Média ± DP	No.	%	Média ± DP	
Total Pacientes / Idade Média	8		66,8±9	7		39,4±9	0,0009*
Sexo	<i>Masc.</i>	4	50,0	6	85,7		0,1432**
	<i>Femin.</i>	4	50,0	1	14,3		
Raça	<i>Branca</i>	6	75,0	5	70,4		
	<i>Parda</i>	1	12,5	0	0		0,5302**
	<i>Preta</i>	0	0	0	0		
	<i>Amarela</i>	1	12,5	2	29,6		
Tabagismo (atual)	2	25,0		2	28,6		0,8760**
Tabagismo (atual ou passado)	6	75,0		2	28,6		0,0721**
Hipertensão (HAS)	7	87,5		1	14,3		0,0046**
Sobrepeso e obesidade (IMC≥25kg/m²)	7	87,5	28,9	3	42,9	26,0	0,0673**
Doença arterial coronariana	0	0		0	0		-
Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica	0	0		0	0		-
Infarto do miocárdio (IAM)	1	12,5		0	0		0,3329**
Doença arterial periférica	3	37,5		0	0		0,0701**
Diabetes Mellitus (DM)	0	0		1	14,3		0,2685**
Insuficiência Cardíaca Congestiva (ICC)	1	12,5		0	0		0,3329**
Arritmia	0	0		0	0		-
Acidente Vascular Cerebral (AVC)	0	0		0	0		-
Sob Inibidores da ECA	2	25,0		0	0		0,1553**
Sob antagonista do receptor de Ang II	3	37,5		0	0		0,0507**
Sob beta-Bloqueadores	3	37,5		0	0		0,0507**
Sob Bloqueador dos Canais de Cálcio	2	25,0		0	0		0,1553**
Sob diuréticos	3	37,5		0	0		0,0507**
Mortalidade na cirurgia	0	0		n/a	n/a		0

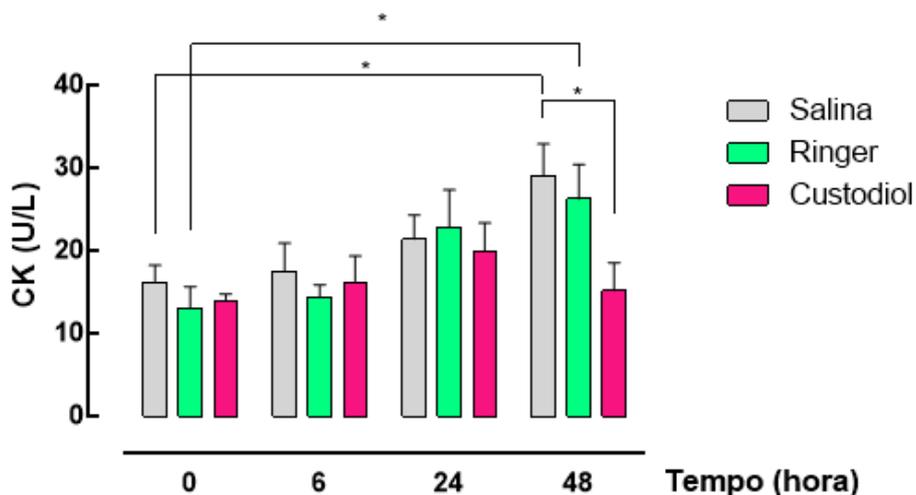
Fonte: do autor, 2023. Dados apresentados em frequência absoluta (n) e relativa (%), média e desvio padrão (DP). Análises estatísticas incluíram o teste T de *Student* (*) e o teste exato de Fisher (**). IMC: Índice de Massa Corporal. n/a: Não se aplica.

4.2 Resultados referente às análises de CK, NOx e alfa-actina de músculo liso para padronização do protocolo de captação e manutenção das aortas humanas

4.2.1 Dosagem CK-Total

A quantificação da CK-Total foi realizada nas soluções Salina, Ringer e Custodiol®, nos tempos 0, 6, 24 e 48 horas para avaliar a degradação do tecido aórtico abdominal. Conforme apresentado na Figura 7, entre os três meios de conservação para transporte, o Custodiol apresentou melhores efeitos protetores para o tecido, em relação ao Ringer e a Salina, consecutivamente. Houve diferença significativa na formação de CK entre os grupos em solução Salina nos tempos 0 e 48 horas e Solução de Ringer 0 e 48 horas ($p= 0,0183$ e $p= 0,0287$, respectivamente), e o grupo custodiol não apresentou diferença entre o tempo 0 e após 48h. Em 48 horas, houve diferença significativa entre os grupos em solução salina e Custodiol ($p= 0,0370$). Esses dados são sugestivos de um efeito protetor de danos sobre as células musculares lisas, menor produção de radicais livres e melhor função endotelial.

Figura 7: Determinação da atividade da Creatina Quinase Total (CK-NAC) nas soluções preservantes (Salina, Ringer e Custodiol) contendo fragmento da aorta abdominal humana obtida de pacientes com AAA



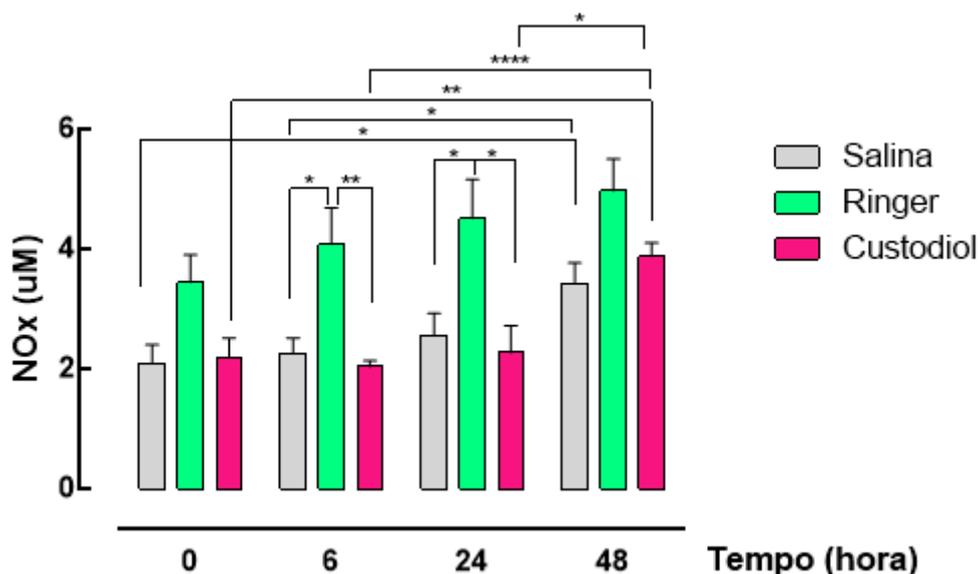
Fonte: do autor, 2023.

A determinação da CK foi realizada nos tempos 0, 6, 24 e 48 horas. Os valores estão expressos em U/L. Os dados estão apresentados como média e erro padrão da média, $n=4$ e os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste *Mann-Whitney* (não paramétrico) com nível de significância para $p < 0,05\%$.

4.2.2 Quantificação NOx

A quantificação de NOx foi realizada para avaliar a degradação do tecido aórtico abdominal em Salina, Solução de Ringer e Solução de Custodiol® nos tempos 0, 6, 24 e 48 horas e mantidos a 4°C. A Figura 8 mostra a formação de NOx e observa-se que no tempo de seis horas houve diferença significativa entre os grupos em solução salina com solução de Ringer ($p=0,0221$) e solução de Ringer com Custodiol ($p=0,026$). Em 24 horas houve diferença significativa entre as amostras em solução salina versus solução de Ringer ($p=0,0238$) e solução de Ringer versus Custodiol ($p=0,0172$). Em solução salina, houve diferença significativa entre os tempos 0 e 48 horas ($p=0,019$), e entre os tempos de 6 e 48 horas ($p=0,0242$). Em relação a solução de Ringer não houve diferença entre os diferentes tempos estudados. Quanto ao Custodiol, houve diferença significativa entre os tempos 0 e 48 horas ($p=0,0121$), entre os tempos 6 e 48 horas ($p=0,0095$) e entre os tempos 24 e 48 horas ($p=0,0381$).

Figura 8: Determinação de NOx em soluções conservantes (solução fisiológica, ringer de lactato e Custodiol) incubadas com fragmento de aorta abdominal humana obtido de pacientes com AAA.



Fonte: do autor, 2023.

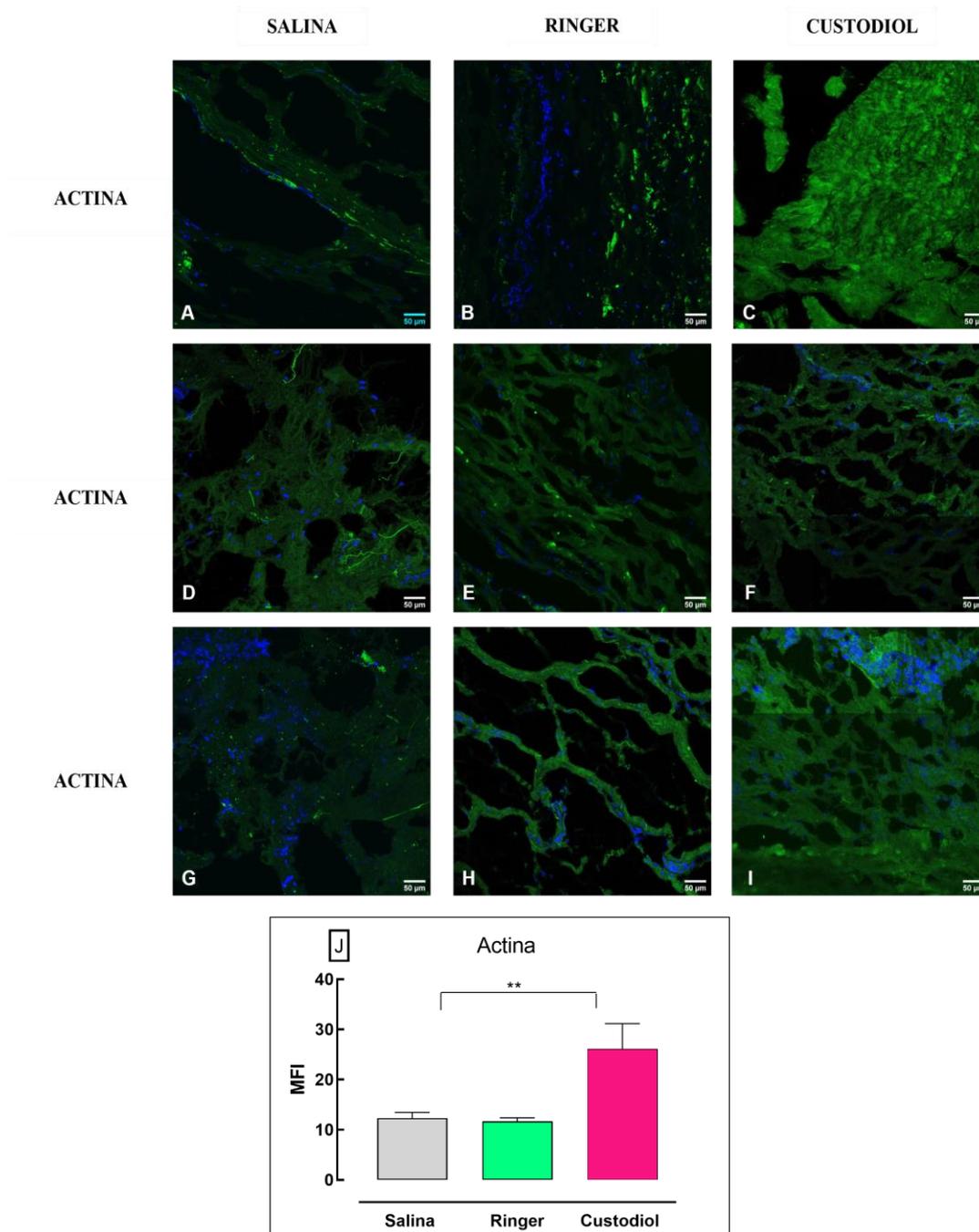
A determinação de NOx foi realizada nos tempos 0, 6, 24 e 48 horas. Os valores estão expressos em uM. Os dados estão apresentados como média e erro padrão da média, n=6 e os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste *Mann-Whitney* não paramétrico com nível de significância para $p < 0,05\%$.

4.2.3 Análise da alfa-actina (α -SMA) de músculo liso das aortas obtidas de pacientes sem AAA

Para caracterizar e avaliar a integridade morfológica do tecido, foram realizados ensaios de imunofluorescência com dupla marcação para alfa-actina de músculo liso (α -SMA) e núcleo (coloração com DAPI). A α -SMA e os núcleos foram corados positivamente nas aortas obtidas de pacientes com AAA (n=3), conforme representados na Figura 9, onde observa-se as imagens de IF do núcleo e das fibras do músculo liso. Além disso, na Figura 9-J, apresenta-se a quantificação das IF (apresentado por MFI) entre as aortas em cada solução, onde observa-se que entre os três meios de conservação para transporte, o Custodiol apresentou melhores efeitos protetores para o tecido, em relação ao Ringer e a Salina. Houve diferença estatística significativa na preservação e fluorescência das fibras de actina do músculo liso entre os grupos em relação ao Custodiol

($p=0,0001$). Não houve diferença estatística entre Salina e Solução de Ringer.

Figura 9: Fotomicrografia da caracterização de alfa-actina no segmento da aorta abdominal humana obtida de pacientes com AAA, incubados nas soluções preservantes (SF 0,9%, Ringer lactato e Custodiol) após 48 horas.



Fonte: do autor, 2023.

Fotomicrografia da caracterização da alfa-actina no segmento da aorta abdominal humana obtido de pacientes com AAA, incubado em soluções conservantes (Salina, Ringer lactato

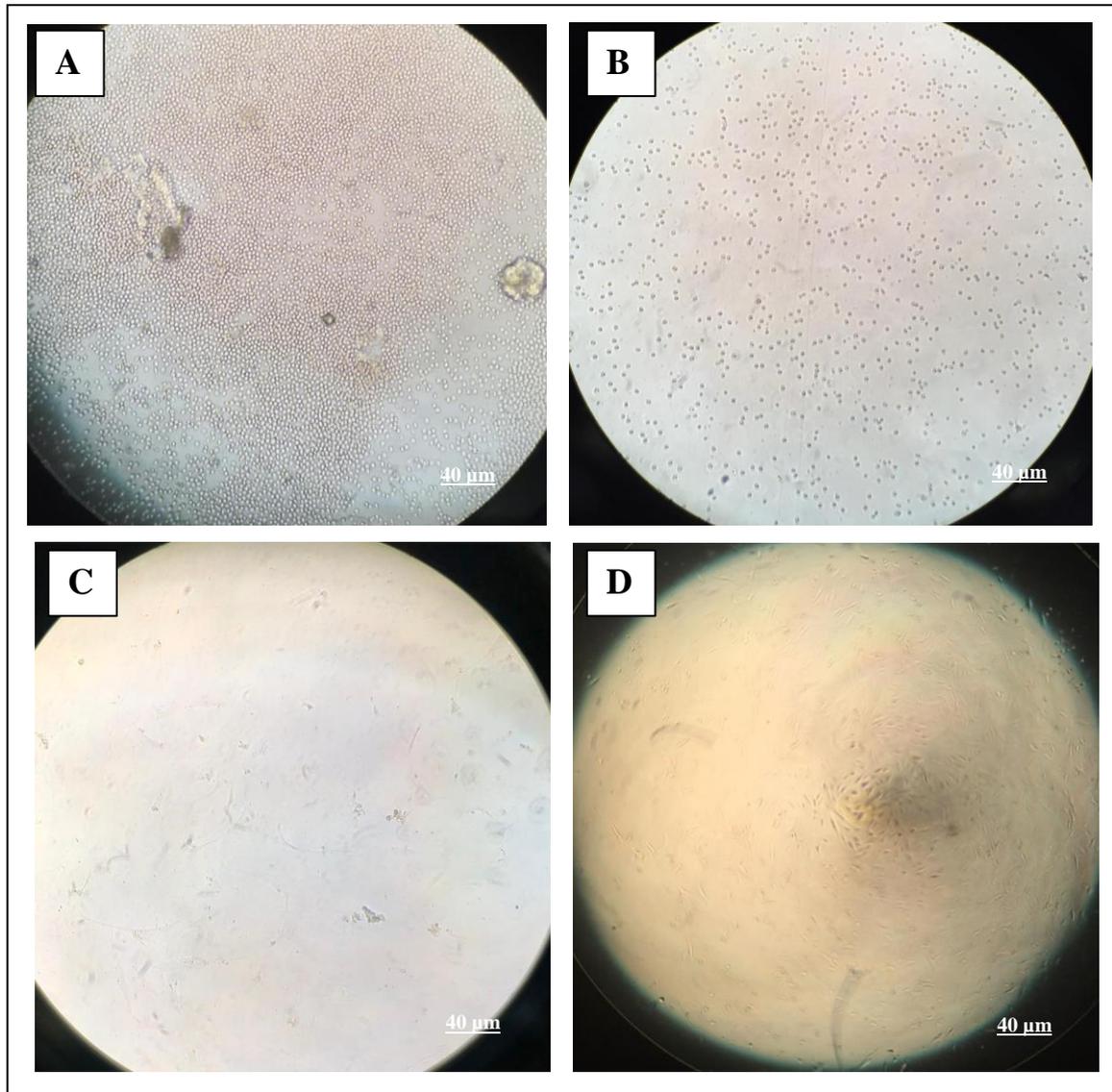
e Custodiol) após 48 horas. Imunofluorescência, onde: A, B e C) aorta obtida de um mesmo paciente, com AAA; D, E e F) aorta de outro paciente com AAA; G, H e I) aorta com AAA de outro paciente. Evidencia-se a túnica média, com fibras musculares lisas entremeadas por fibras elásticas, com coloração verde nos depósitos de Actina, marcados com anticorpo Anti-Alpha Smooth Muscle Actin. Imagens sobrepostas com DAPI, em azul, mostram células nucleadas com importantes diferenças morfológicas. As células foram visualizadas em microscópio invertido (Axio Observer, LSM 780 MP). A sobreposição de imagens (merge) foi efetuada utilizando o programa ImageJ - Fiji. Barra = 50µm, n=3. J) Quantificação das imagens histológicas de MFI obtidas das amostras. Dados apresentados como a média e o erro padrão da média, n=3. Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o teste t (paramétrico) com um nível de significância de $p < 0,05$.

4.3 Cultura de célula primária de VSMCs

A cultura primária VSMCs foi realizada a partir de amostras de aorta obtidas de pacientes do grupo sem AAA (não AAA). Após aproximadamente 20 dias a partir da data de incubação da aorta com o meio de cultura, as células se diferenciam e multiplicaram, forrando todo o fundo do poço da placa de cultura. As culturas de VSMCs apresentaram uma morfologia de células mononucleadas e alongadas (Figura 10). Além disso, durante a incubação celular foi possível observar a formação dos agrupamentos celulares semelhantes, tanto à morfologia quanto à fisiologia, apresentando conexão entre as células adjacentes, proporcionando assim, interações entre as membranas plasmáticas, tornando-as confluentes após a segunda semana de incubação da cultura (Figura 11). Após a primeira confluência, as células estavam prontas para serem cultivadas, permitindo assim, a realização das passagens celular e sua multiplicação contínua. Para isso as células foram individualizadas (1:4) até a oitava passagem.

Após maturação e proliferação celular, realizou-se marcação para alfa-actina de músculo liso (α -SMA), característica comum encontrada nas células musculares lisas, e com DAPI, marcador de núcleo. Foram encontrados marcadores positivos nas VSMCs, comprovando as características e purificação das VSMCs, conforme mostrado na Figura 12. A expressão de marcadores de diferenciação endotelial (CD31) não foi encontrada em VSMCs. Os experimentos de imunofluorescência, assim como seus resultados, foram avaliados em todas as culturas realizadas, como pode ser observado na Figura 13.

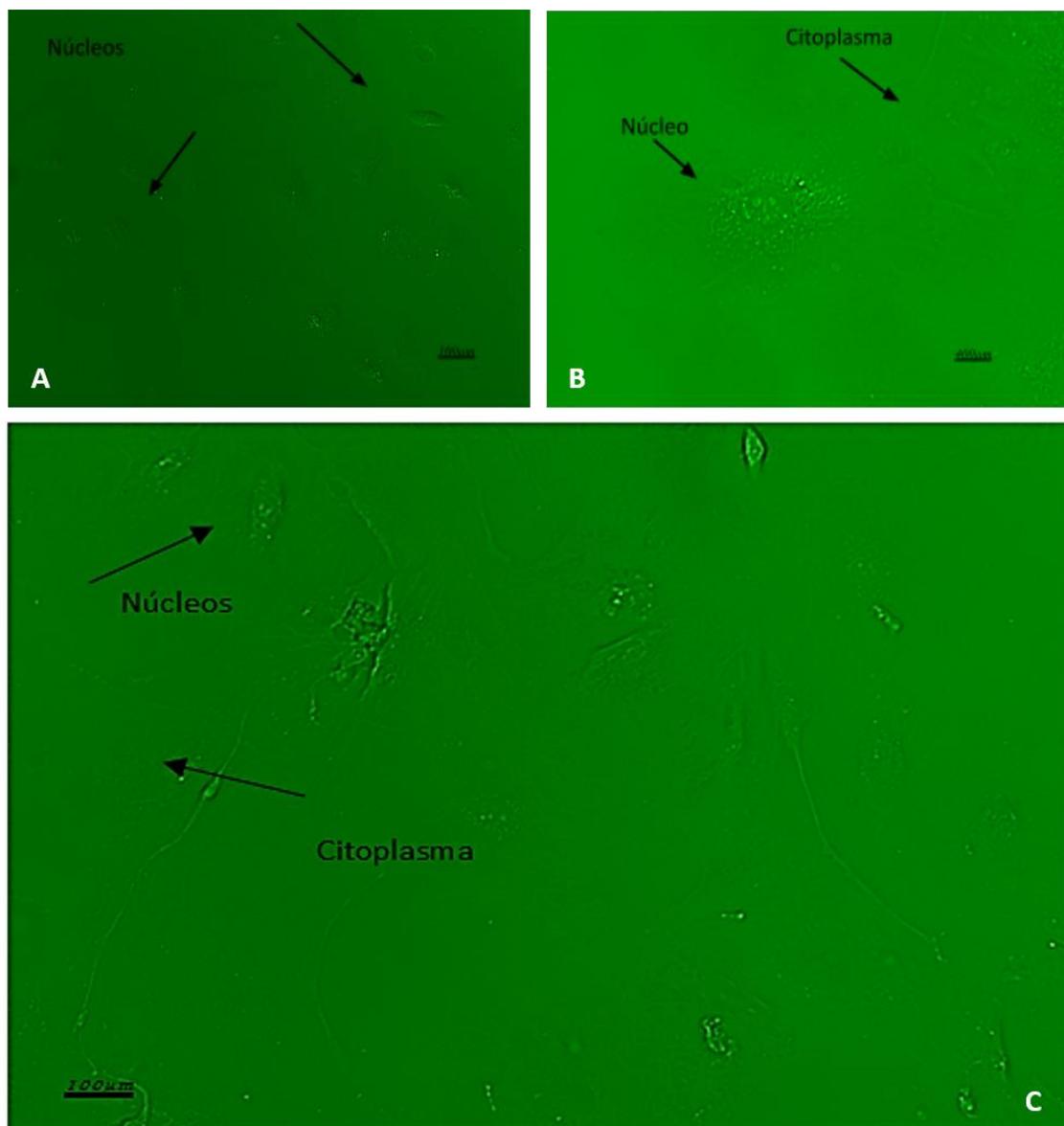
Figura 10: Células de VSMCs humanas em cultura.



Fonte: do autor, 2023.

A) Representação do dia de semeadura do tecido na cultura celular, determinando o Dia 1 da cultura; B) Representação da cultura no dia 5, com células esféricas não diferenciadas; C) Representação a cultura no dia 10, com início de diferenciação celular; D) Representação a cultura no dia 15, com diferenciação celular e características morfológicas específicas. As células foram visualizadas e fotografadas em MOI (Nikon®) e a edição das imagens realizada com auxílio do programa ImageJ - Fiji. Barra = 40 µm.

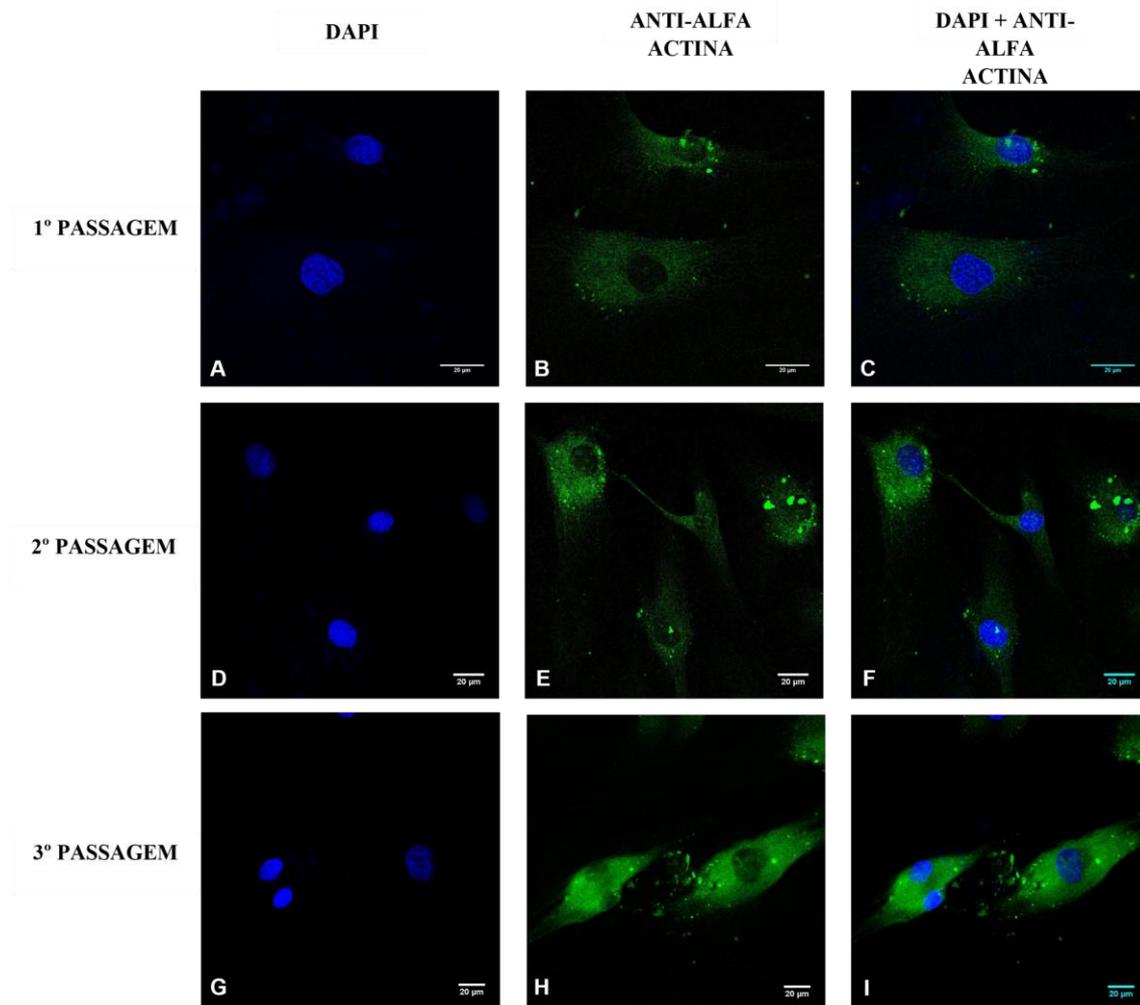
Figura 11: Desenvolvimento de VSMCs subconfluentes (100 μm), evidenciando mioblastos proliferativos e multinucleados.



Fonte: do autor, 2023.

Morfologia típica em forma de fuso com projeções longas conectando células adjacentes (setas). As células foram visualizadas e fotografadas em MOI (Nikon®) e a edição das imagens realizada com auxílio do programa ImageJ - Fiji. Barra = 100 μm .

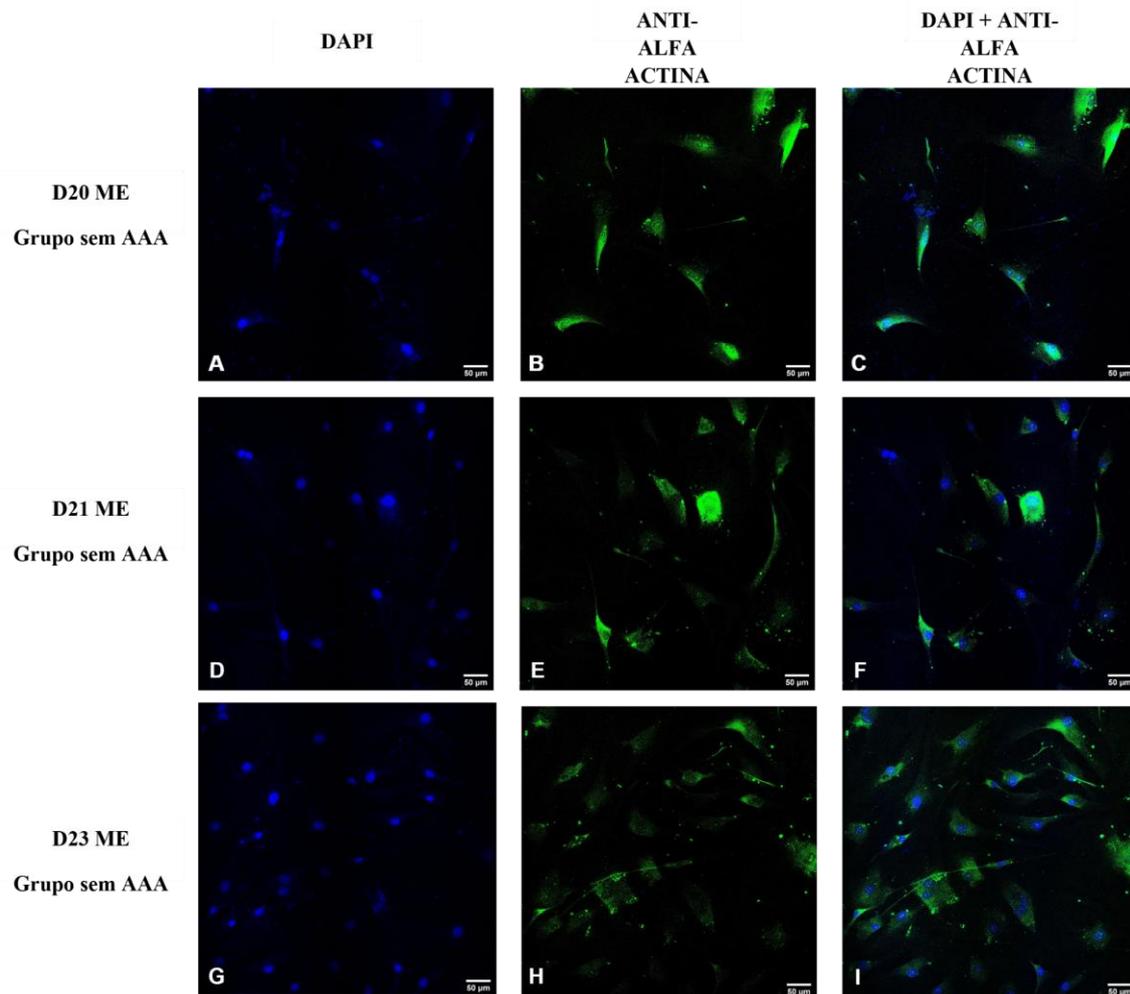
Figura 12: Fotomicrografia de alfa-actina no segmento da aorta abdominal humana mostrando a primeira, segunda e terceira passagem celular da cultura.



Fonte: do autor, 2023.

Primeira, segunda e terceira passagem celular da cultura celular (A-I). A), D e G) mostram coloração de núcleos celulares pelo DAPI; Imunofluorescência B), E e H) evidenciam a marcação de α -actin, características de fibras musculares lisas; C), F,) e I) mostram imagem sobreposta. As células foram visualizadas usando um microscópio invertido (Axio Observer, LSM 780 MP). A sobreposição de imagem foi realizada com o auxílio do programa ImageJ Fiji. Barra = 20 μ m. (n = 3).

Figura 13: Fotomicrografia alfa-actina no segmento da aorta abdominal humana.



Fonte: do autor, 2023.

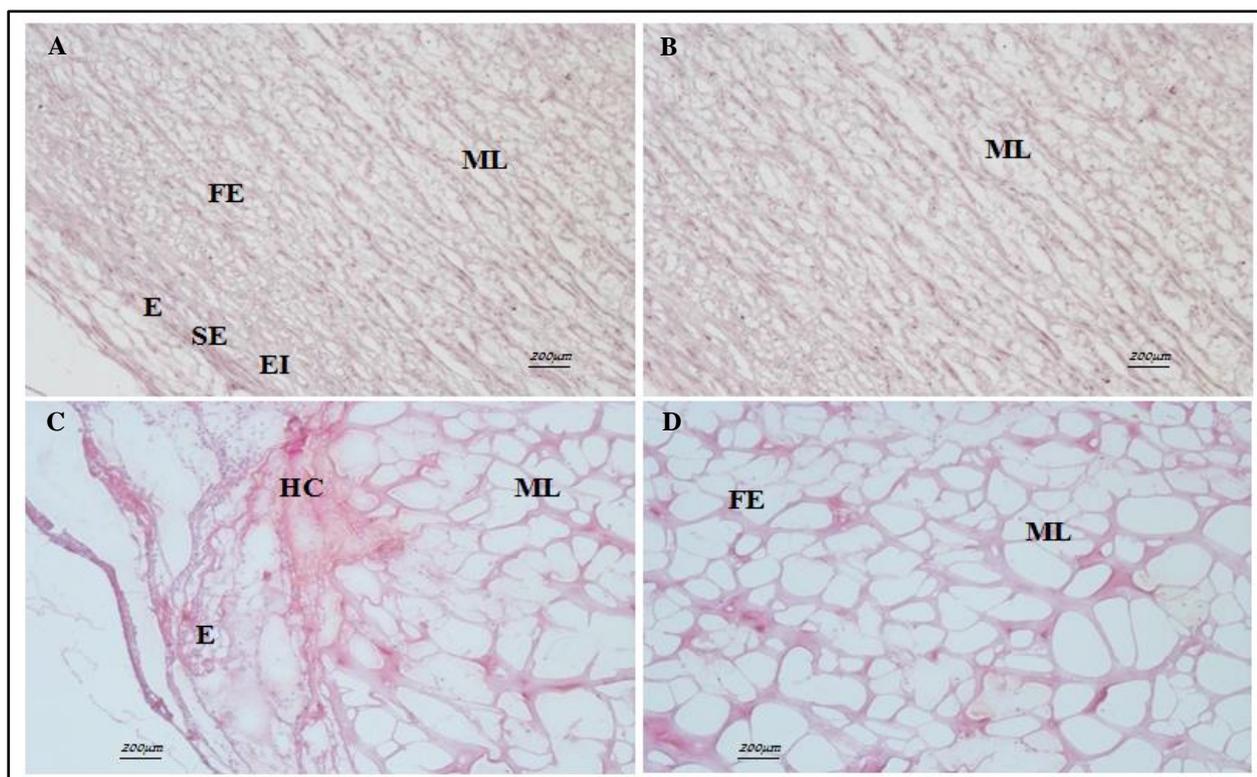
Segmento da aorta abdominal humana (A-I). Imunofluorescência, onde: A), D e G) mostram marcação de núcleos celulares pelo DAPI; B), E) e H) mostram a túnica média, com fibras musculares lisas intercaladas com fibras elásticas, marcadas de verde nos depósitos de actina, marcadas com anticorpo anti-alfa de actina de músculo liso; C), F), e I) mostram imagem sobreposta. As células foram visualizadas usando um microscópio invertido (Axio Observer, LSM 780 MP). A sobreposição de imagem foi realizada com o auxílio do programa ImageJ Fiji. Barra = 50 μ m. (n = 3).

4.4 Análises Histológicas das Aortas obtidas de pacientes AAA e sem AAA

4.4.1 Histologia H/E

Os resultados para histologia em H/E foram obtidos dos pacientes do grupo sem AAA (Figura 14 A e B), os quais apresentam fibras de elastina grossas, concêntricas e homogêneas que vão ao encontro de estudos histológicos clássicos com morfologia equivalente entre as camadas do tecido. Por outro lado, os pacientes do grupo AAA (figura 14 C e D), apresentam fibras elásticas com aspecto mais fino, flácido e fragmentado, ocupando maior volume na camada média da artéria, criando vacúolos intersticiais provavelmente por processos inflamatórios, hiperplasia tecidual e angiogênese (*vasa vasorum*).

Figura 14: Histologia do tecido da aorta abdominal de indivíduos adultos, pertencentes ao Grupo sem AAA e Grupo AAA, corados em H/E.



Fonte: do autor, 2023.

A e B) Grupo sem AAA evidenciando, na túnica íntima, o endotélio (E), o subendotélio (SE) e a membrana limitante elástica interna (EI), e na túnica média, as fibras musculares lisas (ML) entremeadas às fibras elásticas (FE). C e D) Grupo AAA evidenciando a túnica íntima, o endotélio (E) apresenta-se de forma desorganizada e aleatória. Já na túnica média, as fibras musculares lisas (ML) entremeadas às fibras elásticas (FE) apresentam arranjo celular danificado, com presença de hiperplasia, possível calcificação (HC) e/ou a *vasa vasorum*; Hematoxilina e Eosina, 40x.

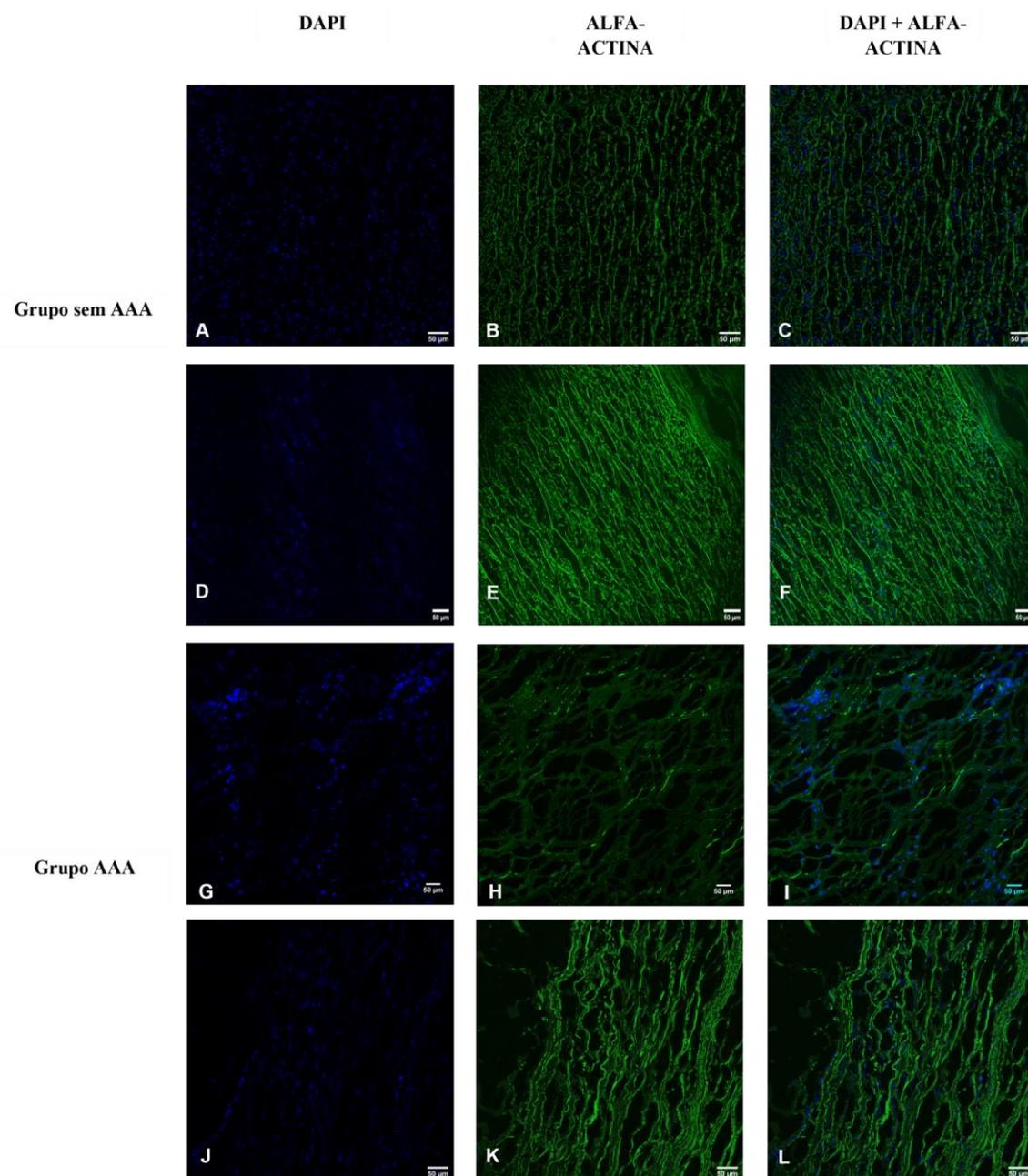
4.5 Imunofluorescência (IF)

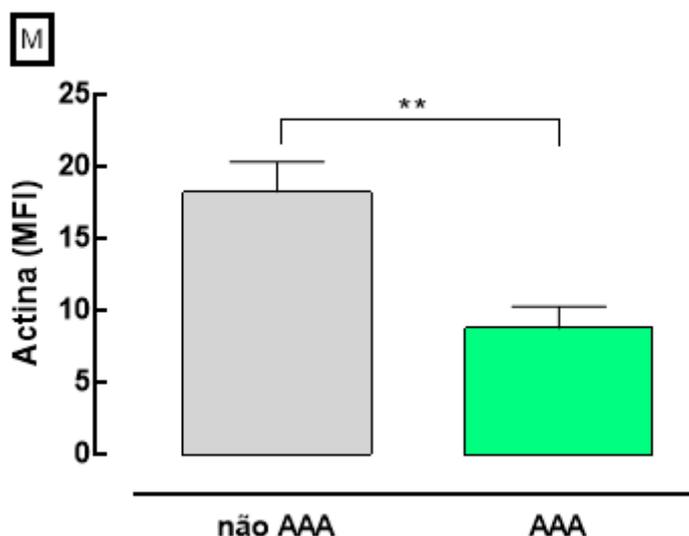
Foram realizadas as marcações por imunofluorescência de proteína alfa-actina (α -SMA) de músculo liso (Figura 15), CD68 (Figura 16), angiotensinogênio (Figura 17), renina (Figura 18), ECA (Figura 19), ECA2 (Figura 20), AT1 (Figura 21), AT2 (Figura 22), MAS (Figura 23), Quimase (Figura 24) e DAPI (para coloração de núcleo) nas aortas obtidas de amostras de ambos os grupos.

Como pode-se observar na Figura 15 (A-F), o tecido dos pacientes do grupo sem AAA apresenta o músculo liso e núcleo saudáveis, enquanto no grupo com AAA (G-L), a marcação para α -SMA apresenta-se alterada e fusiforme, bem como redução do número de filamentos, o que pode ser observado em verde. Na quantificação de α -SMA (figura 11-M), houve diferença estatística significativa na preservação e fluorescência das fibras de actina do músculo liso entre os grupos AAA comparado com sem AAA ($p= 0,0063$).

Na Figura 16 foi analisada por imunofluorescência a de infiltração macrofítica pela presença da CD68, marcador de macrófagos, na aorta do grupo sem AAA e do grupo com AAA. Evidencia-se a presença da CD68 em maior quantidade na camada média da aorta do grupo com AAA (Figura 16 H e K) em relação ao grupo sem AAA (Figura 16 B e E). Na quantificação de CD68 (figura 16 M) pode-se observar um aumento da infiltração de macrófagos no grupo AAA em comparação com não AAA ($p= 0,0042$).

Figura 15: Fotomicrografia da caracterização de alfa-actina no segmento da aorta abdominal de indivíduos adulto sem AAA

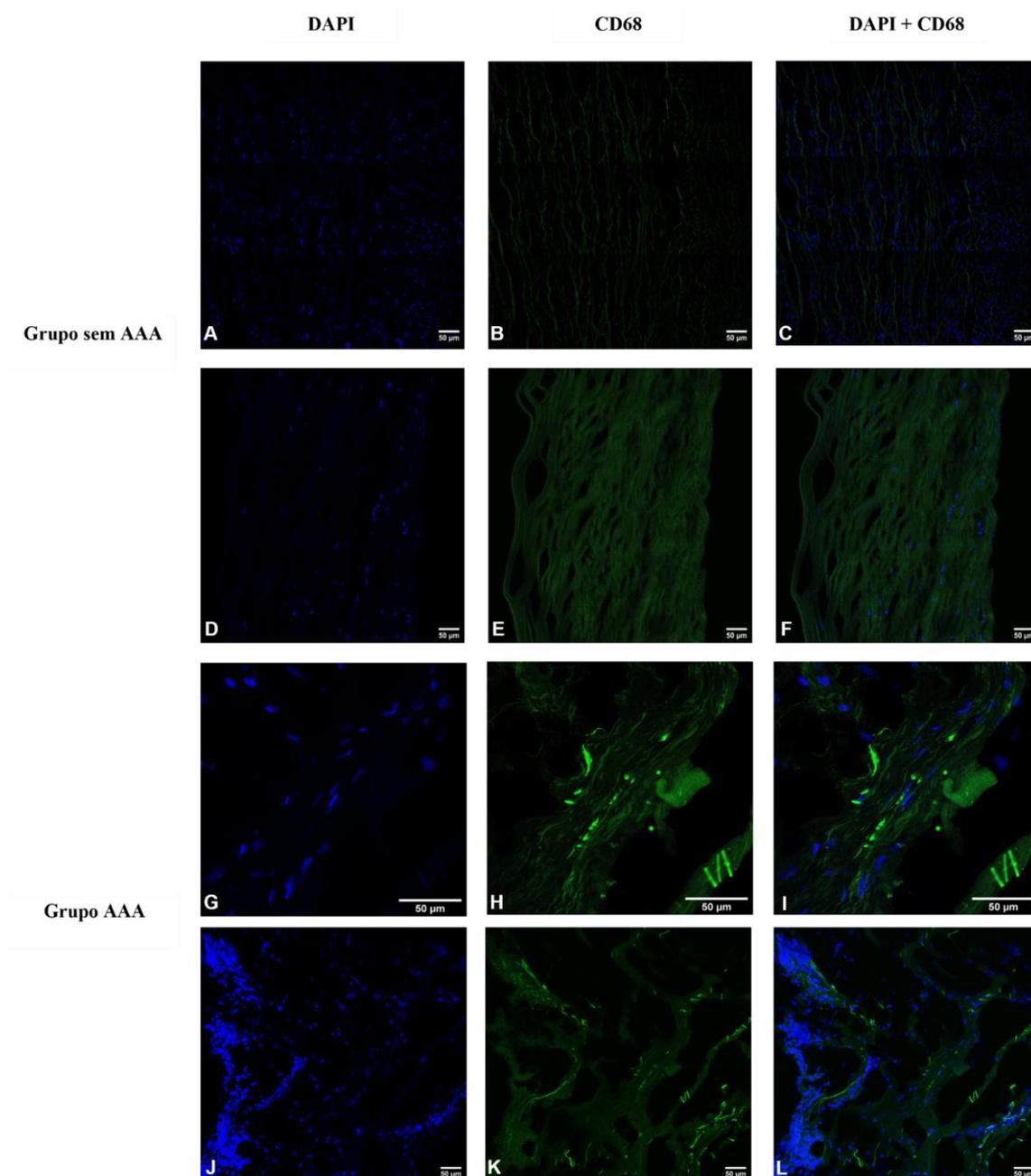


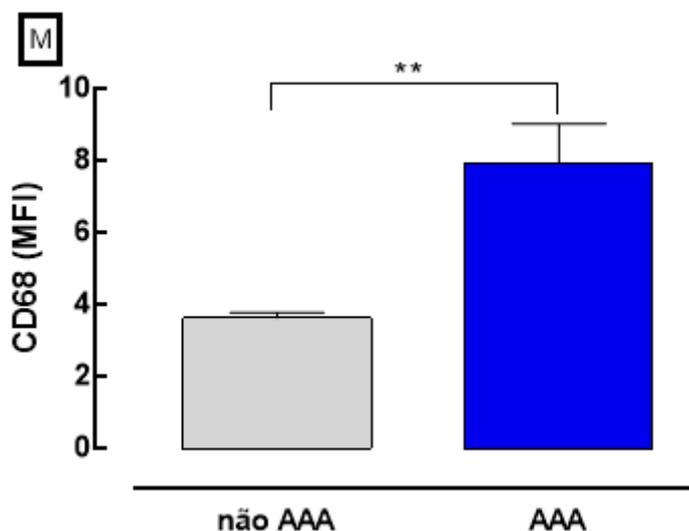


Fonte: do autor, 2023.

Grupo não AAA (A-F) e Grupo AAA (G-L). Imunofluorescência, onde: A, D, G, J) Evidenciam colorações de núcleos celular por DAPI; B, E, H, K) Evidenciando a túnica média, com fibras musculares lisas evidenciadas na coloração em verde nos depósitos de Actina, marcadas com anticorpo anti-alfa actina de músculo liso; C, F, I, L) Evidenciando sobreposição de imagens com diferenças morfológicas, onde (I e L) apresentam arranjo celular danificado, com presença de hiperplasia entre os depósitos de Actina. As células foram visualizadas em microscópio invertido (Axio Observer, LSM 780 MP). A sobreposição de imagens (*merge*) foi realizada com auxílio do programa ImageJ - Fiji. Barra = 50 μ m. M) Quantificação das imagens por MFI de histologia, obtidas das amostras. Foram analisados 5 campos por imagem de 5 pacientes diferentes de cada grupo e os dados apresentados como média e erro padrão da média. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo Teste T *Student* com nível de significância para $p < 0,05$.

Figura 16: Fotomicrografia da caracterização de CD68 no segmento da aorta abdominal de indivíduos adultos





Fonte: do autor, 2023.

Grupo não AAA (A-F) e Grupo AAA(G-L). Imunofluorescência, onde: A, D, G, J) Evidenciam colorações de núcleos celular por DAPI; B, E, H, K) Presença de macrófagos na túnica média pela marcação para CD68 (Anti-CD68 Antibody, MA5-16674]; C, F, I, L) Evidenciando sobreposição de imagens. As células foram visualizadas em microscópio invertido (Axio Observer, LSM 780 MP). A sobreposição de imagens (*merge*) foi realizada com auxílio do programa ImageJ - Fiji. Barra = 50 μ m. M). Quantificação das imagens por MFI de histologia, obtidas das amostras. Foram analisados 5 campos por imagem de 5 pacientes diferentes de cada grupo e os dados apresentados como média e erro padrão da média, n=10. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste T *Student* com nível de significância para $p < 0,05$.

4.5 Mediadores inflamatórios do meio de cultura em "ex-vivo"

Nesta parte dos resultados, apresentam-se as análises bioquímicas, realizadas nos experimentos *ex-vivo*. Foram analisadas as citocinas inflamatórias IL-1, IL-6, IL-8 e IL-10, por ELISA, no meio de cultura do fragmento de aorta obtido de paciente não AAA e paciente AAA. O tempo de incubação da aorta obtido dos grupos não AAA e AAA, com e sem drogas, foi de seis horas.

Conforme descrito na metodologia e a fim de facilitar a apresentação dos resultados, apresenta-se as citocinas avaliadas na presença e ausência das drogas divididas por eixos do SRA, sendo: Eixo 1) Via representativa da cascata de formação de Ang I: Controle, Ang I, Captopril, Ang I + Captopril, Quimostatina e Ang I + Quimostatina (Figuras 17, 18, 19, 20); Eixo 2) Via representativa da cascata de formação/regulação de Ang II: Controle, Ang II, Captopril, Ang II + Captopril, Losartan, Ang II + Losartan, PD, Ang II + PD (Figuras 21, 22, 23, 24); Eixo 3) Via representativa da cascata de formação de Ang 1-7: Controle, Ang 1-7, A779, Ang 1-7 + A779 (Figuras 25, 26, 27, 28).

Observa-se na Figura 17 (A), que em condições basais (controle e sem tratamento farmacológico) a secreção de IL-1 não apresentou diferença entre os grupos AAA e não AAA. Foi observado aumento significativo da produção de IL-1 ($p=0,0281$) em resposta a Ang I no grupo AAA comparado com grupo não AAA (Figura 17 A e B). Observa-se, ainda, que o aumento de IL-1 no grupo AAA com o tratamento com a Ang I foi protegido pelo tratamento com Ang I + Captopril ($p=0,045$), mostrando o envolvimento da ECA na estimulação da cascata inflamatória no AAA. Este comportamento de inibição da IL-1 pelo Captopril no AAA não se aplica em relação ao tratamento com a Ang I + Quimostatina, mostrando que o envolvimento da Quimase na via inflamatória para a produção de IL-1 é menor em relação à ECA. (Figura 17)

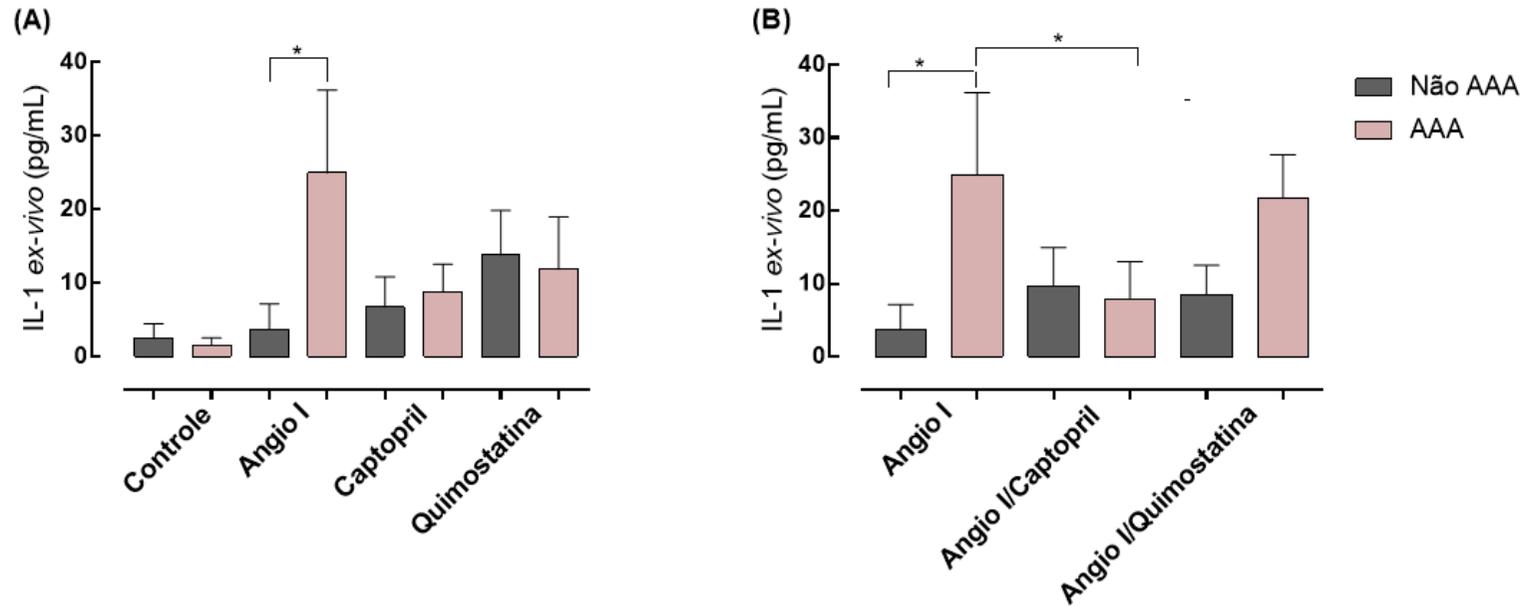
A concentração da IL-6 no meio de cultura de aortas abdominais do grupo não AAA e grupo AAA (Figura 18 A e B) não apresentou diferenças entre os grupos AAA e não AAA, bem como os tratamentos com a droga não influenciaram a secreção de IL-6.

Na figura 19 (A e B) estão apresentadas a concentração da IL-8 no meio de cultura de aortas abdominais do grupo não AAA e grupo AAA. Observa-se que em condições basais (controle e sem tratamento farmacológico) a secreção de IL-8 não apresentou diferença entre os grupos AAA e não AAA (Figura 19 A).

Notam-se níveis mais elevados de IL-8 na presença de captopril no grupo AAA (Figura 19 A), com diferença significativa em relação ao não AAA ($p = 0,0087$). Na figura 19 (B) observa-se que com o tratamento de Ang I induziu um aumento no níveis de IL-8 no meio de cultura no grupo AAA, comparado com o grupo não AAA ($p=0,0152$), ainda, entre os grupos houve diferença estatística significativa, tanto em presença de Captopril ($p=0,0087$), quanto na presença de Quimostatina ($p=0,0190$), mostrando que essas drogas não são capazes de controlar a produção de IL-8 nas aortas na presença de Ang I.

Na Figura 20 (A) observa-se que em condições basais (controle e sem tratamento farmacológico) IL-10 apresenta valores aumentados no grupo AAA em relação ao grupo não AAA ($p=0,0079$). A IL-10 também está aumentada no grupo AAA em relação ao não AAA na presença dos tratamentos com Captopril ($p=0,0179$) e Quimostatina ($p=0,0159$). Na Figura 20 (B) comparando-se o grupo AAA e não AAA a IL-10 está aumentada com a associação da Ang I + Captopril ($p=0,0159$) e Ang I + Quimostatina ($p=0,0156$), além disso houve também diferença entre intragrupo no AAA entre Ang I *versus* Ang I + Captopril ($p=0,0475$) (Figura 20 B).

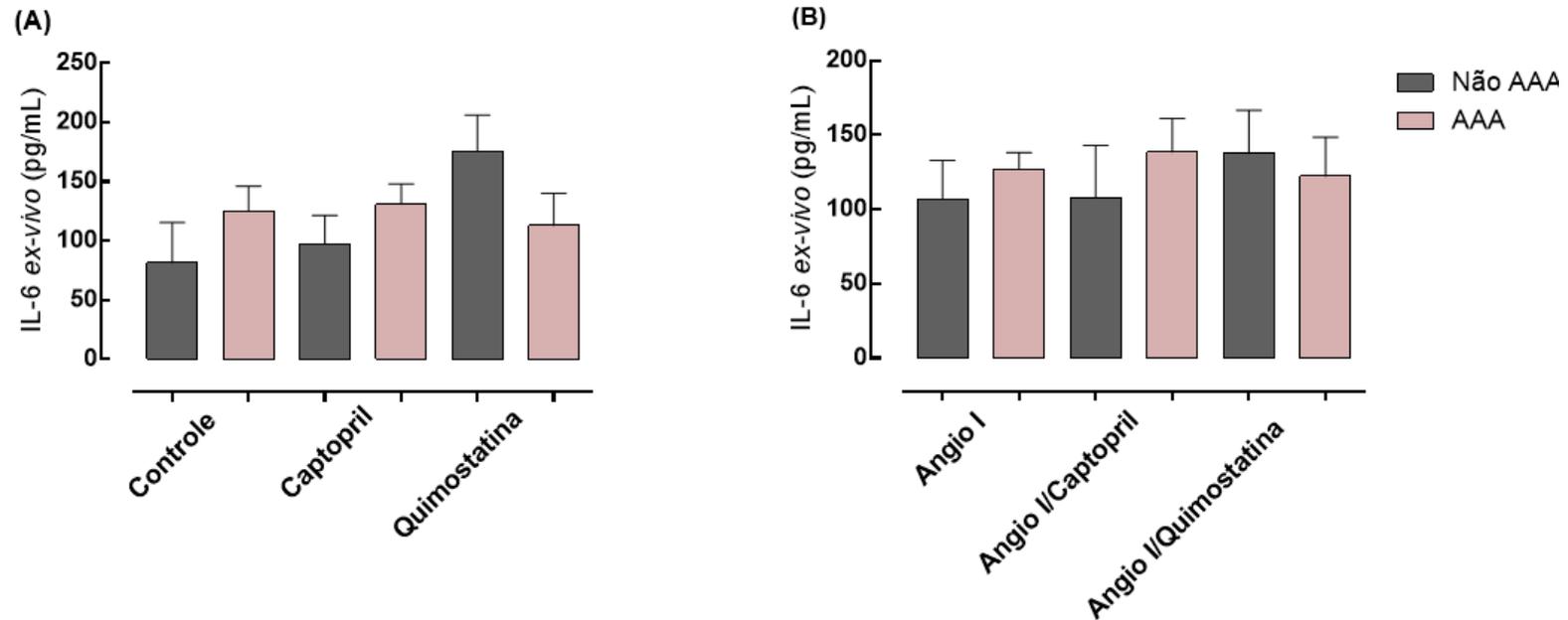
Figura 17: Eixo 1) Concentração da IL-1 no meio de cultura de aortas abdominais do grupo não AAA e grupo AAA, determinados por ELISA.



Fonte: do autor, 2023.

Expressão e comparação de IL-1 entre as drogas no grupo não AAA (n=7) e grupo AAA (n=8). Valores expressos em pg/mL. Dados apresentados como média e erro padrão da média. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste *Mann-Whitney*, com nível de significância para $p < 0,05$.

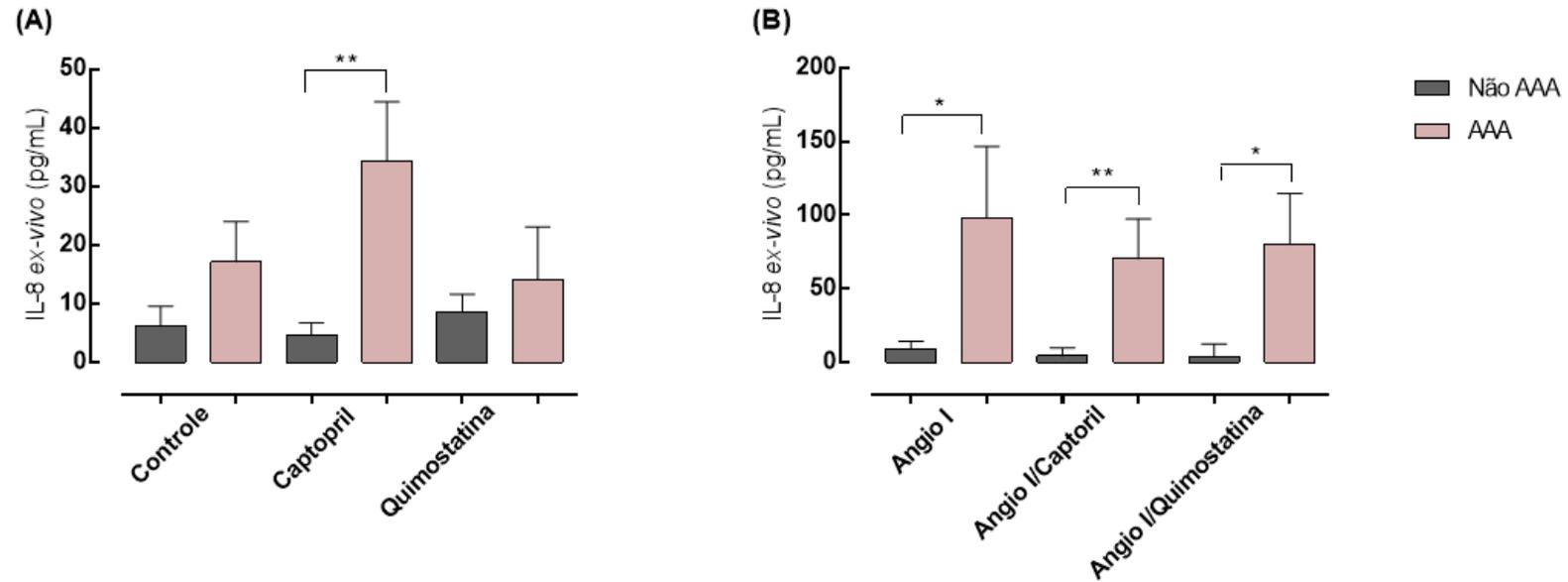
Figura 18: Eixo 1) Concentração da IL-6 no meio de cultura de aortas abdominais do grupo não AAA e grupo AAA determinados por ELISA.



Fonte: do autor, 2023.

Expressão e comparação de IL-6 entre as drogas no grupo não AAA (n=7) e grupo AAA (n=8). Valores expressos em pg/mL. Dados apresentados como média e erro padrão da média. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste *Mann-Whitney*, com nível de significância para $p < 0,05$.

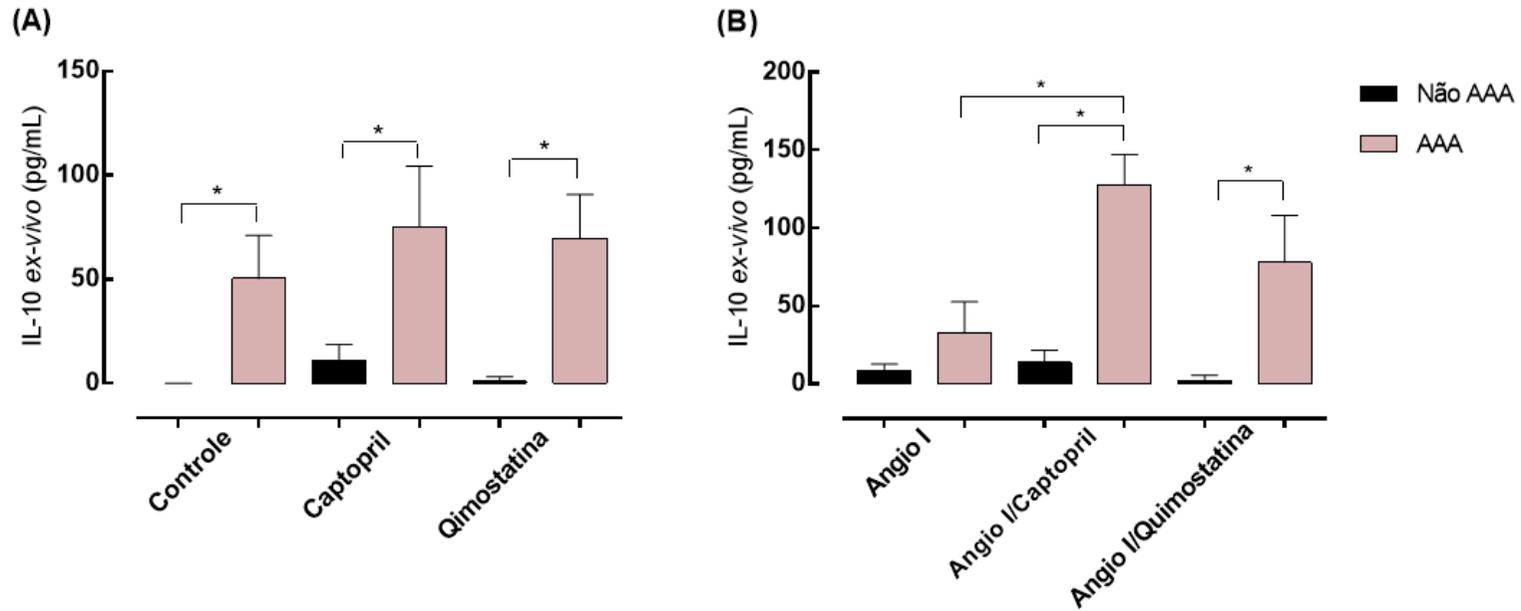
Figura 19: Eixo 1) Concentração da IL-8 no meio de cultura de aortas abdominais do grupo não AAA e grupo AAA determinados por ELISA.



Fonte: do autor, 2023.

A e B) Expressão e comparação de IL-8 entre as drogas no grupo não AAA (n=7) e grupo AAA (n=8). Valores expressos em pg/mL. Dados apresentados como média e erro padrão da média. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste *Mann-Whitney*, com nível de significância para $p < 0,05$.

Figura 20: Eixo 1) Concentração de mediadores inflamatórios (interleucina 10 / IL-10) no meio de cultura de aortas abdominais do grupo não AAA e grupo AAA, analisados por ELISA.



Fonte: do autor, 2023.

A e B) Expressão e comparação de IL-10 entre as drogas no grupo não AAA (n=7) e grupo AAA (n=8). Valores expressos em pg/mL. Dados apresentados como média e erro padrão da média. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste *Mann-Whitney*, com nível de significância para $p < 0,05$.

Apresentam-se os delineamentos dos resultados referentes ao Eixo 2, conforme descrito:

Na figura 21 apresenta-se a concentração da IL-1 no meio de cultura de aortas abdominais do grupo não AAA e grupo AAA. Observa-se na Figura 21 (A) que em condições basais (controle e sem tratamento farmacológico) a secreção de IL-1 não apresentou diferença entre os grupos. Enquanto no grupo AAA o tratamento com Ang II aumentou significativamente a produção de IL-1 ($p=0,0238$), não houve diferenças na produção de IL-1 no grupo não AAA. Além disso, não houve diferença estatística na secreção de IL-1 na presença dos tratamentos com Captopril, Losartan e PD123319 entre os grupos (Figura 21 B).

A concentração da IL-6 no meio de cultura de aortas abdominais do grupo não AAA e grupo AAA (Figura 22 A e B) não apresentou diferenças estatísticas, não havendo influência dos diferentes tratamentos na secreção de IL-6.

Na figura 23 (A e B) estão apresentadas a concentração da IL-8 no meio de cultura de aortas abdominais do grupo não AAA e grupo AAA. Observa-se que em condições basais (controle e sem tratamento farmacológico) a secreção de IL-8 não apresentou diferença entre os grupos AAA e não AAA (Figura 23 A). Já na presença de Ang II, os valores de IL-8 mostraram-se aumentados no grupo AAA em relação ao controle ($p=0,050$), além disso o mesmo perfil de aumento se repete entre os grupos com e sem AAA, na presença de Ang II ($p=0,0317$), Captopril ($p=0,0155$) e Losartan ($p=0,0020$) (Figura 23 A).

Em relação ao grupo AAA a droga Losartan aumentou significativamente os níveis de IL-8 na ausência da Ang II comparado ao controle ($p=0,0251$). Houve também diferença entre os grupos em adição de Ang II + Captopril ($p=0,0077$) e Ang II + Losartan ($p=0,0033$) (Figura 23 B). Quando analisado intragrupo no grupo AAA, o tratamento com Ang II + PD123319 apresentou uma diminuição de IL-8 na presença de Ang II ($p=0,0409$), mostrando o envolvimento do receptor AT2 no processo inflamatório com IL-8 no AAA.

Os níveis de IL-10 (Figura 24 A) apresentam-se aumentados no grupo de pacientes AAA em relação ao grupo sem AAA quando analisado no basal (Controle) ($p=0,0009$), Ang II ($p=0,0001$), Captopril ($p=0,0001$), Losartan ($p=0,011$), PD123319 ($p=0,029$). Na figura 24B observa-se que a IL-10 também está aumentada em resposta aos tratamentos com Ang II + Captopril ($p=0,0004$), Ang II + Losartan ($p=0,02$), e Ang

II + PD ($p=0,009$) no grupo AAA em relação ao não AAA. O grupo AAA tratado com Ang II apresentaram valores aumentados de IL-10 esse aumento também se manteve na presença do Captopril e PD123319, porém na presença de Ang II + Losartan a secreção de IL-10 foi diminuída quando comparada com tratamento de Ang II ($p=0,005$), o que sugere que o aumento induzido de IL-10 na presença de Ang II é dependente do receptor AT1R, mostrando o envolvimento do receptor AT1 no processo inflamatório do AAA.

Por fim, apresentam-se os delineamentos dos resultados referentes ao Eixo 3, conforme descrito anteriormente:

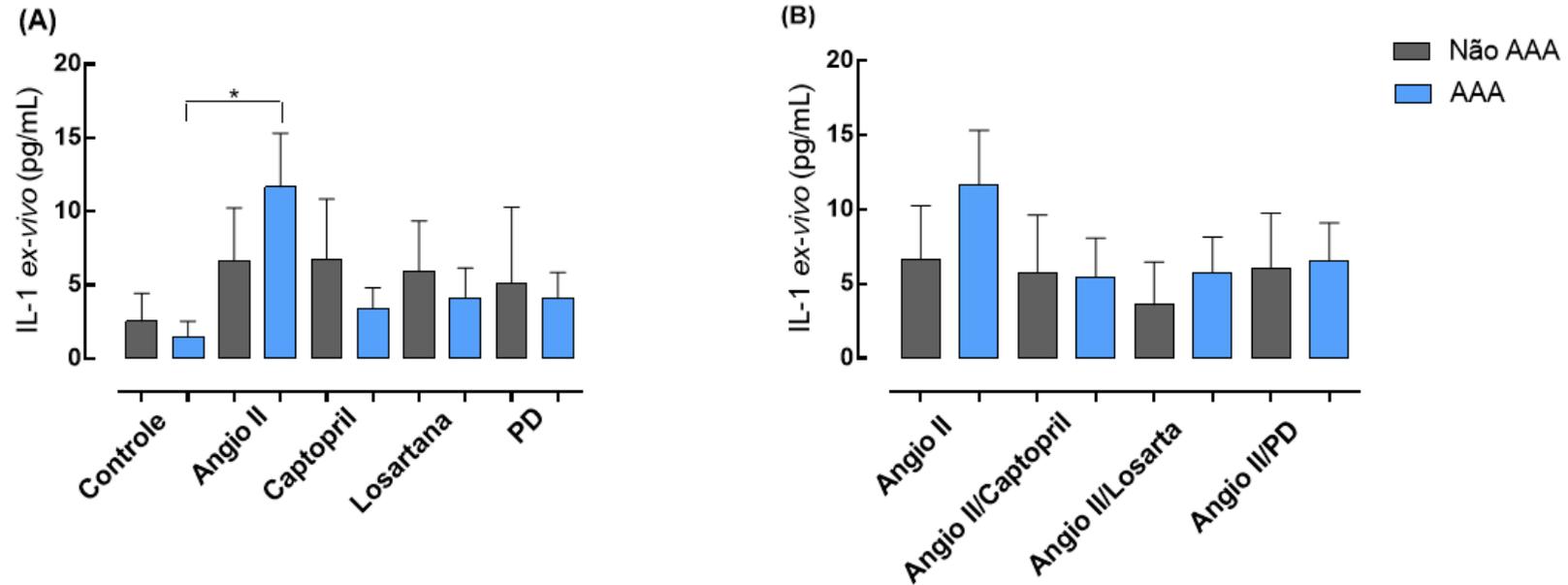
Na figura 25 apresenta a concentração da IL-1 no meio de cultura de aortas abdominais do grupo não AAA e grupo AAA. A IL-1 não apresentou diferenças estatísticas significativas entre os grupos AAA e não AAA na presença ou ausência de Ang1-7. A779 e associação entre Ang1-7 e A779. (Figura 25 A e B)

Na Figura 26 a concentração da IL-6 no meio de cultura de aortas abdominais do grupo não AAA e grupo AAA não apresentou diferenças estatísticas significativas com entre os grupos AAA e não AAA na presença ou ausência de Ang1-7. A779 e associação entre Ang1-7 e A779 (Figura 26 A e B), observa-se que não houve diferenças significativas.

Já em relação à IL-8, (Figura 27 A) quando compara-se os grupos não AAA e AAA, percebe-se o aumento dos níveis de IL-8 nos tecidos incubados com Angio 1-7 (controle versus Ang 1-7 / $p=0,0295$), com maior tendência de aumento ainda para o grupo AAA. Na presença de angio 1-7, a droga A779 não alterou os valores para IL-8 no grupo AAA (controle versus Ang 1-7 + A779 / $p=0,0288$). Na comparação entre os grupos (27 B) houve aumento na presença de Ang 1-7 ($p=0,0429$) e Ang 1-7 + A779 ($p=0,0326$), respectivamente.

Na Figura 28 (A) observa-se que em condições basais (controle e sem tratamento farmacológico) IL-10 apresenta valores aumentados no grupo AAA em relação ao grupo não AAA ($p=0,0009$). A IL-10 também está aumentada no grupo AAA em relação ao não AAA (Figura 28 B) na presença da Ang 1-7 ($p=0,0022$), A779 ($p=0,0058$) e Ang 1-7 + A779 ($p=0,0076$).

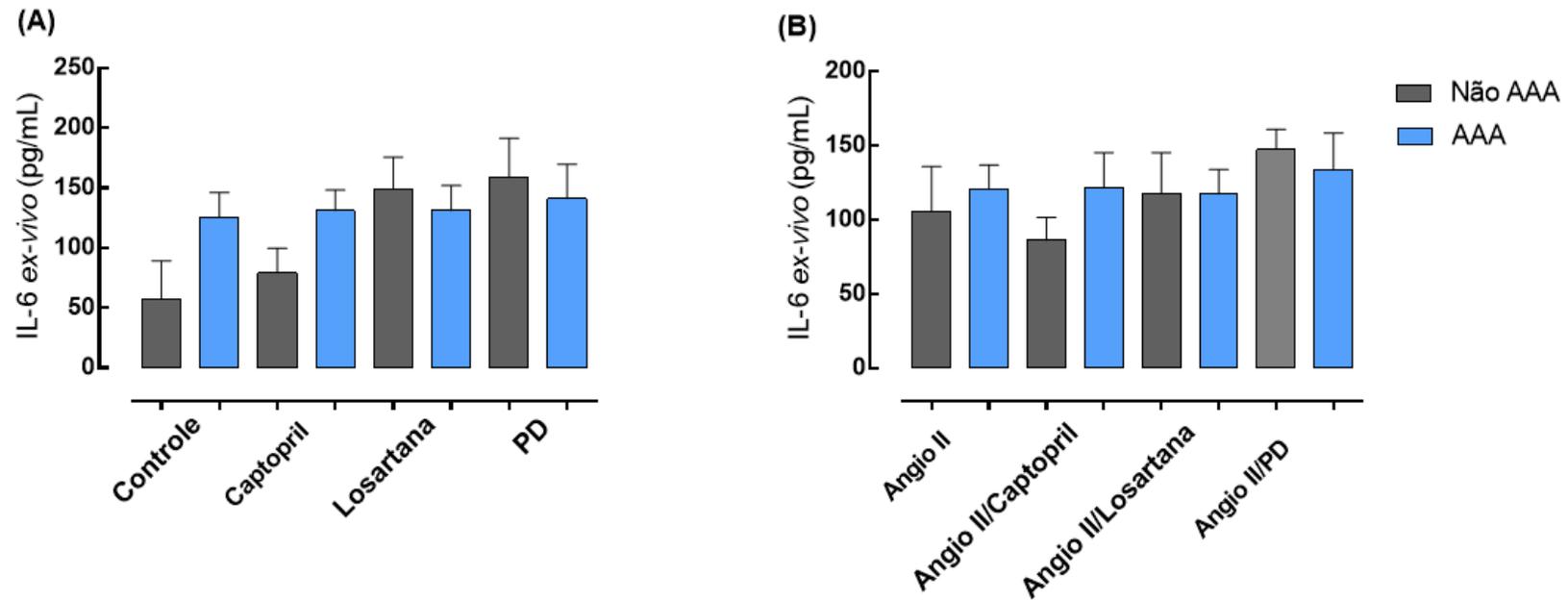
Figura 21: Eixo 2) Concentração da IL-1 no meio de cultura de aortas abdominais do grupo não AAA e grupo AAA, determinados por ELISA.



Fonte: do autor, 2023.

Expressão e comparação de IL-1 entre as drogas no grupo não AAA (n=7) e grupo AAA (n=8). Valores expressos em pg/mL. Dados apresentados como média e erro padrão da média. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste *Mann-Whitney*, com nível de significância para $p < 0,05$.

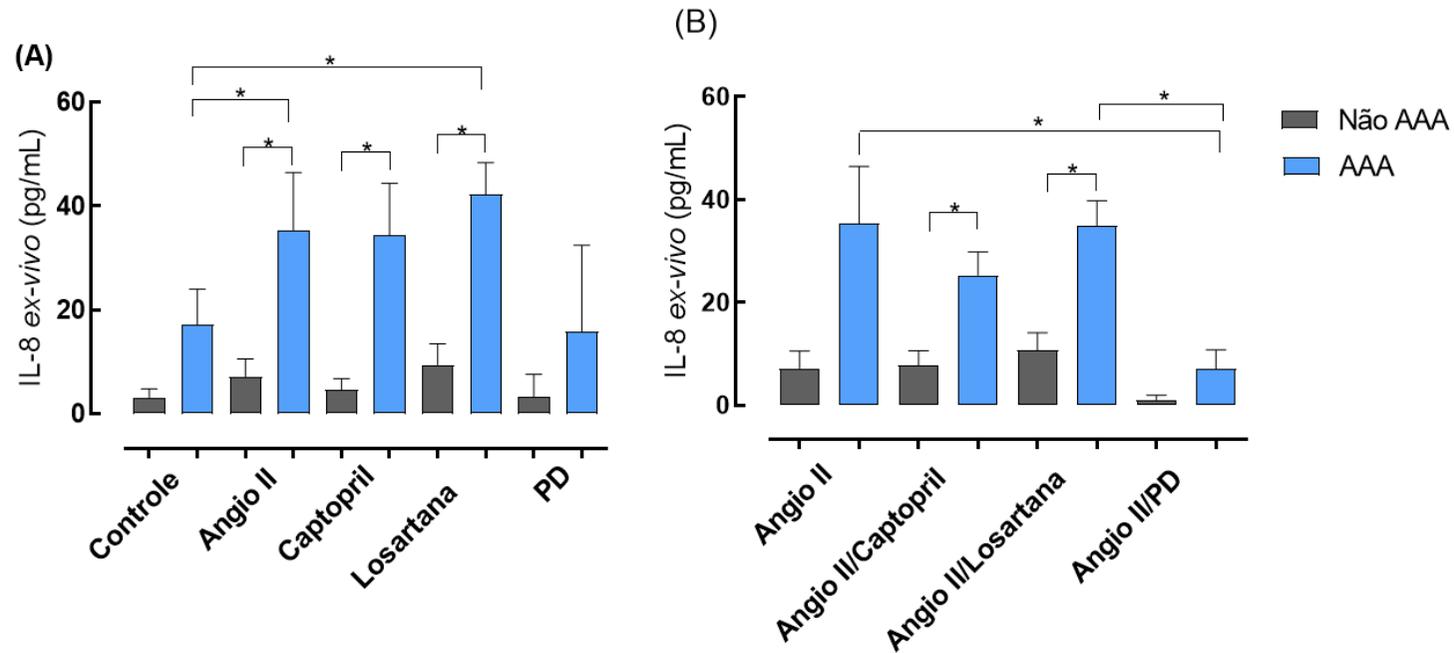
Figura 22: Eixo 2) Concentração da IL-6 no meio de cultura de aortas abdominais do grupo não AAA e grupo AAA, determinados por ELISA.



Fonte: do autor, 2023.

Expressão e comparação de IL-6 entre as drogas no grupo não AAA (n=7) e grupo AAA (n=8). Valores expressos em pg/mL. Dados apresentados como média e erro padrão da média. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste *Mann-Whitney*, com nível de significância para $p < 0,05$.

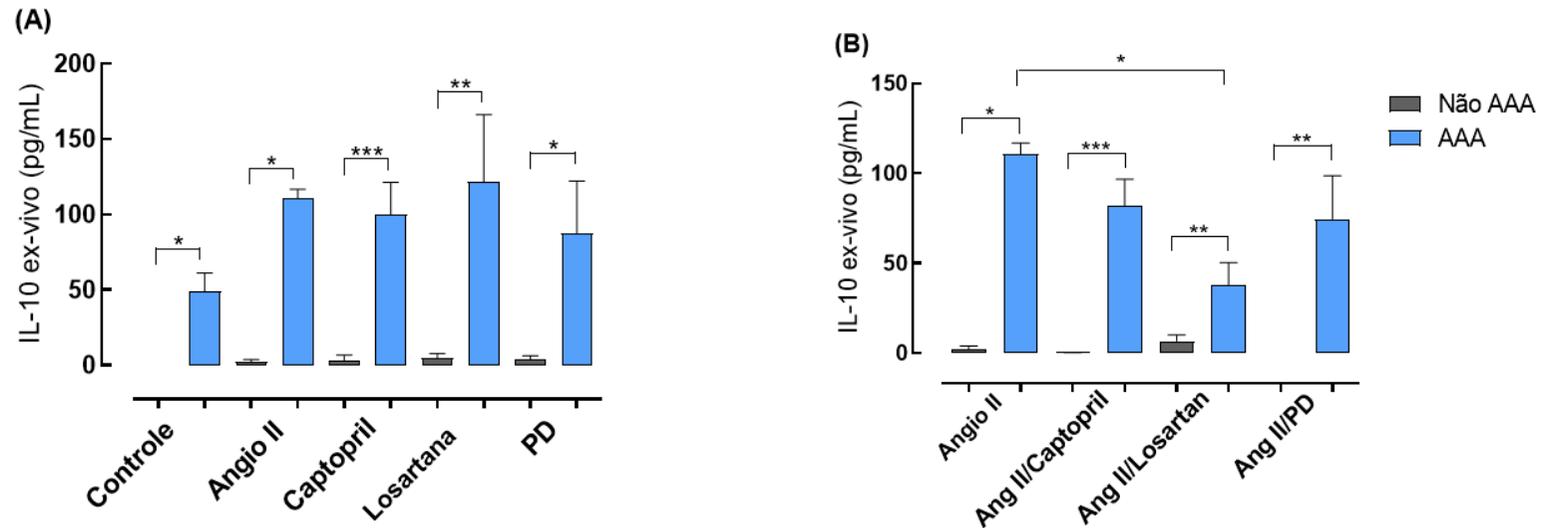
Figura 23: Eixo 2) Concentração da IL-8 no meio de cultura de aortas abdominais do grupo não AAA e grupo AAA, determinados por ELISA.



Fonte: do autor, 2023.

Expressão e comparação de IL-8 entre as drogas no grupo não AAA (n=7) e grupo AAA (n=8). Valores expressos em pg/mL. Dados apresentados como média e erro padrão da média. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste *Mann-Whitney*, com nível de significância para $p < 0,05$.

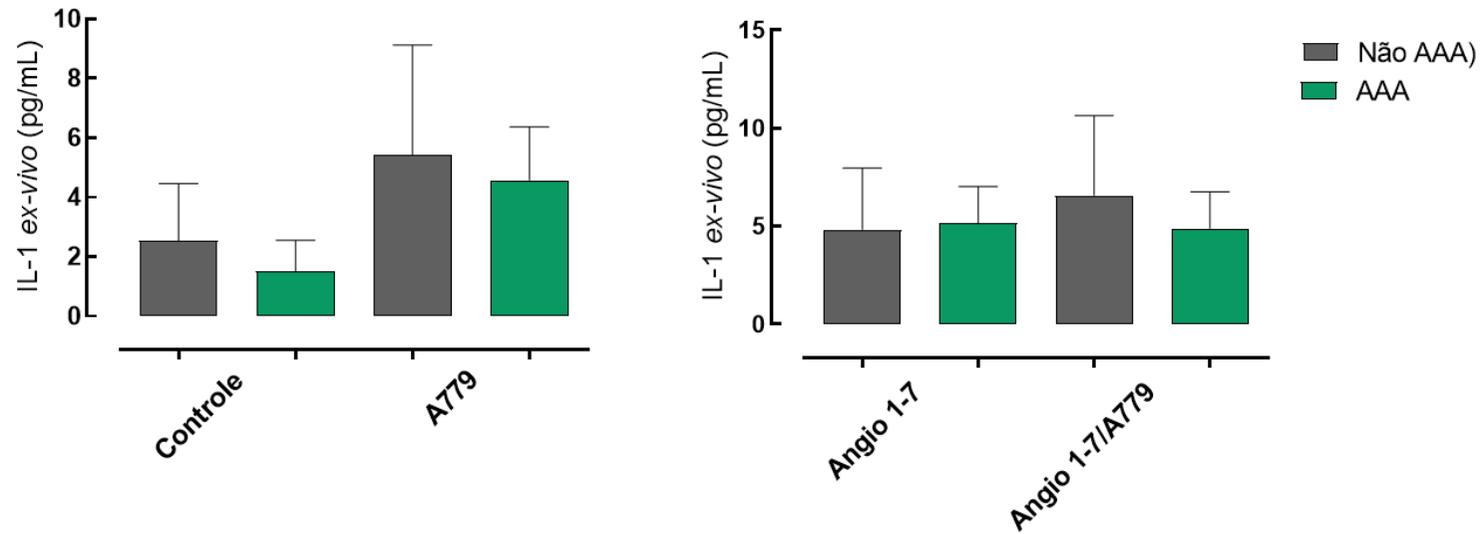
Figura 24: Eixo 2) Concentração da IL-10 no meio de cultura de aortas abdominais do grupo não AAA e grupo AAA, determinados por ELISA.



Fonte: do autor, 2023.

Expressão e comparação de IL-10 entre as drogas no grupo não AAA (n=7) e grupo AAA (n=8). Valores expressos em pg/mL. Dados apresentados como média e erro padrão da média. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste *Mann-Whitney*, com nível de significância para $p < 0,05$.

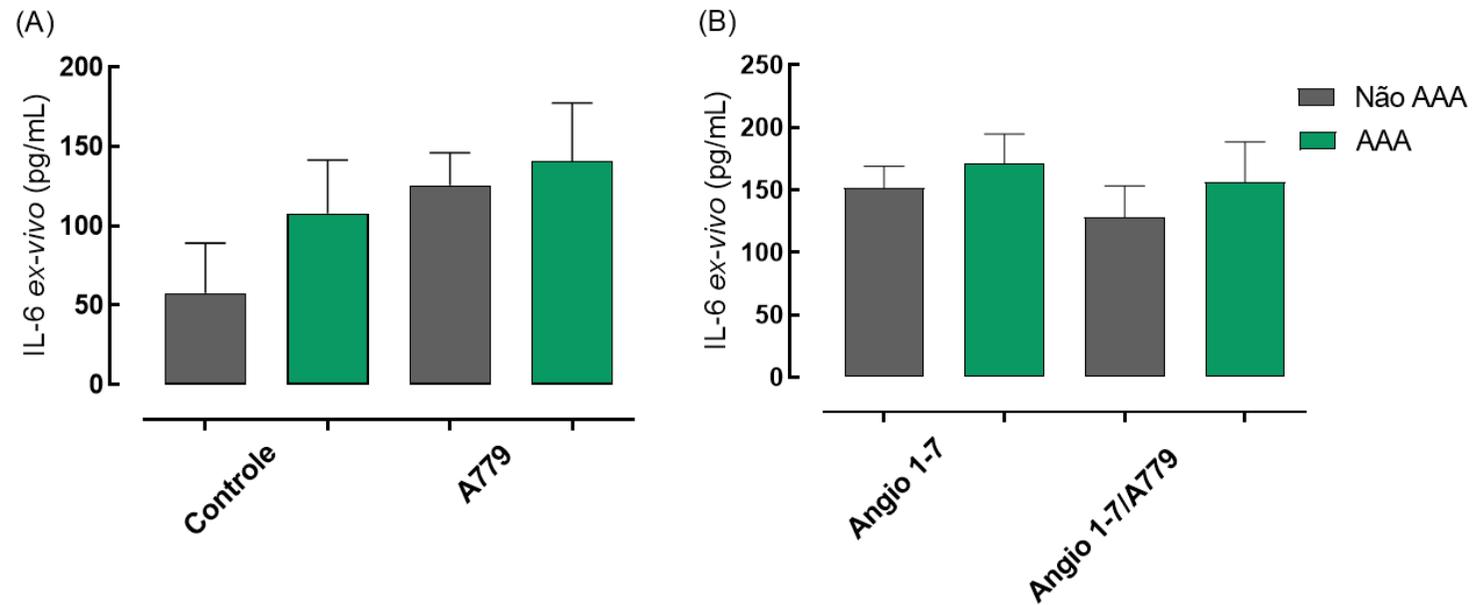
Figura 25: Eixo 3) Concentração da IL-1 no meio de cultura de aortas abdominais do grupo não AAA e grupo AAA, determinados por ELISA.



Fonte: do autor, 2023.

Expressão e comparação de IL-1 entre as drogas no grupo não AAA (n=7) e grupo AAA (n=8). Valores expressos em pg/mL. Dados apresentados como média e erro padrão da média. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste *Mann-Whitney*, com nível de significância para $p < 0,05$.

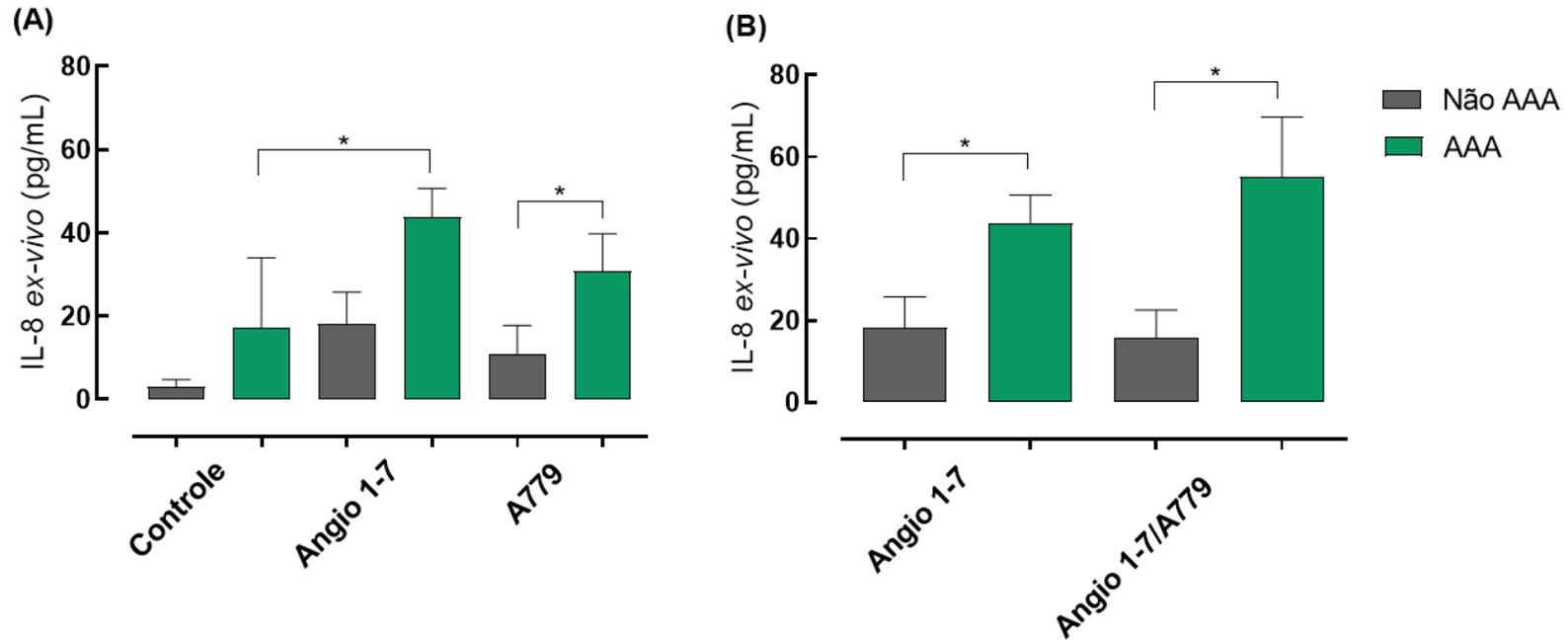
Figura 26: Eixo 3) Concentração da IL-6 no meio de cultura de aortas abdominais do grupo não AAA e grupo AAA, determinados por ELISA.



Fonte: do autor, 2023.

Expressão e comparação de IL-6 entre as drogas no grupo não AAA (n=7) e grupo AAA (n=8). Valores expressos em pg/mL. Dados apresentados como média e erro padrão da média. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste *Mann-Whitney*, com nível de significância para $p < 0,05$.

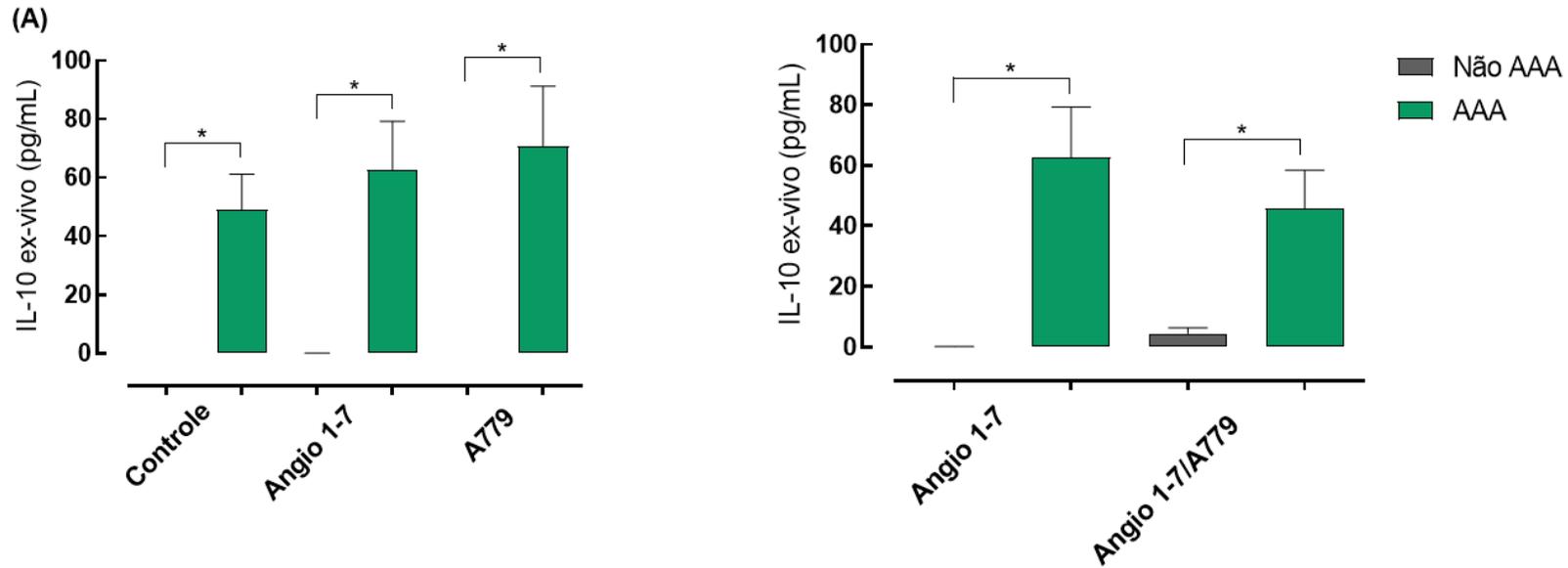
Figura 27: Eixo 3) Concentração da IL-8 no meio de cultura de aortas abdominais do grupo não AAA e grupo AAA, determinados por ELISA.



Fonte: do autor, 2023.

A e B) Expressão e comparação de IL-8 entre as drogas no grupo não AAA (n=7) e grupo AAA (n=8). Valores expressos em pg/mL. Dados apresentados como média e erro padrão da média. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste *Mann-Whitney*, com nível de significância para $p < 0,05$.

Figura 28: Eixo 3) Concentração da IL-10 no meio de cultura de aortas abdominais do grupo não AAA e grupo AAA, determinados por ELISA.



Fonte: do autor, 2023.

A e B) Expressão e comparação de IL-10 entre as drogas no grupo não AAA (n=7) e grupo AAA (n=8). Valores expressos em pg/mL. Dados apresentados como média e erro padrão da média. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste *Mann-Whitney*, com nível de significância para $p < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

Em conjunto, os dados mostraram que as aortas com AAA apresentaram aumento tecidual na secreção dos mediadores inflamatórios IL-1, IL-8 e IL-10 em resposta aos agonistas e inibidores do SRA. Sugerindo, assim, a participação e importância dos componentes do SRA na liberação de mediadores inflamatórios locais e na fisiopatologia do AAA. Os achados histológicos indicam diferenças morfológicas entre as aortas aneurismáticas e sem doença, assim como expressão diminuída de células musculares lisas nas amostras do grupo com AAA em relação ao grupo sem AAA. Além disso, também foi realizada a cultura primária de músculo liso vascular obtida de aorta de humanos, bem como a padronização de qual seria a melhor maneira de preservar o tecido aórtico para a realização da cultura primária de músculo liso vascular e os experimentos *ex-vivo*. Os resultados obtidos pela avaliação da formação de creatinina quinase, nitrato e nitrito, mostraram que o melhor meio para captação e preservação do tecido aórtico foi a solução de Custodiol em detrimento das outras soluções, Ringer lactato ou solução salina. Os dados demográficos, também foram coletados, analisados e comparados entre os participantes, traçando o perfil dos pacientes incluídos.

A compreensão da fisiopatologia do AAA em humanos é de fundamental importância para identificar possíveis alvos terapêuticos para tratamentos e/ou cura dessa doença. Tratamentos farmacológicos podem ser eficazes para inibir o crescimento e a progressão de determinadas doenças, porém ao se tratar dos AAA, a complexidade de utilizar drogas específicas aumenta ainda mais, principalmente por se tratar de uma doença com múltiplos mecanismos desencadeadores envolvidos em sua fisiopatologia, os quais podem ser locais e sistêmicos; genéticos; celulares e humorais, dificultando ainda mais seu possível tratamento e cura (INVESTIGATORS et al., 2015; LIU et al., 2020).

Os dados demográficos e clínicos confirmam dados da literatura que mostram a maior incidência do AAA em homens e a presença do tabagismo na maioria dos pacientes acometidos pela doença (80%). Moll *et al.*, (2011) relatam que o tabagismo na raça branca e no sexo masculino com idade entre 50 e 79 anos é também um dos fatores de risco para desenvolvimento do AAA. Ainda na literatura, Carvalho *et al.*, (2012), descrevem que a idade média de diagnóstico do AAA é em torno dos 65 aos 75 anos, o que também corrobora com os achados deste estudo, com média de intervenção cirúrgica para correção de AAA de 67,6 anos (CARVALHO et al., 2012; MOLL et al., 2011). Os dados

apresentam similaridades com o que vem sendo descrito na literatura em relação ao tabagismo, sexo e comorbidades relacionadas ao desenvolvimento do AAA (AMBLER et al., 2015), sendo a maioria dos pacientes pertencentes ao sexo masculino (65%), brancos (75%), tabagistas (80%), hipertensos (80%) e sobrepesos (60%) (AMBLER et al., 2015; INVESTIGATORS et al., 2015). Um ponto interessante e positivo dos dados está relacionado com a baixa mortalidade dos pacientes submetidos a cirurgia para correção do AAA pelo grupo de Cirurgia vascular do HCFMRP-USP. Em um estudo comparativo realizado a mortalidade cirúrgica descrita acometeu 2,6 % no sexo masculino e a mortalidade na hospitalização foi de 18,4% (AMBLER et al., 2015). No presente trabalho, os dados desse estudo apresentaram nenhuma morte na cirurgia e 30% de mortalidade na hospitalização.

Neste trabalho o grupo sem AAA (ou não AAA) representa o mais próximo possível do que seria um grupo controle, pois as amostras de aorta foram obtidas de pacientes com morte encefálica, na grande maioria, por trauma. Assim, dentro do possível no grupo não AAA, propôs-se selecionar, os pacientes que não apresentaram fatores de predisposição ao AAA, tais como: AVC, tabagismo atual, histórico familiar de doenças vasculares, como sugerido em literatura atual, a fim de selecionar amostras para serem controles mais fidedignos (KHOURY; STRANZ; LIU, 2020).

Nesse estudo, as dosagens de CK foram realizadas para avaliar a lesão tecidual que poderia ocorrer dependendo do meio de preservação e o tempo entre a cirurgia de captação da aorta do paciente e a realização dos experimentos laboratoriais, assim para uma melhor manutenção e preservação das condições do tecido aórtico. Pensando em mecanismos de degradação de tecidos musculares, especificamente de células musculares lisas, a atividade da isoenzima CK destaca-se na literatura por ser um marcador significativo de lesão tecidual/celular (WU *et al.*, 2021). Trata-se de um dímero composto por duas subunidades, sendo: B (do inglês *brain* = cerebral) e M (*muscle* = muscular) que formam assim, três frações enzimáticas principais e diferentes, sendo denominadas de CK-BB (CK-1), CK-MB (CK-2) e CK-MM (CK-3). Mais especificamente, a isoenzima CK-BB é comumente encontrada no cérebro e no pulmão, sendo quase inexistente no sangue periférico. Já a CK-MM é responsável por cerca de 95% da CK presentes nos músculos e cerca de 70-75% dessa enzima se encontra presente no músculo do miocárdio. Por fim, a CK-MB trata-se de uma fração híbrida composta de cadeias M e B, encontrada predominantemente nos músculos, principalmente nos músculos cardíacos. Assim sendo,

suas especificações destinam-se para determinação de degradação tecidual, principalmente nos diagnósticos de Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) e lesões cerebrais traumáticas, por meio dos valores elevados de “CK-Total” (a saber sua junção de todos os compostos para diagnóstico laboratorial: CK-MM, CK-BB e/ou CK-MB) (BEKKELUND, 2020; ZWIRNER et al., 2021).

Considerando que a CK-Total são isoenzimas intracelulares, localizadas em maior proporção nos músculos cardíacos, lisos, esqueléticos, cerebrais e até mesmo no plasma, estudos atuais correlacionam sua alta atividade com processos inflamatórios, dentre eles: obesidade, inflamações diversas, aumento do risco de doenças cardiovasculares, distrofia muscular, infarto pulmonar, doenças vasculares, doenças cerebrais agudas, convulsões, alcoolismo crônico, traumas, queimaduras, hipotireoidismo, acromegalia, IAM e até mesmo na identificação de drogadição por uso de cocaína (WU et al., 2021). Suas atividades séricas no plasma sanguíneo são aumentadas rapidamente, a partir de um estímulo de lesão traumática em determinado tecido, podendo ser mensuradas nas primeiras 2 a 6 horas após estiramento muscular, alcançando seus valores máximos entre 18 e 24 horas e podendo ultrapassar 20 vezes seu valor normal, sendo umas das provas mais sensíveis para o diagnóstico de doenças coronarianas e cardiovasculares (BEKKELUND, 2020). Além do mais, estudos que quantificam a expressão de CK após protocolos de treinamentos físicos demonstraram o aumento de seus níveis no plasma, após estas intervenções (WU *et al.*, 2021).

Além disso, nesse sentido, Thurner *et al.* (2020), identificaram e normalizaram os níveis de CK-Total livre em culturas celulares de músculo liso do intestino e reto de ratos, a fim de manter a vitalidade celular e a proteção das células (THURNER et al., 2020). Considera-se então que, o aparecimento dessas isoenzimas reflete em alterações importantes ocorridas nas estruturas internas dos vasos e na musculatura. Assim, neste estudo a CK foi avaliada como marcador de lesão tecidual, e podemos observar que os resultados apresentados demonstram o menor índice de CK no tecido imerso em Custodiol®, mantendo-se assim em todos os tempos de comparação, apresentando, por fim, os melhores resultados. Acompanhado ao Ringer, que apresentou os segundos melhores resultados e a Salina com os piores resultados, respectivamente, Vivacqua e colaboradores (2020), descreveram o sucesso do uso da solução de Ringer como inibidor da apoptose celular do tecido conjuntivo osteocondral fresco, captado de pacientes em

ME, no transporte dessas amostras a 10°C (VIVACQUA et al., 2020). E ainda, em associação com antibióticos, os autores descreveram que a solução poderia manter-se com viabilidade do tecido para aloenxertos, a serem implantados em até sete dias de armazenamento.

Um importante achado dos dados apresentados foi o transporte do fragmento aórtico utilizando a solução de Custodiol®, o que permitiu a obtenção de VSMCs primárias viáveis, sendo isoladas e cultivadas, a partir do quinto dia de incubação. A solução de Custodiol® que possui em sua composição os aminoácidos essenciais: histidina, cetoglutarato e triptofano, apresentou-se como a melhor solução pelos nossos dados. O Custodiol apresenta altas concentrações de Histidina, o que podem acentuar seus melhores desempenhos por estarem relacionados aos atenuantes de acidose, causados pela acumulação de metabólitos anaeróbios durante o período de isquemia celular. Com a presença do Cetoglutarato a produção de adenosina trifosfato também é melhorada durante a falta de perfusão, sendo ainda o Triptofano presente na solução, responsável pela estabilização da membrana celular do tecido (GATTI, 2020).

O uso da solução para transporte e manejo das amostras permitiu um avanço significativo para o procedimento operacional padrão de cultura celular primária desenvolvido, sendo possível por meio dele o isolamento, a purificação e o crescimento celular de VSMCs provenientes de aortas abdominais humanas. A cultura de células VSMCs *in vitro* foi demonstrada anteriormente em algumas espécies: camundongos, porcos e cães (DINARDO et al., 2012; DINARDO et al., 2014; OOSTERHOFF et al., 2016; MEEKEL et al., 2018). No entanto, os protocolos para estabelecer uma cultura de células VSMC viáveis da aorta humana são escassos (LIU et al., 2015). Embora as abordagens animais sejam essenciais para estudar metodologias, elas podem ser incapazes de manter as funções complexas do tecido aórtico humano em todas as suas funções e constante remodelação tecidual (LIU et al., 2015; SHERIFOVA & HOLZAPFEL, 2019).

Em um estudo experimental piloto, Vanerio (2020) e colaboradores, produziram de forma viável, *in vitro*, dispositivos endovasculares (com biorreatores) como base para inserção e cultivo de células nativas de porco, em uma cultura primária, apresentando assim um modelo de engenharia de tecidos para estudar doenças aneurismáticas. Após maturação celular, o modelo foi induzido ao aneurisma e as amostras mostraram-se

responsivas aos ensaios determinados, demonstrando assim, a primeira experiência de associação entre um dispositivo utilizado na clínica médica com VSMCs, em um modelo experimental, para estudar os mecanismos patológicos mais próximos de ambientes *in vivo* em mamíferos. Sendo assim, urge-se a necessidade de desenvolver novos protocolos de pesquisas *in vitro*, que mimetizam os ambientes fisiopatológicos dessas doenças em pacientes humanos, a fim de estudá-las e tratá-las (OOSTERHOFF *et al.*, 2016; MEEKEL *et al.*, 2018).

A técnica de histologia em H/E é comumente utilizada para estudos morfológicos teciduais comparativos, sendo essa uma ferramenta norteadora simples, com a coloração básica dos componentes ácidos, como o núcleo (hematoxilina) e a coloração ácida dos componentes básicos, como o citoplasma (eosina). A aorta aneurismática apresenta perda de tônus elástico da parede aórtica podendo resultar, em longo prazo, o seu rompimento. Sendo assim, como visualizado pelos dados apresentados neste trabalho ocorreu uma evidente alteração morfológica do tecido no grupo AAA em comparação ao grupo não AAA, corroborando com outros achados de outros estudos (DUQUE; CASTRO, 2023; LADICH *et al.*, 2016). Além disso, foi possível identificar, por meio da técnica, fibras de elastina grossas, concêntricas e homogêneas entre as camadas do tecido não aneurismático (grupo não AAA). Quanto às amostras do grupo AAA, as imagens de fibra actina apresentam-se com aspecto mais fino, flácido e fragmentado, ocupando maior volume na camada média da artéria, onde foi possível observar a presença de vacúolos intersticiais, provavelmente oriundos de processos inflamatórios, hiperplasia tecidual e, até mesmo, angiogênese (*vasa vasorum*) como descritos na literatura atual (SEDDING *et al.*, 2018).

Os achados histológicos indicam que houve diferenças morfológicas entre os grupos não AAA e AAA. Além disso, os resultados apresentados por IF confirmam tais características distintas e importantes entre os grupos, com preservação significativa na imunofluorescência das fibras de actina no grupo não AAA, o que reforça a preservação das fibras em indivíduos saudáveis, conforme literatura (ZHONG *et al.*, 2019). Ao se tratar de estruturas básicas de formação e sustentação das células do tecido aórtico, a α -SMA, pertencente à família de proteínas da actina, que são proteínas altamente conservadoras, desempenham um papel importante na contratilidade, estrutura e integridade das células musculares lisas. As isoformas de alfa, beta e gama de actina

podem ser identificadas com α -actina, sendo um dos principais constituintes do sistema contrátil da aorta, enquanto beta e gama actinas estão envolvidas na regulação da motilidade celular (PATEL; DEEB, 2008).

Os achados no presente estudo estão de acordo com a literatura, onde houve nítidas diferenciações entre as expressões da α -SMA, nos grupos não AAA e AAA. A α -SMA se apresenta como uma proteína ubíqua envolvida com a formação de filamentos que constituem grandes porções do citoesqueleto, como se pode ver nos resultados encontrados, estando presente em maior quantidade nas células saudáveis e não acometidas pelo AAA. Sendo essas de extrema importância na dinâmica e integralidade do vaso, apresentaram-se de formas e estruturas alteradas em indivíduos com a patologia vascular, conforme descrito anteriormente na literatura (ZHONG et al., 2019).

Além disso, há um aumento de infiltrado de macrófagos, mostrado pela marcação de CD68, nas amostras de aortas obtidas de pacientes com AAA em relação ao grupo não AAA. CD68 é uma proteína com especialidade de expressão restrita por meio dos macrófagos (BOYTARD et al., 2013). Trata-se de um tipo de célula pertencente ao sistema imunológico que desempenha um papel pró-inflamatório em lesões agudas e crônicas (KASASHIMA et al., 2018). Estudos demonstraram que os macrófagos CD68 se acumulam em tecidos cardiovasculares, podendo ser associados a cascatas de lesões patogênicas que promovem a polarização inflamatória e proliferação dos macrófagos, resultando assim, na formação de aneurismas da aorta abdominal (BOYTARD, 2013; KASASHIMA et al., 2018).

Sendo assim, a presença de transmembranas CD68, são expressas na superfície de linfócitos, macrófagos, células endoteliais e VSMC, participando ativamente na geração de estresse oxidativo e em processos inflamatórios subjacentes ao remodelamento vascular, contribuindo para a apoptose celular, sob diferentes condições patológicas, sendo este um importante marcador de inflamação aumentado no grupo AAA nos achados desse estudo (SÁNCHEZ-INFANTES et al., 2021). Além disso, estudos associam ainda que, células CD68 localizadas dentro de paredes aórticas, associa-se com o marcador celular Ki67 (marcador de proliferação celular), sugerindo um papel inflamatório das células-tronco durante a patogênese do AAA (RYER et al., 2015).

Para avaliar a participação do SRA e a relação com os mediadores inflamatórios,

foram realizados experimentos “*ex-vivo*”, onde um fragmento da aorta foi incubado em meio de cultura na ausência e presença de inibidores do SRA. Posteriormente, foram analisados os mediadores inflamatórios secretados para o meio de cultura na presença dos inibidores do SRA. Os experimentos “*ex-vivo*” demonstraram uma possível interação entre os peptídeos de Ang, as enzimas e receptores AT1R e AT2R e a secreção dos mediadores inflamatórios, sendo esta secreção mais proeminente no grupo AAA.

Os achados relacionados com o SRA mostraram que este sistema contribui na fisiopatologia do AAA, aumentadas nas aortas dos pacientes com AAA quando comparadas com os pacientes não AAA. É interessante notar que ao estimular os tecidos aórticos com os peptídeos Ang I, Ang II e Ang 1-7 na cultura *ex vivo*, observou-se um aumento das secreções dos mediadores inflamatórios específicos, como destacadamente a IL-1, IL-8 e IL-10, com 6 horas de incubação. A técnica utilizada permitiu mimetizar as mesmas condições fisiológicas do tecido de forma experimental, em cultura *ex-vivo*, sendo primada pela própria doença inflamatória, por meio de estímulos naturais encontrados *in vivo* já que o tecido fresco esteve ativo na cultura dando continuidade aos processos reativos em condições naturais, como vê-se nos resultados aqui encontrados.

A IL-1 é uma citocina pró-inflamatória responsável pela proliferação e ativação de linfócitos B, neutrófilos, monócitos/macrófagos, aumentando as atividades quimiotáticas e fagocitárias. Além disso, a IL-1 é capaz de estimular a adesão de leucócitos, aumentando a expressão das moléculas de adesão pelas células endoteliais resultando no aumento da atividade de coagulação, tendo participação na gênese da coagulação intravascular disseminada (FERRARIO; STRAWN, 2006). Os resultados obtidos neste estudo demonstram o aumento de IL-1 em ambos os grupos via Ang I e Ang II, mas não em resposta a Ang 1-7.

Destacada como uma das citocinas mais importantes do corpo, com papel na regulação de diferentes processos fisiológicos e patológicos, como em doenças inflamatórias agudas e crônicas, a IL-6 está intimamente relacionada com a imunidade inata e adaptativa, sendo a principal indutora dos reagentes de fase aguda e modulação reativa com linfócitos T, B, monócitos e atração de eosinófilos para o local de inflamação (PRABHU; FRANGOIANNIS, 2016). Por possuírem alta permeabilidade celular, são encontradas em grandes quantidades nos tecidos musculares e adiposos, produzindo alta resposta inflamatória. Os resultados aqui obtidos demonstram que IL-6 não apresentou

diferença estatística entre os grupos, muito provavelmente por suas vias de marcação, as quais provém de outros eventos pró-inflamatórios, sendo a mesma relacionada a outras inflamações. Sendo assim, provavelmente a IL-6 já se apresenta alterada devido ao AAA e/ou outras patologias, inclusive no grupo não AAA.

IL-8 é uma citocina estimulada e aumentada via IL-1, TNF- α e interferon-gama (IFN- γ), tendo como principal ação o grande estímulo migratório para as células do sistema imune, principalmente neutrófilos, determinando ainda, um aumento da expressão de moléculas de adesão por células endoteliais, assim como, IL-1. Além disso, é responsável pelo aumento do metabolismo oxidativo, produzindo fatores quimiotáticos que atraem células de defesa, resultantes de lesão tecidual, invasão microbiana ou atividade imunológica (FERRARIO & STRAWN, 2006; DAVIS & GALLAGHER, 2019; KUMAR *et al.*, 2019). Os achados aqui apresentados demonstram que Ang I e Captopril (inibidor da ECA) incubados isoladamente aumentaram a secreção de IL-8 nos grupos, diferentemente da Quimostatina (inibidor de ELA-2). Em adição, Captopril e Quimostatina associados à Ang I também aumentaram a secreção de IL-8, assim como visto em IL-1.

Ainda, Ang II aumentou a secreção de IL-8 no grupo AAA. Não houve aumento de secreção na presença do Captopril (inibidor da ECA), diferentemente na presença de Losartan (antagonista do receptor AT1) onde houve o aumento de IL-8. Além disso, em associação de Ang II + Losartan e Ang II + PD (antagonista do receptor AT2) não houve aumento de secreção de IL-8 em comparação à Ang II isoladamente. Sendo assim, conclui-se que o mecanismo de aumento de secreção em IL-8 é atenuado quando bloqueado pelos receptores de AT1 e AT2, apresenta uma diminuição. Ou seja, o aumento de IL-8 no AAA provavelmente é via receptor MAS. Já em Ang 1-7 apresenta-se aumento de secreção em IL-8 em ambos os grupos sendo maior no grupo AAA. Ao inibir o receptor A779 não houve diferenças estatísticas, reforçando assim que o aumento de IL-8 no AAA é, provavelmente, através do receptor MAS.

Em um estudo, Kanamoto e colaboradores (2020), comprovaram a exogeneidade apresentada em culturas *ex vivo*, que promovem secreção destas interleucinas, oriundas de tecidos humanos, com AAA. A IL-1 e IL-8 são citocinas pró-inflamatórias, estimulantes da resposta imune em cascata, caracterizam-se seus perfis reativos em exposições e danos agudos nos tecidos conduzindo-os à inflamação, seja essa oriunda de

um processo fisiopatológico, como o AAA, ou em casos de lesões traumáticas graves do tecido. Destaca-se a IL-8 como uma citocina atuante tanto na resposta imune inata, sendo relacionada principalmente a distúrbios crônicos, aumentando a permeabilidade do endotélio em estado de hipoperfusão (KANAMOTO et al., 2020; SOUZA et al., 2008).

IL-10 é produzida principalmente por células CD8+ ativadas, sendo sua principal função inibir a síntese de outras citocinas, como o IFN- γ , IL-2, IL-12, TGF- β . Atua como um coestimulador para a proliferação de mastócitos e seus progenitores, tendo ação tanto anti-inflamatória, quanto pró-inflamatória, suscitando assim, o equilíbrio do direcionamento da inflamação (imunorregulação) via efeito direto em monócitos-macrófagos, inibindo a ativação de células T (GROENINK *et al.*, 2013; PRABHU & FRANGOIANNIS, 2016; DAVIS & GALLAGHER, 2019; KUMAR *et al.*, 2019). Nos resultados aqui apresentados, isoladamente Ang I não altera a secreção de IL-10, porém na presença dos inibidores de ECA e ELA-2 o aumento é significativo. Isso ocorre não pela presença de Ang, mas sim pela presença desses inibidores. IL-10 é uma citocina tanto anti-inflamatória quanto pró-inflamatória, suscitando o equilíbrio do direcionamento da inflamação. Os achados demonstram que em IL-10, a droga foi responsável por seu aumento da secreção e não pelo peptídeo (Ang I).

IL-10 apresenta aumento significativo nos controles dos grupos AAA versus não AAA, assim como, em adição a Ang II. Na presença de Losartan (antagonista do receptor AT1) houve bloqueio de IL-10. Sendo assim seu aumento pode estar relacionado via estimulação de AT1. Ainda, IL-10 apresenta aumento significativo no grupo AAA versus não AAA, assim como, em adição a Ang 1-7. Na presença de A779 e Ang 1-7+A779 o perfil de aumento se mantém, mostrando que o aumento de IL-10 não está nessa via especificamente. Há evidências crescentes do seu potencial protetor em comparação ao equilíbrio de marcadores como IL-1 e IL-18. Curiosamente, os inibidores da ECA e ELA-2 aumentam os níveis de IL-10 no grupo com AAA, enquanto apenas o antagonista do receptor AT1 reduz os níveis circulantes de IL-10 no mesmo grupo.

Os achados apresentados nas secreções, também corroboram com o estudo de Lindeman *et al.* (2008), que retiraram fragmentos de parede aneurismática da aorta humana e demonstraram existente expressão e ativação aumentada de interleucinas, principalmente IL-8 e IL-10, sugerindo assim que esses pacientes apresentam um processo de ativação de células inflamatórias tecidual mediando a sinalização entre

linfócitos e leucócitos. Essas interleucinas parecem estimular as atividades de metaloproteinases, contribuindo para a destruição de colágeno na área da lesão. Aumentam também o metabolismo oxidativo e estimulam a migração das células do sistema imune. Tais interleucinas estimulam a adesão de leucócitos, aumentando a expressão das moléculas de adesão por meio das células endoteliais, tendo participação na gênese intravascular disseminada (CAROLINA et al., 2021; LINDEMAN et al., 2008), os quais corroboram com os achados experimentais, clínicos e demográficos desse estudo.

A IL-8 apresenta-se elevada no grupo AAA ao adicionar Ang 1-7, em comparação ao grupo não AAA. Além disso, IL-10 mantém-se também elevada na presença de Ang 1-7, A779 e em adição de Ang 1-7 + A779 no grupo AAA. Achados anteriores demonstram que o eixo Ang 1-7 (ECA2/Ang 1-7/MAS) apresenta uma via benéfica contrarreguladora endógena dentro do SRA, proporcionando uma reparação de danos nos tecidos que apresentam Ang II em abundância, tornando-se evidente a partir de uma clivagem com auxílio de ECA2 e ligando-se ao seu receptor MAS acoplado à proteína G. Tal antagonismo previne vários efeitos deletérios, como inflamação e apoptose (PASSAGLIA et al., 2023). Assim, pode-se afirmar que essa via apresenta ação contra-reguladora, podendo contribuir quando os níveis de Ang II estão latentes após lesões das aortas nos pacientes AAA (SANTOS et al., 2013). O aumento das interleucinas 8 e 10, na presença de Ang 1-7, pode sugerir que essa elevação deve estar associada com o equilíbrio do organismo em conter a inflamação do vaso, como descrito na literatura atual.

Portanto, IL-1, IL-8 e IL-10 apresentam aumento significativo no grupo AAA, já nos controles sem adição de qualquer droga, quando comparado ao grupo não AAA. Esses níveis se potencializam na adição dos peptídeos Ang I e Ang II no grupo AAA, também em relação ao grupo não AAA. Entretanto, ao incubar Captopril, Quimostatina, Losartan e PD123319 junto a esses peptídeos aos tecidos, houve alterações significativas destas interleucinas.

Em conjunto, os dados apresentados sugerem a participação dos SRA tecidual interagindo com processo inflamatório na fisiopatologia do AAA em humanos. Por fim, tais achados e mecanismos descritos na literatura e evidenciados no atual estudo apresentam potenciais na investigação de fisiopatologias aneurismáticas, assim como, o

acompanhamento da evolução dos biomarcadores clínicos. Além disso, este estudo usou VSMCs de aortas abdominais humanas, um protocolo pioneiro, com potencial contribuição para futuros estudos de fisiopatologia vascular.

Ressalta-se que o projeto foi desenvolvido mesmo em meio a pandemia mundial do COVID-19.

7. CONCLUSÃO

Em conjunto, os dados apresentados neste estudo mostraram a participação dos SRA tecidual interagindo com processo inflamatório na fisiopatologia do AAA em humanos. Além disso, este trabalho mostrou a importância do uso do Custodiol como solução preservante para o transporte e manutenção das aortas humanas, o que permitiu que fosse desenvolvido um protocolo replicável para crescimento de células do músculo liso aórtico humano em cultura primária.

Os achados histológicos indicam diferenças morfológicas entre as aortas com AAA e sem AAA, assim como expressão diminuída de células musculares lisas nas amostras do grupo com AAA em relação ao grupo sem AAA. Os dados sugerem que as aortas com AAA apresentaram aumento tecidual na secreção dos mediadores inflamatórios IL-1, IL-8 e IL-10 em resposta aos inibidores do SRA. Desta forma, os resultados confirmam a participação e importância dos componentes do SRA na fisiopatologia do AAA influenciando os mediadores inflamatórios locais.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, G. F. F.; FERNANDES, H. P. M.; ALVES, R. F. ANEURISMA DE AORTA ABDOMINAL: UMA ANÁLISE CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA DO ESTADO DO TOCANTINS NOS ÚLTIMOS 20 ANOS. **Revista de Patologia do Tocantins**, v. 8, n. 1, p. 48–57, 2021.
- AMBLER, G. K. et al. The Abdominal Aortic Aneurysm Statistically Corrected Operative Risk Evaluation (AAA SCORE) for predicting mortality after open and endovascular interventions. **Journal of Vascular Surgery**, v. 61, n. 1, p. 35- 43.e1, 1 jan. 2015.
- ARNAOUTAKIS, D. J.; UPCHURCH, G. R. Abdominal Aortic Aneurysm Screening Is Safe yet Lacks Effectiveness: Looking Beyond Size Criteria. **Circulation**, v. 139, n. 11, p. 1381–1383, 12 mar. 2019.
- BADER, M.; GANTEN, D. Update on tissue renin–angiotensin systems. **Journal of Molecular Medicine**, v. 86, p. 615–621, 2008.
- BARBOSA, J. M. **Comparação do perfil dos mediadores inflamatórios, metaloproteínas 2 e 9 e seus inibidores teciduais 1 e 2 na aorta e no plasma de pacientes com aneurisma de aorta abdominal e controles**. Mestrado em Clínica Cirúrgica—Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 21 jan. 2022.
- BECARI, C. et al. Role of Elastase-2 as an Angiotensin II-Forming Enzyme in Rat Carotid Artery. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 46, n. 4, p. 498, out. 2005.
- BECARI, C. et al. Elastase-2, a tissue alternative pathway for angiotensin II generation, plays a role in circulatory sympathovagal balance in mice. **Frontiers in physiology**, v. 8, p. 170, 2017.
- BECARI, C. et al. Epilepsy Seizures in Spontaneously Hypertensive Rats After Acoustic Stimulation: Role of Renin–Angiotensin System. **Frontiers in Neuroscience**, v. 14, p. 588477, 2020.
- BECARI, C.; OLIVEIRA, E. B. DE; SALGADO, M. C. DE O. Alternative pathways for angiotensin II generation in the cardiovascular system. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, p. 914–919, 2011.
- BEKKELUND, S. I. Leisure physical exercise and creatine kinase activity. The Tromsø study. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 30, n. 12, p. 2437–2444, dez. 2020.
- BOESE, A. C. et al. Sex differences in abdominal aortic aneurysms. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 314, n. 6, p. H1137–H1152, jun. 2018.
- BOSNYAK, S. et al. Relative affinity of angiotensin peptides and novel ligands at AT1 and AT2 receptors. **Clinical science**, v. 121, n. 7, p. 297–303, 2011.

BOUCHEMI, M. et al. Impaired nitric oxide production in patients with primary open-angle glaucoma. **La Tunisie Medicale**, v. 98, n. 2, p. 144–149, fev. 2020.

BOYTARD, L. et al. Role of proinflammatory CD68(+) mannose receptor(-) macrophages in peroxiredoxin-1 expression and in abdominal aortic aneurysms in humans. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 33, n. 2, p. 431–438, fev. 2013.

CAROLINA, D. et al. MMP-2 and MMP-9 levels in plasma are altered and associated with mortality in COVID-19 patients. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 142, p. 112067, 2021.

CARVALHO, A. T. Y. DE et al. Infrarenal abdominal aortic aneurysm: significance of screening in patients of public hospitals in the metropolitan region of Salvador-Bahia, Brazil. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 11, p. 289–300, 2012.

CHAI, S. Y. et al. What's new in the renin-angiotensin system? The angiotensin IV/AT 4 receptor. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 61, p. 2728–2737, 2004.

CHEN, S.-W. et al. Association of Long-term Use of Antihypertensive Medications With Late Outcomes Among Patients With Aortic Dissection. **JAMA Network Open**, v. 4, n. 3, p. e210469, 3 mar. 2021.

CORNER, J. A.; BERWANGER, C. S.; STANSBY, G. Preservation of vascular tissue under hypothermic conditions. **Journal of Surgical Research**, v. 113, n. 1, p. 21–25, jul. 2003.

CORSI, C. A. C. et al. Isolation and primary culture of human abdominal aorta smooth muscle cells from brain-dead donors: an experimental model for vascular diseases. **Cell and Tissue Banking**, 5 maio 2023.

COSENZA, M. et al. Efeito da solução de Ringer com lactato sobre os equilíbrios hidroeletrólítico e acidobase de equinos, ovelhas e bezerros sadios. **Ciência Rural**, v. 43, n. 12, p. 2247–2253, 1 out. 2013.

CRKVENAC GREGOREK, A. et al. Association of 1166A>C AT1R, -1562C>T MMP-9, ACE I/D, and CCR5Δ32 Polymorphisms with Abdominal Aortic Aneurysm in Croatian Patients. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, v. 20, n. 10, p. 616–623, out. 2016.

DAUGHERTY, A.; MANNING, M. W.; CASSIS, L. A. Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 105, n. 11, p. 1605–1612, 2000.

DAVIS, F. M.; GALLAGHER, K. A. Epigenetic Mechanisms in Monocytes/Macrophages Regulate Inflammation in Cardiometabolic and Vascular Disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 39, n. 4, p. 623–634, abr. 2019.

DAVIS, F. M.; RATERI, D. L.; DAUGHERTY, A. Mechanisms of aortic aneurysm formation: translating preclinical studies into clinical therapies. **Heart**, v. 100, n. 19, p. 1498–1505, 2014.

DE ASSIS, J. A. C.; DUQUE, M. A. A. Aneurisma de aorta abdominal, aspectos, patogenicidade, diagnóstico e terapia. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 12, p. 93944–93958, 2020.

DE GASPARO, M. et al. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 3, p. 415–472, 2000.

DE GASPARO, M. et al. Combination of Low-Dose Valsartan and Enalapril Improves Endothelial Dysfunction and Coronary Reserve in N^omega-Nitro-L-Arginine Methyl Ester–Treated Spontaneously Hypertensive Rats. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 40, n. 5, p. 789–800, 2002.

DINARDO, C. L. et al. Vascular smooth muscle cells exhibit a progressive loss of rigidity with serial culture passaging. **Biorheology**, v. 49, n. 5–6, p. 365–373, 2012.

DINARDO, C. L. et al. Variation of mechanical properties and quantitative proteomics of VSMC along the arterial tree. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 306, n. 4, p. H505–H516, 15 fev. 2014.

DONOGHUE, M. et al. A Novel Angiotensin-Converting Enzyme–Related Carboxypeptidase (ACE2) Converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9. **Circulation Research**, v. 87, n. 5, set. 2000.

DUQUE, M. A. A.; CASTRO, W. P. D. Análise anatomopatológica e histoquímica de Aneurismas Dissecante da aorta humana. **Brazilian Journal of Development**, v. 9, n. 3, p. 10481–10494, 14 mar. 2023.

DWEIK, R. A. et al. Nitric oxide synthesis in the lung. Regulation by oxygen through a kinetic mechanism. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 3, p. 660–666, 1 fev. 1998.

ELSAYED, N. et al. Renin-Angiotensin-Aldosterone System Inhibitors Are Associated With Favorable Outcomes Compared to Beta Blockers in Reducing Mortality Following Abdominal Aneurysm Repair. **Journal of the American Heart Association**, v. 12, n. 14, p. e029761, 18 jul. 2023.

FERGUSON, C. D. et al. Association of statin prescription with small abdominal aortic aneurysm progression. **American Heart Journal**, v. 159, n. 2, p. 307–313, 1 fev. 2010.

FERRARIO, C. M.; STRAWN, W. B. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease. **The American journal of cardiology**, v. 98, n. 1, p. 121–128, 2006.

FERREIRA, A. J. et al. Therapeutic Implications of the Vasoprotective Axis of the Renin-Angiotensin System in Cardiovascular Diseases. **Hypertension**, v. 55, n. 2, p. 207–213, 1 fev. 2010.

FERREIRA, A. J. et al. New Cardiovascular and Pulmonary Therapeutic Strategies Based on the Angiotensin-Converting Enzyme 2/Angiotensin-(1–7)/Mas Receptor Axis. **International Journal of Hypertension**, v. 2012, p. e147825, 26 jan. 2012.

FOUNTAIN, J. H.; KAUR, J.; LAPPIN, S. L. Physiology, Renin Angiotensin System. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.

FRAGA-SILVA, R. A.; FERREIRA, A. J.; DOS SANTOS, R. A. S. Opportunities for targeting the angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/mas receptor pathway in hypertension. **Current hypertension reports**, v. 15, n. 1, p. 31–38, 2013.

FYHRQUIST, F.; SAIJONMAA, O. Renin-angiotensin system revisited. **Journal of Internal Medicine**, v. 264, n. 3, p. 224–236, set. 2008.

GARBE, S. et al. Preservation of human artery function following prolonged cold storage with a new solution. **Journal of Vascular Surgery**, v. 53, n. 4, p. 1063–1070, abr. 2011.

GATTI, G. et al. Custodiol®-HTK Solution vs. Cold Blood Cardioplegia for Isolated Coronary Surgery Requiring Prolonged Cross-Clamp Time: A Propensity-Matched Analysis. **Arq Bras Cardiol**, v. 115, n. 2, p. 241–250, 2020.

GOLLEDGE, J. Abdominal aortic aneurysm: update on pathogenesis and medical treatments. **Nature Reviews Cardiology**, v. 16, n. 4, p. 225–242, abr. 2019.

GROENINK, M. et al. Losartan reduces aortic dilatation rate in adults with Marfan syndrome: a randomized controlled trial. **European heart journal**, v. 34, n. 45, p. 3491–3500, 2013.

HACKAM, D. G.; REDELMEIER, D. A. Translation of Research Evidence From Animals to Humans. **JAMA**, v. 296, n. 14, p. 1727–1732, 11 out. 2006.

IHARA, M. et al. Increased Chymase-Dependent Angiotensin II Formation in Human Atherosclerotic Aorta. **Hypertension**, v. 33, n. 6, p. 1399–1405, 1 jun. 1999.

INVESTIGATORS, I. T. et al. Endovascular strategy or open repair for ruptured abdominal aortic aneurysm: one-year outcomes from the IMPROVE randomized trial. **European heart journal**, v. 36, n. 31, p. 2061–2069, 2015.

JOHNSTON, K. W. et al. Suggested standards for reporting on arterial aneurysms. **Journal of vascular surgery**, v. 13, n. 3, p. 452–458, 1991.

KANAMOTO, R. et al. The role of Syk in inflammatory response of human abdominal aortic aneurysm tissue. **Annals of vascular diseases**, v. 13, n. 2, p. 151–157, 2020.

KASASHIMA, S. et al. Upregulated interleukins (IL-6, IL-10, and IL-13) in immunoglobulin G4-related aortic aneurysm patients. **Journal of Vascular Surgery**, v. 67, n. 4, p. 1248–1262, 1 abr. 2018.

KHOURY, M. K.; STRANZ, A. R.; LIU, B. Pathophysiology of aortic aneurysms: insights from animal studies. **Cardiology and cardiovascular medicine**, v. 4, n. 4, p. 498, 2020.

KUMAR, S. et al. Role of Noncoding RNAs in the Pathogenesis of Abdominal Aortic Aneurysm: Possible Therapeutic Targets? **Circulation Research**, v. 124, n. 4, p. 619–630, 15 fev. 2019.

- KUROSAWA, K.; MATSUMURA, J. S.; YAMANOUCHI, D. Current status of medical treatment for abdominal aortic aneurysm. **Circulation Journal**, v. 77, n. 12, p. 2860–2866, 2013.
- KWARTLER, C. et al. Vascular Smooth Muscle Cell Isolation and Culture from Mouse Aorta. **BIO-PROTOCOL**, v. 6, n. 23, 2016.
- LADICH, E. et al. Vascular diseases: aortitis, aortic aneurysms, and vascular calcification. **Cardiovascular Pathology**, v. 25, n. 5, p. 432–441, 1 set. 2016.
- LI, G. et al. Ulinastatin inhibits the formation and progression of experimental abdominal aortic aneurysms. **Journal of vascular research**, v. 57, n. 2, p. 58–64, 2020.
- LINDEMAN, J. H. N. et al. Enhanced expression and activation of pro-inflammatory transcription factors distinguish aneurysmal from atherosclerotic aorta: IL-6- and IL-8-dominated inflammatory responses prevail in the human aneurysm. **Clinical Science**, v. 114, n. 11, p. 687–697, 1 maio 2008.
- LIU, B. et al. Pathogenic mechanisms and the potential of drug therapies for aortic aneurysm. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 318, n. 3, p. H652–H670, 1 mar. 2020.
- LIU, Z. et al. Murine abdominal aortic aneurysm model by orthotopic allograft transplantation of elastase-treated abdominal aorta. **Journal of Vascular Surgery**, v. 62, n. 6, p. 1607- 1614.e2, dez. 2015.
- LUNDBERG, J. O. et al. Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 12, p. 865–869, dez. 2009.
- LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; GLADWIN, M. T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 7, n. 2, p. 156–167, fev. 2008.
- MARCHESI, C.; PARADIS, P.; SCHIFFRIN, E. L. Role of the renin–angiotensin system in vascular inflammation. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 29, n. 7, p. 367–374, 1 jul. 2008.
- MATOS, A. G.; GURGEL, V. P.; CALLOU, A. L. The influence of nitric oxide on the pathophysiology of glaucomatous neuropathy. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 78, n. 1, 2019.
- MEEKEL, J. P. et al. An in vitro method to keep human aortic tissue sections functionally and structurally intact. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 8094, 25 maio 2018.
- MOLL, F. L. et al. Management of abdominal aortic aneurysms clinical practice guidelines of the European society for vascular surgery. **European journal of vascular and endovascular surgery**, v. 41, p. S1–S58, 2011.
- OOSTERHOFF, L. A. et al. Characterization of Endothelial and Smooth Muscle Cells From Different Canine Vessels. **Frontiers in Physiology**, v. 10, p. 101, 12 fev. 2019.

- PATEL, H. J.; DEEB, G. M. Ascending and Arch Aorta: Pathology, Natural History, and Treatment. **Circulation**, v. 118, n. 2, p. 188–195, 8 jul. 2008.
- PAULA, C. A. et al. Purification and substrate specificity of an angiotensin converting elastase-2 from the rat mesenteric arterial bed perfusate. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1388, n. 1, p. 227–238, 1998.
- PEREIRA, H. J. et al. Carboxypeptidases A1 and A2 from the perfusate of rat mesenteric arterial bed differentially process angiotensin peptides. **Peptides**, v. 33, n. 1, p. 67–76, 2012.
- POULSEN, J. L.; STUBBE, J.; LINDHOLT, J. S. Animal models used to explore abdominal aortic aneurysms: a systematic review. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, v. 52, n. 4, p. 487–499, 2016.
- PRABHU, S. D.; FRANGOGIANNIS, N. G. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. **Circulation Research**, v. 119, n. 1, p. 91–112, 24 jun. 2016.
- PRATES-COSTA, T. C. et al. Impact of angiotensin-converting enzyme inhibition on hemodynamic and autonomic profile of elastase-2 knockout mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas**, v. 55, p. e11774, 2022.
- RADONIC, T. et al. Losartan therapy in adults with Marfan syndrome: study protocol of the multi-center randomized controlled COMPARE trial. **Trials**, v. 11, p. 3, 12 jan. 2010.
- RE, R. N.; COOK, J. L. The mitochondrial component of intracrine action. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 299, n. 3, p. H577–H583, set. 2010.
- RYER, E. J. et al. Proinflammatory role of stem cells in abdominal aortic aneurysms. **Journal of Vascular Surgery**, v. 62, n. 5, p. 1303- 1311.e4, 1 nov. 2015.
- SÁNCHEZ-INFANTES, D. et al. Oxidative stress and inflammatory markers in abdominal aortic aneurysm. **Antioxidants**, v. 10, n. 4, p. 602, 2021.
- SANTO, A. H.; PUECH-LEÃO, P.; KRUTMAN, M. Trends in abdominal aortic aneurysm-related mortality in Brazil, 2000-2016: a multiple-cause-of-death study. **Clinics**, v. 76, p. e2388, 2021.
- SANTOS, C. F. et al. Functional role, cellular source, and tissue distribution of rat elastase-2, an angiotensin II-forming enzyme. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 285, n. 2, p. H775–H783, 1 ago. 2003a.
- SANTOS, R. A. Angiotensin-(1–7). **Hypertension**, v. 63, n. 6, p. 1138–1147, jun. 2014.

- SANTOS, R. A. S. et al. Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 14, p. 8258–8263, 8 jul. 2003b.
- SEDDING, D. G. et al. Vasa vasorum angiogenesis: key player in the initiation and progression of atherosclerosis and potential target for the treatment of cardiovascular disease. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 706, 2018.
- SHERIFOVA, S.; HOLZAPFEL, G. A. Biomechanics of aortic wall failure with a focus on dissection and aneurysm: A review. **Acta Biomaterialia**, v. 99, p. 1–17, nov. 2019.
- SMECELLATO, F. B. et al. Comparative study between fructose 1-6 bisphosphate and histidine-tryptophan-ketoglutarate in liver preservation in rats submitted to total cold ischemia. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 35, n. 6, p. e202000603, 2020.
- SOUZA, J. R. M. et al. Níveis séricos de interleucina-6 (IL-6), interleucina-18 (IL-18) e proteína C reativa (PCR) na síndrome coronariana aguda sem supradesnivelamento do ST em pacientes com diabetes tipo 2. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 90, p. 94–99, 2008.
- SU, Z.; GUO, J.; GU, Y. Pharmacotherapy in Clinical Trials for Abdominal Aortic Aneurysms: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis: Official Journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, v. 28, p. 10760296221120423, 2022.
- SVENSJÖ, S.; BJÖRCK, M.; WANHAINEN, A. Update on screening for abdominal aortic aneurysm: a topical review. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, v. 48, n. 6, p. 659–667, 2014.
- SWEETING, M. J. et al. Use of angiotensin converting enzyme inhibitors is associated with increased growth rate of abdominal aortic aneurysms. **Journal of vascular surgery**, v. 52, n. 1, p. 1–4, 2010.
- SZILÁGYI, Á. L. et al. Compared efficacy of preservation solutions on the outcome of liver transplantation: Meta-analysis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 24, n. 16, p. 1812–1824, 28 abr. 2018.
- SZYMBORSKA, W.; PRZYBYCIEN, R. **Poemas**. 1^a edição ed. [s.l.] Companhia das Letras, 2011.
- TAKAI, S. et al. Purification and characterization of angiotensin II-generating chymase from hamster cheek pouch. **Life Sciences**, v. 58, n. 7, p. 591–597, 1996.
- THOMPSON, A. et al. An analysis of drug modulation of abdominal aortic aneurysm growth through 25 years of surveillance. **Journal of Vascular Surgery**, v. 52, n. 1, p. 55- 61.e2, 1 jul. 2010.
- THURNER, M. et al. Generation of myogenic progenitor cell-derived smooth muscle cells for sphincter regeneration. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 11, n. 1, p. 233, dez. 2020.

- TIPNIS, S. R. et al. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 43, p. 33238–33243, 27 out. 2000.
- URATA, H. et al. Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 36, p. 22348–22357, 25 dez. 1990.
- VANERIO, N. et al. Development of an ex vivo aneurysm model for vascular device testing. **ALTEX - Alternatives to animal experimentation**, v. 37, n. 1, p. 110–120, 20 jan. 2020.
- VIVACQUA, T. A. et al. Protocolo para captação, transporte e preservação de tecido osteocondral humano. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 55, n. 02, p. 163–169, abr. 2020.
- WALTZ, P. et al. Nitrate/Nitrite as Critical Mediators to Limit Oxidative Injury and Inflammation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 23, n. 4, p. 328–339, 1 ago. 2015.
- WRITING COMMITTEE MEMBERS et al. 2022 ACC/AHA guideline for the diagnosis and management of aortic disease: A report of the American Heart Association/American College of Cardiology Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 166, n. 5, p. e182–e331, nov. 2023.
- WU, S. V. et al. Marcadores de estresse oxidativo e dano muscular em pacientes com DPOC submetidos a um programa de reabilitação pulmonar. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 13, n. 5, p. e6940, 19 maio 2021.
- YUAN, Z. et al. Abdominal Aortic Aneurysm: Roles of Inflammatory Cells. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2021.
- ZHANG, Y. et al. Comparative Expression of Renin-Angiotensin Pathway Proteins in Visceral Versus Subcutaneous Fat. **Frontiers in Physiology**, v. 9, 2018.
- ZHONG, L. et al. SM22 α (Smooth Muscle 22 α) Prevents Aortic Aneurysm Formation by Inhibiting Smooth Muscle Cell Phenotypic Switching Through Suppressing Reactive Oxygen Species/NF- κ B (Nuclear Factor- κ B). **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 39, n. 1, jan. 2019.
- ZWIRNER, J. et al. Screening for Fatal Traumatic Brain Injuries in Cerebrospinal Fluid Using Blood-Validated CK and CK–MB Immunoassays. **Biomolecules**, v. 11, n. 7, p. 1061, jul. 2021.

APÊNDICE A

Termo de consentimento livre e esclarecido (Grupo estudo)

Título do estudo: “*Contribuição do Sistema Renina Angiotensina na Fisiopatologia em Aneurisma de Aorta Abdominal*”

Marcadores em investigação: Componentes do Sistema Renina Angiotensina, Citocinas e Metaloproteinases.

Nome do investigador principal: Christiane Becari

Instituição: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – HCFMRP-USP.

Natureza e objetivo do estudo: O aneurisma de aorta abdominal que corresponde ao enfraquecimento da parede da artéria aorta o que resulta na dilatação da mesma com risco de estourar e de entupimento das artérias dos membros inferiores devido à saída de coágulos de sangue que estão dentro no aneurisma. Ao participar desse trabalho você estará contribuindo para entender melhor a doença e para a verificação de possíveis tratamentos do aneurisma de aorta abdominal.

Participação voluntária: Sua participação neste estudo é totalmente voluntária; você não é obrigado a participar. Seu tratamento e relacionamento com seu médico não serão afetados pela sua decisão de participar ou não deste estudo. Caso aceite participar, a sua participação será encerrada após a cirurgia, porém se necessário, você poderá ser chamado para fornecer informações adicionais. Caso você se recuse a participar deste estudo, você não será penalizado de nenhuma forma e sua decisão não prejudicará qualquer cuidado médico ao qual você tem direito.

Não haverá remuneração e nem ressarcimento de despesas com transporte e/ou alimentação, uma vez que você virá nos retornos regulares e não por causa da pesquisa.

Procedimentos do estudo: Você deverá comparecer para internação 1 dia antes do procedimento para preparo adequado para realização da cirurgia, sendo aproveitada a oportunidade para coleta de sangue. No dia seguinte, durante a cirurgia será extraído um pequeno fragmento do aneurisma conforme já mencionado. A coleta de sangue trará dor leve e pode deixar um hematoma (marca roxa) no local da picada.

Riscos e benefícios: esse estudo não trará risco adicional a você além do risco próprio do procedimento cirúrgico. O estudo não trará benefício direto para você. No entanto, existe uma possibilidade de que as informações obtidas neste estudo possam ajudar no desenvolvimento futuro de um novo tratamento para pacientes que sofrem da mesma condição que a sua. Assim, a sociedade beneficiada com este estudo. Esse pequeno fragmento da aorta abdominal é um excedente de tecido rotineiramente retirado em cirurgias deste tipo portanto, o Sr. não será submetido a nenhum risco adicional por conta disso. O senhor terá direito a indenização neste estudo relacionado à uma eventual perda de confidencialidade.

Confidencialidade: A garantia de sigilo dos seus dados, o direito da confidencialidade dos dados e respeito a privacidade será assegurado de acordo com as leis vigentes no país. Os tubos coletados serão numerados, sendo de conhecimento exclusivo do pesquisador principal a que paciente corresponderá o número identificador (por exemplo: tubos 1 são amostras de sangue do paciente José Antônio). No entanto, existem riscos mínimos de quebra de privacidade e/ou confiabilidade.

Outras informações importantes:

O investigador principal deste estudo é a Dra. Christiane Becari que pode ser encontrada no seguinte endereço: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – HCFMRP-USP – Av. Bandeirantes, 3900 – 9º andar – Departamento de Cirurgia e Anatomia – Campus Universitário – Monte

Alegre – CEP: 14049-900 – Ribeirão Preto/SP e telefone (horário comercial) (16) 3602 2593 e celular: (16) 981298433

1. Eu li ou leram para mim o termo de consentimento livre e esclarecido para esse estudo. Recebi todas as explicações sobre a natureza, objetivo, duração, efeitos e riscos previsíveis do estudo, assim como sobre as minhas responsabilidades. As minhas perguntas foram respondidas satisfatoriamente.
2. Concordo em participar do estudo. Concordo em cooperar totalmente com o médico e entrar em contato com ele/ela quando necessário para esclarecimento de dúvidas ou dos próximos passos do estudo.
3. Entendo que minha participação no estudo é voluntária e que posso me recusar a participar ou posso sair do estudo a qualquer momento. Caso eu me recuse a participar deste estudo, não serei penalizado e minha decisão não prejudicará qualquer cuidado médico ao qual eu tenha direito.
4. Será feita uma revisão do seu prontuário médico para buscar dados quanto ao procedimento cirúrgico realizado e resultado de exames de seguimento após o tratamento.
5. Receberei uma via assinada deste consentimento.

Nome do paciente: _____
(preenchimento pelo paciente ou representante legal)

Nome do representante legal
(Se aplicável): _____

Assinatura do paciente: _____
(ou representante legal, se aplicável)

Data: _____

Nome da testemunha: _____

Assinatura da testemunha: _____

Data: _____

Investigador / subinvestigador ou pessoa que conduziu a discussão sobre o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: “Confirmo que expliquei pessoalmente a natureza, propósito, duração, efeitos e riscos previsíveis do estudo ao paciente acima mencionado”.

Nome: _____

Assinatura: _____

Data: _____

APÊNDICE B

Termo de consentimento livre e esclarecido (Grupo controle /doadores-cadáver)

Título do estudo: “Contribuição do Sistema Renina Angiotensina na Fisiopatologia em Aneurisma de Aorta Abdominal”

Marcadores em investigação: Componentes do Sistema Renina Angiotensina, Citocinas e Metaloproteinases.

Nome do investigador principal: Christiane Becari

Instituição: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – HCFMRP-USP.

Este é uma proposta de participação em uma pesquisa que tem por finalidade estudar aneurisma de aorta abdominal endereçado ao familiar ou responsável legal do paciente: **Sr.** _____ o qual apresentou morte cerebral e autorizou (ou seu representante legal) a sua doação de órgãos e tecidos. Solicitamos a autorização para a extração de um pequeno fragmento da parede da artéria aorta durante a cirurgia de captação de órgãos. Esta coleta de amostra será realizada após o explante de todos os órgãos e tecidos destinados a transplante. Este documento descreve o estudo para o qual você está sendo convidado a participar e o que o estudo envolverá. Leia este documento com cuidado e não hesite em fazer qualquer pergunta.

Natureza e objetivo do estudo: você está sendo convidado a participar deste estudo de pesquisa clínica porque seu familiar apresentou morte cerebral e não é portador de aneurisma de aorta abdominal. O tecido coletado, portanto, será destinado ao grupo controle do estudo sobre aneurisma de aorta abdominal que corresponde ao enfraquecimento da parede da artéria aorta o que resulta na dilatação da mesma com risco de romper e de entupimento das artérias dos membros inferiores devido à saída de coágulos de sangue que estão dentro no aneurisma. Ao participar desse trabalho você estará contribuindo para entender melhor a doença e para a verificação de possíveis tratamentos do aneurisma de aorta abdominal.

Participação voluntária: Sua participação neste estudo é totalmente voluntária; você não é obrigado a participar. Caso aceite participar, a duração do estudo se encerrará logo após a cirurgia, porém você poderá ser chamado para fornecer informações adicionais do doador que por ventura forem necessárias.

Não haverá remuneração e nem ressarcimento de despesas com transporte e/ou alimentação.

Risco e benefícios: É possível que a sociedade possa se beneficiar deste estudo. Existe uma possibilidade de que as informações obtidas neste estudo possam ajudar no desenvolvimento futuro de um novo tratamento para aneurisma de aorta abdominal.

Confidencialidade: a garantia de sigilo dos dados, o direito da confidencialidade dos dados e respeito a privacidade será assegurado de acordo com as normas brasileiras. No entanto, existem riscos mínimos de quebra de privacidade e/ou confiabilidade.

Outras informações importantes:

O investigador principal deste estudo médico é o Dr. Christiane Becari que pode ser encontrada no seguinte endereço: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – HCFMRP-USP – Av. Bandeirantes, 3900 – 9º andar – Departamento de Cirurgia e Anatomia – Campus Universitário – Monte Alegre – CEP: 14049-900 – Ribeirão Preto/SP e telefone (horário comercial) 16 3602 2593 e celular: 16 981298433

1. Eu li ou leram para mim o termo de consentimento livre e esclarecido para esse estudo. Recebi todas as explicações sobre a natureza, objetivo, duração, efeitos e

riscos previsíveis do estudo, assim como sobre as minhas responsabilidades. As minhas perguntas foram respondidas satisfatoriamente.

2. Concordo em participar do estudo e autorizo a coleta da amostra de aorta do Sr _____. Concordo em cooperar totalmente com o médico e entrar em contato com ele/ela quando necessário para esclarecimento de dúvidas ou dos próximos passos do estudo.

3. Entendo que a participação no estudo é voluntária e que posso me recusar a participar a qualquer momento. Caso eu me recuse a participar deste estudo, não serei penalizado de nenhuma forma e minha decisão.

4. Receberei uma via assinada deste consentimento.

Nome do paciente/doador:

Assinatura do familiar ou representante legal:

Grau de parentesco:

Data: _____

Nome da testemunha:

Assinatura da testemunha:

Data: _____

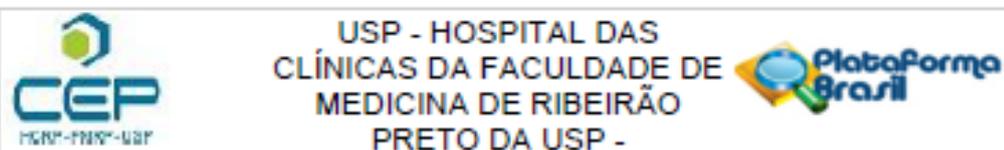
Investigador ou pessoa que conduziu a discussão sobre o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:

“Confirmo que expliquei pessoalmente a natureza, propósito, duração, efeitos e riscos previsíveis do estudo ao paciente acima mencionado”

Nome: _____

Assinatura: _____

Data: _____

ANEXO I**Parecer Consubstanciado do CEP****PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DA EMENDA**

Título da Pesquisa: Contribuição do Sistema Renina Angiotensina na Fisiopatologia do Aneurisma de Aorta Abdominal.

Pesquisador: CHRISTIANE BECARI

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 82879518.6.0000.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.277.610

Apresentação do Projeto:

Aneurisma da aorta é uma doença progressiva caracterizada pela deterioração estrutural, expansão gradual e eventual ruptura do vaso. O tipo mais comum de aneurisma da aorta é o que acomete seu segmento abdominal. A incidência e mortalidade do aneurisma de aorta abdominal (AAA) são altas e estima-se que, atualmente, 1,5 milhões de pessoas nos Estados Unidos sejam portadores de AAA. O tratamento existente para AAA é a abordagem cirúrgica aberta convencional ou correção endovascular. Até o momento nenhum tratamento farmacológico eficaz para o tratamento de AAA foi identificado, o qual possa, portanto, inibir seu crescimento, progressão ou o risco de ruptura em seres humanos

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a contribuição dos componentes do SRA na fisiopatologia de aneurisma de aorta abdominal em humanos.

 Avaliação dos Riscos e Benefícios:

não se aplica

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de encaminhamento de emenda para a Inserção dos membros Fabíola Mestriner, Carlos Corsi, Jessyca Michelon Barbosa, Carolina D'Ávila Mesquita, Ariei Emiliano Souza do Couto, Ligia

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
 UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO
PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 4.277.010

Cristina Borges Campo como parte da equipe do projeto de pesquisa "Contribuição do Sistema Renina Angiotensina na Fisiopatologia do Aneurisma de Aorta Abdominal". Outro ponto importante refere-se ao tempo de inclusão de pacientes e ao número amostral. Como ainda não incluímos o número total de pacientes, solicito a extensão do período do estudo até 31 de Dezembro de 2023. Além disso, será necessário a inclusão de um número amostral maior que inicialmente propusemos, especialmente para o grupo controle.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

documentos devidamente apresentados

Recomendações:

não se aplica

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O CEP tomou ciência e aprovou a emenda, assim como o projeto de pesquisa Versão 3 _ 27-05-2020

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_156644_1_É1.pdf	10/09/2020 10:44:21		Acelto
Orçamento	ORÇAMENTO_JP_Plataforma_Brasil_27_05_20.pdf	10/09/2020 10:43:17	CHRISTIANE BECARI	Acelto
Outros	RelatorioParcial1_CEP_ProjetoSRA_AA_A_27_05_2020.pdf	10/09/2020 10:39:28	CHRISTIANE BECARI	Acelto
Outros	CartaemendaCEP_ProjetoSRA_AAA_27_05_2020.pdf	10/09/2020 10:39:03	CHRISTIANE BECARI	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto de Pesquisa JP_PlataformaBrasil_ChristianeBecari_27_05_2018v3.pdf	10/09/2020 10:38:38	CHRISTIANE BECARI	Acelto
Cronograma	CRONOGRAMA de ATIVIDADES_PlataformaBrasil_JP_27_05_20.pdf	10/09/2020 10:38:22	CHRISTIANE BECARI	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_update_JP_27_02_2018_marked.pdf	21/03/2018 15:22:52	CHRISTIANE BECARI	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLE_update_JP_27_02_2018_clean.pdf	21/03/2018 15:22:20	CHRISTIANE BECARI	Acelto

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (18)3833-2228 Fax: (18)3833-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO
PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 4.277.010

Ausência	TCLE_update_JP_27_02_2018_clean.pdf	21/03/2018 15:22:20	CHRISTIANE BECARI	Aceito
Folha de Rosto	folhad rosteroJP_Becari_update.pdf	21/03/2018 14:47:55	CHRISTIANE BECARI	Aceito
Orçamento	UPC_Orçamento_aprovadoJP.pdf	05/02/2018 13:11:20	CHRISTIANE BECARI	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 15 de Setembro de 2020

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador(a))

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
Telefone: (18)3802-2228 Fax: (18)3833-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br