

Universidade Federal do Rio Grande Do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina Ciências Cirúrgicas

**CD68 e CD34 em aneurismas cerebrais de pacientes
tabagistas e não tabagistas: uma análise imuno-
histoquímica**

Cassiano Ughini Crusius

Porto Alegre, 2020

Universidade Federal do Rio Grande Do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina Ciências Cirúrgicas

**CD68 e CD34 em aneurismas cerebrais de pacientes
tabagistas e não tabagistas: uma análise imuno-
histoquímica**

Cassiano Ughini Crusius

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Stefani

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre, 2020

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	9
3. JUSTIFICATIVA	19
4. HIPÓTESES	20
5. OBJETIVOS	21
5.1. Objetivo Geral	21
5.2. Objetivo Específico.....	21
6. MÉTODOS	22
7. RESULTADOS	24
8. DISCUSSÃO	28
9. CONCLUSÃO.....	29
REFERÊNCIAS	30
ARTIGO EM INGLÊS.....	33
ARTIGO EM PORTUGUÊS	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aneurisma saciforme íntegro apresentando áreas de fibrose.....	25
Figura 2. Marcação de CD34 e CD68 na parede aneurismal pela técnica de imunohistoquímica.....	26
Figura 3. Diâmetro dos aneurismas versus expressão de CD68.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Localização anatômica das lesões entre aneurismas rotos e não rotos (n= 26).	24
Tabela 2. Associação entre marcadores inflamatórios, ruptura e tabagismo (n= 26).	26
Tabela 3. Associação entre marcadores inflamatórios e aneurismas rotos e não rotos (n= 26).	26

RESUMO

Introdução: A inflamação da parede do aneurisma sacular cerebral pode ser a chave para a obtenção de novas tecnologias que previnam sua ruptura. **Objetivos:** avaliar a angiogênese e o processo inflamatório por meio dos marcadores de superfície celular, CD34 e CD68, considerando indicar qual tipo de parede do aneurisma tem a propensão de romper. **Métodos:** A imunomarcção celular para angiogênese e infiltração de células inflamatórias foi analisada em 12 fundos de aneurisma não rotos e 14 aneurismas rotos ressecados após clipagem microcirúrgica do aneurisma. **Resultados:** Não se observou associação estatisticamente significativa entre presença de células CD68 ou CD34 positivas e tabagismo ou ruptura do aneurisma. No entanto, na população em estudo, a proporção de amostras com células CD68 positivas 1) nas camadas íntima ou média ou 2) na camada média foi maior em tabagistas em comparação a não tabagistas, 14 (82.4%) vs 6 (66.7%), $p=0.628$ e 12 (70.6%) vs 4 (44.4%), $p=0.234$, respectivamente. Em aneurismas rotos em comparação a não rotos, 12 (85.7%) vs 8 (66.7%), $p=0.365$ e 9 (64.3%) vs 7 (58.3%), $p=1.000$, respectivamente. A proporção de células CD34 positivas em tabagistas e não tabagistas e em aneurismas rotos e não rotos foi 2 (11.8%) vs 1 (11.1%), $p=1.000$ e 2 (14.3%) vs 4 (8.3%), $p=1.000$, respectivamente. **Conclusão:** A incapacidade de demonstrar associação estatisticamente significativa entre expressão de CD68, CD34, tabagismo e ruptura aneurismática deve-se, provavelmente, ao baixo poder conferido pelo tamanho amostral sendo necessários, portanto, estudos mais robustos para testar essas associações.

Palavras-chave: aneurisma intracraniano, inflamação, tabagismo, vasos sanguíneos, antígeno CD-34, antígeno CD-68.

ABSTRACT

Background: Inflammatory saccular cerebral artery aneurysm wall may be the clue to achieve new technologies to prevent rupture. **Objectives:** to evaluate angiogenesis and inflammatory process by means of cell surface markers CD34 and CD68, considering indicating which type of aneurysm wall has the propensity to rupture. **Methods:** Immunostaining for cell markers for angiogenesis and inflammatory cell infiltration were analyzed in 12 unruptured and 14 ruptured aneurysm fundi resected after microsurgical clipping of the aneurysm neck. **Results:** There was no statistically significant association between CD68 or CD34 positive cells and smoking or rupture of the aneurysm. However, in the study population, the proportion CD68 positive cells 1) in the intima or medium layers or 2) in the middle layer was higher in smokers compared to non-smokers, 14 (82.4%) vs 6 (66.7%) ($p=0.628$), $p=0.628$ and 12 (70.6%) vs 4 (44.4%), $p=0.234$, respectively. In ruptured aneurysm compared to unruptured, 12 (85.7%) vs 8 (66.7%), $p = 0.365$ and 9 (64.3%) vs 7 (58.3%), $p=1.000$, respectively. The proportion of CD34 positive cells in smokers and nonsmokers in ruptured and unruptured aneurysms was 2 (11.8%) vs 1 (11.1%), $p=1.000$ and 2 (14.3%) vs 4 (8.3%), $p=1.000$, respectively. **Conclusion:** The inability to demonstrate a statistically significant association between expression of CD68, CD34, smoking and aneurysmal rupture is probably due to the power of the sample size and, therefore, more studies are needed to test these associations.

Keywords: intracranial aneurysm, inflammation, cigarette smoking, blood vessel, antigen CD-34, antigen CD-68.

1. INTRODUÇÃO

Aneurisma cerebral é uma dilatação patológica da parede arterial intracraniana muitas vezes assintomática, porém com potencial de causar hemorragia subaracnóidea, que é responsável por severas complicações e elevadas taxas de morbimortalidade. Está bem estabelecido na literatura o tratamento dos aneurismas cerebrais rotos através de métodos cirúrgicos ou endovasculares a fim de prevenir ruptura aneurismática ou até mesmo ressangramento pelo mesmo aneurisma. Existe outra parcela dos aneurismas classificados como não rotos, os quais aumentaram a prevalência devido aos recentes avanços de neuroimagem que ocasionaram maior chance de diagnóstico destas lesões. Salienta-se o fato de que uma parcela dos aneurismas cerebrais jamais irá romper e ocasionar hemorragia subaracnóidea. Por isso uma parcela de pessoas portadoras de aneurisma cerebral não roto poderá seguir tratamento expectante sem apresentar risco de hemorragia subaracnóidea devido ao fato que a parede aneurismática pode permanecer íntegra durante toda a vida do paciente evitando o risco inerente ao tratamento cirúrgico/endovascular.

Atualmente a decisão terapêutica sobre quais aneurismas não rotos devam ser tratados envolve fatores de risco como idade, história familiar, tabagismo, sexo feminino, morfologia do saco aneurismal (THOMPSON et al., 2015). Há evidências de que a inflamação da parede aneurismal se relacione ao fato do crescimento e da ruptura aneurismática, assim destaca-se que a identificação de possíveis fatores inflamatórios localizados na parede aneurismal poderiam informar quais aneurismas cerebrais estariam mais propensos à ruptura. Dessa maneira, identificariam parâmetros objetivos para basear a decisão clínica de optar pelo

tratamento, além de possibilitar o desenvolvimento de fármacos com o potencial de inibir a atividade inflamatória nesses locais.

Para a identificação de quais proteínas estariam implicadas no processo que culmine com a ruptura aneurismática inferiu-se que há diferenças entre as paredes aneurismáticas dos aneurismas rotos e não rotos. Por isso realizou-se análise histológica das paredes aneurismáticas de aneurismas rotos e não rotos extraídos durante o ato cirúrgico dessas lesões através da avaliação histológica com imunohistoquímica das amostras.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os aneurismas intracranianos são dilatações anormais nas paredes arteriais cerebrais que podem ocasionar hemorragia intracraniana devido a sua ruptura. Esse tipo de patologia arterial geralmente é assintomática, porém com possibilidade de ocasionar hemorragia subaracnóidea (HSA) no momento da ruptura da parede aneurismática. As dilatações aneurismáticas podem ser classificadas de acordo com a etiologia, formato e tamanho. A clássica descrição de tipos aneurismáticos se dá em sacular, fusiforme, infeccioso, traumático, blister (ZHOU; DION; ROULEAU, 2018) e misto (CRUSIUS; DE AGUIAR; CRUSIUS, 2017). As características histopatológicas do aneurisma sacular são desaparecimento da lâmina elástica interna, afinamento da túnica média com conseqüente remodelamento e degradação das proteínas da matriz extracelular da parede arterial (PENN et al., 2014). Por ser o aneurisma do tipo sacular o mais prevalente e o mais comumente tratado com clipagem direta direcionaremos a pesquisa especificamente a este tipo de aneurisma.

A HSA aneurismática provém da ruptura da parede aneurismática provocando extravasamento sanguíneo arterial para o espaço subaracnóideo com níveis pressóricos idênticos aos níveis da pressão arterial. Infere-se que para interrupção do sangramento é necessário que a pressão intracraniana equipare-se à pressão arterial sistêmica com formação de trombo no ponto da ruptura (LAWTON; VATES, 2017), salientando-se que o dano cerebral poderá ocorrer em conseqüência a esse processo.

A prevalência de dilatações aneurismáticas cerebrais na população em geral é de 3.2% (THOMPSON et al., 2015). Não há dados disponíveis de incidência

devido ao fato de necessitar estudos de longo acompanhamento em grupos de risco. Direcionando-se aos dados relacionados a HSA, verifica-se que a incidência é de 9.6 casos por 100.000 pessoas (CONNOLLY JR. et al., 2012), evidenciando-se assim a grande diferença de prevalência de aneurismas cerebrais e incidência de HSA, o que explicita a grande quantidade de aneurismas que jamais ocasionarão eventos hemorrágicos. Soma-se, ainda, o fato de a melhora tecnológica na obtenção de imagens arteriais cerebrais e a facilidade de acesso aos exames radiológicos aumentando a prevalência de aneurismas não rotos que serão fortuitamente diagnosticados.

Diante de aneurismas não rotos impõem-se a decisão entre tratamento a fim de evitar a HSA ou acompanhamento sob risco de ruptura e suas possíveis catastróficas consequências. Há disponível para a correção das dilatações aneurismáticas a microcirurgia e a terapia endovascular, ambas em constante evolução e melhora nos resultados do tratamento. Apesar do marcado desenvolvimento técnico das modalidades envolvidas na correção dos aneurismas cerebrais, nenhuma delas demonstra-se capaz de eliminar os riscos durante a realização do procedimento. Haverá então uma parcela de pacientes em que o tratamento será indicado sem que a patologia arterial cause sintoma em todo o período da história natural da doença (MENG et al., 2014). Ainda, salienta-se que, dentro do mesmo grupo de pacientes que serão tratados desnecessariamente, existirá uma parcela deles que experimentarão complicações relacionadas ao tratamento do aneurisma cerebral.

Atualmente a decisão de tratamento dos aneurismas não rotos baseia-se em fatores de risco para desenvolvimento de HSA que inferem a probabilidade de ruptura tais como idade, história familiar, tabagismo, sexo feminino, morfologia do

saco aneurismal (THOMPSON et al., 2015). Dentre os fatores de risco, destaca-se o tabagismo que demonstrou aumentar o risco relativo de hemorragia subaracnóidea em 1.9 a 5.2 vezes. Ressaltando que a nicotina é o principal produto biologicamente ativo da degradação do tabaco, que por sua vez interage com receptores das células endoteliais promovendo a inflamação e angiogênese focais (KAMIO et al., 2018).

Para o estudo de alterações histológicas na parede aneurismática idealmente deve-se acompanhar o processo durante a formação, crescimento e ruptura para registrar as diversas fases desse processo contínuo. Nessa perspectiva, iniciou-se a procura de modelos experimentais para tentar suprir as lacunas de conhecimento quanto à formação, crescimento e ruptura de aneurismas cerebrais. O desenvolvimento de modelos de indução experimental de doença aneurismática tornou-se uma alternativa no estudo de fatores etiológicos (DE OLIVEIRA et al., 2011). Através de tais modelos, pode-se inferir acerca das condições necessárias para a formação de lesões aneurismáticas. Além disso, permite a formulação de técnicas de tratamento, com ênfase na prevenção das consequências oriundas da hemorragia subaracnóidea por ruptura aneurismática.

As técnicas de indução de formação aneurismática idealmente deveriam atender as necessidades de simularem as características encontradas nos aneurismas intracranianos em humanos tais como tamanho do aneurisma, relação colo\domo, atributos biológicos próprios do humano além da variabilidade desses itens (SHORT et al., 2001).

Atualmente há técnicas variadas de formação de aneurismas experimentais, porém todas elas apresentam limitações (DE OLIVEIRA et al., 2011). Aneurismas criados através do enxerto de segmento venoso em arteriotomia cirurgicamente preparada para tal acontecimento impede adequada avaliação histológica, já que

esse modelo implica adaptação do tecido da parede venosa ao fluxo arterial. Ainda existem os modelos induzidos pela elastase, os quais são formados através da injeção da substância na parede arterial para produzir destruição da camada muscular e surgimento de aneurisma sacular (SHORT et al., 2001).

Apesar de as técnicas experimentais para a formação aneurismáticas se mostrarem como uma boa alternativa, reproduzem apenas parcialmente as condições do humano. São técnicas que servem para estudo de alterações de fluxo e pressão, entretanto não para alterações histológicas da parede aneurismal já que tanto o enxerto venoso quanto a injeção de elastase na parede arterial desconsideram o processo inflamatório e a degradação da Matriz Extracelular (MEC) desde o desenvolvimento até a ruptura aneurismática (ZHU et al., 2014).

A formação da dilatação sacular aneurismática deve ser vista como um sistema contínuo e dinâmico de violação do equilíbrio entre as forças hidrostáticas impostas à parede arterial e o processo de degradação histológica ocasionado no local do defeito da parede arterial. A localização preferencial dos aneurismas saculares nas bifurcações arteriais depreendeu a possibilidade de que altos índices de pressão arterial implicariam na formação do aneurisma. O fato de as dilatações aneurismáticas não possuírem lâmina elástica interna (MENG et al., 2014), camada principal que determina a força estrutural arterial, torna esses locais mais susceptíveis às modificações da pressão. Entretanto, se sabe atualmente que a pressão hidrostática isolada não é capaz de ocasionar a formação de aneurismas, mas é de fundamental importância pois desencadeia através do processo de mecanotransdução do endotélio (MENG et al., 2014) a cascata de sinais bioquímicos que influenciam e modulam a atividade das células endoteliais e da matriz extracelular (JOHNSON; MATHER; WALLACE, 2011). Além da

mecanotransdução do endotélio, isto é, transcrição do estímulo hidrostático em sinais bioquímicos inflamatórios, também se faz presente a lesão endotelial, a qual expõe as estruturas subendoteliais, que por sua vez desencadeiam a liberação de fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF). Esse fator de crescimento provoca a diminuição ou até mesmo a perda da função das células sintetizadoras de MEC, especialmente a Célula de Músculo Liso (SMC), ocorrendo enfraquecimento estrutural da MEC e conseqüentemente da parede arterial (PENN et al., 2014). Ainda, a lesão endotelial provoca alteração nas junções tipo “*tight*” entre as células endoteliais recrutando macrófagos para o local da lesão, os quais também potencializam o processo inflamatório (TULAMO et al., 2018).

A MEC é uma estrutura acelular com metabolismo próprio e crucial para homeostase do tecido arterial e sua angioarquitetura. A MEC fornece o alicerce estrutural bem como ambiente para a sinalização bioquímica necessária à renovação e manutenção da parede arterial (QORRI et al., 2018). O conjunto de células inflamatórias e sinalizadores bioquímicos provocam intensa atividade metabólica na parede do aneurisma, através do processo de remodelamento da matriz extracelular. Concomitantemente, há mecanismos distintos e contraditórios de crescimento e degradação, como por exemplo: proliferação e morte celular, síntese e degeneração das proteínas da MEC (MENG et al., 2014). O intrincado balanço entre os processos de crescimento e degradação, ou seja, o remodelamento, é mediado por enzimas degradadoras de proteínas da MEC, dentre as quais destacam-se as metaloproteinases (MMP).

Ausência da lâmina elástica externa nas artérias intracranianas (JIN et al., 2007) e inconsistência da lâmina elástica interna dessas artérias faz com que a principal responsável pela resistência contra as forças hidrostáticas sejam as

proteínas presentes na matriz extracelular, enfatizando-se o colágeno e a elastina. Dentre os variados tipos de colágeno existentes cita-se os tipos mais encontrados na parede arterial colágeno tipo fibrilar (I, III e V), tipo microfibrilar (VI) e o colágeno presente na membrana basal (tipo IV). Há teoria de que os tipos de colágeno presentes na parede bem como sua proporção são os influenciadores na estabilidade mecânica da parede arterial (MIMATA et al., 1997). Por outro lado, diz-se que a disposição em camadas fibrilares dos diversos tipos de colágeno influencia na conservação da resistência da parede arterial (CANHAM; FINLAY; TONG, 1996). Em vista disso, os autores Mimata et al. (1997) sugerem que o colágeno “possui relevância na formação e prevenção contra o crescimento e ruptura dos aneurismas cerebrais”.

A degradação das proteínas estruturais da parede arterial envolve o processo de desenvolvimento e ruptura das dilatações aneurismáticas. A corrosão da elastina provoca a dilatação arterial enquanto que o desgaste do colágeno parece direcionar ao rompimento da lesão aneurismática (ARNING et al., 2016). Portanto, enzimas proteolíticas com atividade contra o colágeno e elastina desempenham papel fundamental na etiologia dos aneurismas cerebrais. As metaloproteinases são uma família de enzimas estruturalmente relacionadas ao zinco com atividade proteolítica intrínseca no remodelamento vascular, migração celular e adesão de moléculas (RAFFETTO; KHALIL, 2008). As metaloproteinases são secretadas, primariamente, como zimogênios e ativadas no espaço extracelular por outras proteases (QORRI et al., 2018) através da clivagem do zimogênio transformando-a em proteinase ativa (PENN et al., 2014). O processo fisiológico normal de remodelamento acontece com a secreção e ativação das metaloproteinases em graus habituais de concentração tecidual, porém aumento dos níveis de metaloproteinases estão associados a

diversos tipos de patologias (ARNING et al., 2016). De especial interesse nos aneurismas cerebrais, as gelatinases são representadas pelas metaloproteinases 2 e 9 ambas presentes nos tecidos vasculares, servindo como marcadores da atividade de degradação do colágeno no processo de remodelamento vascular normal (RAFFETTO; KHALIL, 2008).

As transformações constantes e duradouras da parede arterial que acontecem em resposta à estímulos patológicos conjuntamente são chamados de remodelamento vascular. Esse remodelamento pode ocorrer através de: apoptose, que é a morte celular geneticamente programada (INTENGAN; SCHIFFRIN, 2001), inflamação e fibrose vascular. Ainda, o remodelamento acarreta alterações estruturais na parede arterial ressaltando-se a inflamação da túnica média, primordial no entendimento do processo de formação e crescimento da lesão aneurismática (AOKI et al., 2007). Se evidencia, após desencadeada a cascata de eventos para o desenvolvimento de dilatação na parede arterial, um mecanismo de sinalização para recrutamento de células inflamatórias bem como ativação local do sistema do complemento (TULAMO et al., 2018).

Concebe-se, a possibilidade de aferir o grau de comprometimento das paredes aneurismáticas através do reconhecimento da dimensão inflamatória mediante a aferição da quantidade de macrófagos teciduais na amostra. Ressalta-se que os macrófagos são células responsáveis pela liberação de mediadores bioquímicos imperativos para o início da inflamação bem como para a manutenção da mesma (HOLNESS; SIMMONS, 1993). Desse modo, a quantidade de macrófagos teciduais presentes na amostra reflete a condição inflamatória tecidual (FENNELL et al., 2016). Através da expressão de proteínas na membrana celular é possível distinguir os diferentes tipos celulares. As proteínas de membrana são

chamadas de marcadores já que identificam e distinguem variados tipos celulares. Com a finalidade de definir as moléculas presentes na superfície celular, e desse modo demarcar a linhagem e tipo celular, utiliza-se a técnica de agrupamento de diferenciação ou CD, do inglês “*cluster of differentiation*” (SATTLER; KENNEDY-LYDON, 2017).

Com relação ao marcadores moleculares há o CD68, uma glicoproteína transmembrana expressa no compartimento endossomal dos macrófagos e tradicionalmente destacada como um valoroso marcador imuno-histoquímico em tecidos inflamados (CHISTIAKOV et al., 2017). Assim, a expressão do CD68 infere a infiltração de macrófagos no tecido servindo como marcador inflamatório na parede aneurismal (FROSEN et al., 2004).

Soma-se aos previamente descritos mecanismos envolvidos na formação e ruptura dos aneurismas cerebrais o processo de angiogênese. A vasculogênese é a diferenciação de células tronco pluripotentes para a formação de vasos sanguíneos durante o período embrionário. Em contrapartida a angiogênese é o surgimento de capilares provenientes de vasculatura já existente podendo ocorrer desde o período embrionário até a vida adulta (RAKOCEVIC et al., 2017). De acordo com Kamio et al. (2018) “estudos tanto em humanos como em animais sugerem que inflamação e angiogênese são processos primordiais no crescimento e ruptura dos aneurismas intracranianos”. Os autores Frosen et al. (2004) propuseram classificação histológica em quatro níveis (A, B, C e D) de degeneração da parede arterial aneurismática ensejando correlação com a ruptura dessa parede. Marcadamente os dois graus de classificação mais correlatos ao rompimento demonstraram trombose intraluminal com hiperplasia neointimal, ambos dependentes de angiogênese para transcorrer.

O antígeno de superfície CD34, usualmente utilizado para identificar células endoteliais, também faz o reconhecimento da densidade de microvasos (MVD), frequentemente aplicada na graduação de angiogênese tecidual. Segundo Lucarini et al. (2018), a avaliação da densidade microvascular é rotineiramente empregada para estimativa da angiogênese tecidual e, aquiescente com o processo inflamatório instaurado no local tecidual em voga. O CD34 é uma proteína transmembrana com domínio extracelular maior que o domínio intracelular implicada na adesão, proliferação e diferenciação celular (RAKOCEVIC et al., 2017). Inicialmente descrito como marcador para identificação de células tronco hematopoiéticas, o CD34 atualmente marca células endoteliais vasculares. Além disso, o CD34 está ausente nas células endoteliais linfáticas, assim servindo como diferenciação entre os dois tipos de vasos (RAKOCEVIC et al., 2017). O CD34 é composto por uma hélice transmembrana e pela porção intracelular. Componente da família das sialomucinas, o CD34 pode ser estruturalmente reconhecido em três tipos de acordo com a proteína mais comumente expressa no domínio extracelular: serina, treonina e prolina (NIELSEN; MCNAGNY, 2008).

No contexto de hemorragia subaracnóidea alguns dados relevantes inferem grande relação do tabagismo com o crescimento e ruptura aneurismática. Juvela et al. (2018), em estudo prospectivo de longo seguimento, concluíram que há fatores de risco diferentes para crescimento e ruptura aneurismática, porém o único fator de risco capaz de associar crescimento e ruptura nos aneurismas cerebrais é o tabagismo. Além disso, sabe-se que em torno de 80% dos pacientes com hemorragia subaracnóidea já apresentaram história de tabagismo durante algum período de vida e 60% são tabagistas ativos (CHALOUHI et al., 2012). Apesar da forte associação, não é esclarecido qual o mecanismo fisiopatológico para tal

relação. As interferências causadas pelo tabagismo podem envolver diferentes aspectos. Sabe-se que a pressão hidrostática nas paredes arteriais é diretamente proporcional à velocidade de fluxo e viscosidade sanguínea, as quais são sabidamente elevados nos pacientes tabagistas (CHALOUHI et al., 2012).

Posto isso, o conhecimento acerca da histopatologia do aneurisma cerebral nos mostra que os fatores desencadeantes da inflamação podem ser de origem multifatorial. Posteriormente ao início do processo inflamatório variados tipos de fatores de crescimento, enzimas, proteínas proteolíticas propiciam o aparecimento das características histológicas clássicas dos aneurismas cerebrais através da atividade de degradação da matriz extracelular. Esse processo se instaura desde o momento da alteração inicial na parede arterial até culminar com ruptura da parede aneurismática e resultante hemorragia subaracnoidea.

A presente pesquisa poderá inferir através da estratificação dos níveis de CD34 e CD68 presentes nas paredes aneurismáticas quais aneurismas teriam as maiores probabilidades de ruptura. Elucidar quais aneurismas necessitariam intervenção para realizar tratamento e assim suplantariam os riscos do procedimento cirúrgico em comparação aos riscos de ruptura aneurismática, ou até mesmo mudanças no estilo de vida ou terapias farmacológicas.

3. JUSTIFICATIVA

O conhecimento acerca dos mecanismos presentes durante o processo de início da formação até o momento da ruptura dos aneurismas cerebrais ainda é limitado. Reconhecer os macrófagos teciduais estimando o nível de inflamação da parede aneurismática pode contribuir no entendimento de fatores etiológicos e, assim, permitir a formulação de estratégias terapêuticas de prevenção e tratamento dessa grave condição.

4. HIPÓTESES

As proteínas de membrana que sinalizam a presença de macrófagos teciduais pela expressão do CD68, bem como a angiogênese através do CD34 podem indicar maior atividade inflamatória e de remodelamento vascular na parede aneurismal. Nos casos de maior expressão desses dois marcadores haverá possibilidade maior de ruptura da parede aneurismática.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo Geral

Avaliar a presença de células inflamatórias e angiogênese nas amostras teciduais e quais possíveis relações de formação, crescimento e ruptura de aneurismas cerebrais.

5.2. Objetivo Específico

Comparar os níveis de CD68 e CD34 nas paredes aneurismáticas retiradas durante a realização de microcirurgia para clipagem dessas lesões.

6. MÉTODOS

Foram selecionados pacientes encaminhados para microcirurgia de clipagem de lesão aneurismática, rotos e não rotos de pacientes arrolados sucessivamente no Hospital São Vicente de Paulo em Passo Fundo no Rio Grande do Sul, no período de novembro de 2016 até novembro de 2018. Como parte da rotina cirúrgica, o saco aneurismático foi perfurado a fim de verificar a completa exclusão aneurismática da circulação cerebral normal após a aplicação do clipe metálico no saco aneurismal. O fundo aneurismático, quando tecnicamente possível, foi retirado para análise histológica da parede aneurismal (BRUNO et al., 1998). Ressalta-se, dessa maneira, que não ocorreu prejuízo aos pacientes incluídos na pesquisa visto que trata-se de técnica usual durante o procedimento cirúrgico para correção desse tipo de lesões vasculares.

Os espécimes cirúrgicos foram fixados em formalina tamponada a 10% e incluídos em blocos de parafina. De cada amostra, foram preparados cortes histológicos com três micrômetros de espessura, sendo uma lâmina corada pela técnica de hematoxilina-eosina e duas lâminas coradas pela técnica de imunohistoquímica para os anticorpos anti-CD68 e anti-CD34 através do sistema automatizado Ventana Systems, conforme instruções do fabricante (108007-002, Dako North America, Inc.).

As variáveis categóricas foram descritas como frequência absoluta e relativa. As associações entre expressão dos marcadores de inflamação, tabagismo e ruptura dos aneurismas foram testadas utilizando-se o teste exato de Fischer. Considerou-se como estatisticamente significativo valor de probabilidade $p < 0,05$.

O cálculo do tamanho amostral não foi realizado pelo fato de o estudo ser inédito no tocante à aferição da quantidade de células CD68 e CD34 positivas em

9. CONCLUSÃO

Apesar de não se ter demonstrado diferença estatisticamente significativa quanto à distribuição da presença de células CD68 e CD34 entre tabagistas e não tabagistas nem entre aneurismas rotos e não rotos, a ocorrência, na população em estudo, de maior proporção de amostras contendo células CD68 tanto entre tabagistas quanto em aneurismas rotos sugere a necessidade da realização de estudos com tamanho amostral maior, com poder adequado para avaliar essas associações.

REFERÊNCIAS

AOKI, T. et al. Macrophage-derived matrix metalloproteinase-2 and -9 promote the progression of cerebral aneurysms in rats. **Stroke**, v. 38, n. 1, p. 162–169, 2007.

ARNING, A. et al. ADAMTS genes and the risk of cerebral aneurysm. **J Neurosurg**, v. 125, n. 2, p. 269–274, 2016.

BRUNO, G. et al. Vascular extracellular matrix remodeling in cerebral aneurysms. **Journal of neurosurgery**, v. 89, n. 3, p. 431–440, set. 1998.

CANHAM, P. B.; FINLAY, H. M.; TONG, S. Y. Stereological analysis of the layered collagen of human intracranial aneurysms. **J Microsc**, v. 183, n. Pt 2, p. 170–180, 1996.

CEBRAL, X. J. R. et al. Local Hemodynamic Conditions Associated with Focal Changes in the Intracranial Aneurysm Wall. **American Journal of Neuroradiology**, 2019.

CHALOUHI, N. et al. Cigarette smoke and inflammation: role in cerebral aneurysm formation and rupture. **Mediators Inflamm**, v. 2012, p. 271582, 2012.

CHISTIAKOV, D. A. et al. CD68/macrosialin: Not just a histochemical marker. **Laboratory Investigation**, 2017.

CONNOLLY JR., E. S. et al. Guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/american Stroke Association. **Stroke**, v. 43, n. 6, p. 1711–1737, 2012.

CRUSIUS, C. U.; DE AGUIAR, P. H. P.; CRUSIUS, M. U. Mixed aneurysm: A new proposed nomenclature for a rare condition. **Surgical Neurology International**, v. 8, n. 1, p. 29, 2017.

DE OLIVEIRA, I. A. et al. Development of a new experimental model of saccular aneurysm by intra-arterial incubation of papain in rabbits. **Neuroradiology**, v. 53, n. 11, p. 875–881, 2011.

DUTRA, L. M.; GLANTZ, S. A. Electronic cigarettes and conventional cigarette use among US adolescents: A cross-sectional study. **JAMA Pediatrics**, 2014.

FENNELL, V. S. et al. Biology of Saccular Cerebral Aneurysms: A Review of Current Understanding and Future Directions. **Frontiers in Surgery**, 2016.

FROSEN, J. et al. Remodeling of saccular cerebral artery aneurysm wall is associated with rupture: histological analysis of 24 unruptured and 42 ruptured cases. **Stroke**, v. 35, n. 10, p. 2287–2293, 2004.

GRILLO, F. et al. Factors affecting immunoreactivity in long-term storage of formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. **Histochemistry and Cell Biology**, 2015.

HOLNESS, C. L.; SIMMONS, D. L. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. **Blood**, 1993.

INTENGAN, H. D.; SCHIFFRIN, E. L. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. **Hypertension**, v. 38, n. 3 Pt 2, p. 581–587, 2001.

JIN, D. et al. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases expression in human cerebral ruptured and unruptured aneurysm. **Surg Neurol**, v. 68 Suppl 2, p. S11–6; discussion S16, 2007.

JOHNSON, B. D.; MATHER, K. J.; WALLACE, J. P. Mechanotransduction of shear in the endothelium: basic studies and clinical implications. **Vasc Med**, v. 16, n. 5, p. 365–377, 2011.

JUVELA, S. Growth and rupture of unruptured intracranial aneurysms. **J Neurosurg**, p. 1–9, 2018.

KAMIO, Y. et al. Roles of Nicotine in the Development of Intracranial Aneurysm Rupture. **Stroke**, v. 49, n. 10, p. 2445–2452, 2018.

LAWTON, M. T.; VATES, G. E. Subarachnoid Hemorrhage. **N Engl J Med**, v. 377, n. 3, p. 257–266, 2017.

LUCARINI, G. et al. VEGF, Microvessel Density, and CD44 as Inflammation Markers in Peri-implant Healthy Mucosa, Peri-implant Mucositis, and Peri-implantitis: Impact of Age, Smoking, PPD, and Obesity. **Inflammation**, 2018a.

LUCARINI, G. et al. VEGF, Microvessel Density, and CD44 as Inflammation Markers in Peri-implant Healthy Mucosa, Peri-implant Mucositis, and Peri-implantitis: Impact of Age, Smoking, PPD, and Obesity. **Inflammation**, nov. 2018b.

MENG, H. et al. High WSS or Low WSS? Complex interactions of hemodynamics with intracranial aneurysm initiation, growth, and rupture: Toward a unifying hypothesis. **American Journal of Neuroradiology**, 2014.

MIMATA, C. et al. Differential distribution and expressions of collagens in the cerebral aneurysmal wall. **Acta Neuropathol**, v. 94, n. 3, p. 197–206, 1997.

NIELSEN, J. S.; MCNAGNY, K. M. Novel functions of the CD34 family. **Journal of Cell Science**, 2008.

OLLIKAINEN, E. et al. Macrophage Infiltration in the Saccular Intracranial Aneurysm

Wall as a Response to Locally Lysed Erythrocytes That Promote Degeneration. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 77, n. 10, p. 890–903, 2018.

PENN, D. L. et al. The role of vascular remodeling and inflammation in the pathogenesis of intracranial aneurysms. **J Clin Neurosci**, v. 21, n. 1, p. 28–32, 2014.

QORRI, B. et al. Agonist-Biased Signaling via Matrix Metalloproteinase-9 Promotes Extracellular Matrix Remodeling. **Cells**, v. 7, n. 9, 2018.

RAFFETTO, J. D.; KHALIL, R. A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. **Biochemical Pharmacology**, v. 75, n. 2, p. 346–359, 2008.

RAKOCEVIC, J. et al. Endothelial cell markers from clinician's perspective. **Experimental and molecular pathology**, 2017.

SATTLER, S.; KENNEDY-LYDON, T. **The Immunology of Cardiovascular Homeostasis and Pathology**. First ed. Switzerland: Springer, 2017.

SHORT, J. G. et al. Elastase-induced saccular aneurysms in rabbits: comparison of geometric features with those of human aneurysms. **AJNR Am J Neuroradiol**, v. 22, n. 10, p. 1833–1837, 2001.

THOMPSON, B. G. et al. Guidelines for the Management of Patients With Unruptured Intracranial Aneurysms: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. **Stroke**, v. 46, n. 8, p. 2368–2400, 2015.

TULAMO, R. et al. Inflammatory changes in the aneurysm wall: a review. **J Neurointerv Surg**, v. 10, n. Suppl 1, p. i58–i67, 2018.

ZHOU, S.; DION, P. A.; ROULEAU, G. A. Genetics of Intracranial Aneurysms. **Stroke**, v. 49, n. 3, p. 780–787, 2018.

ZHU, Y. Q. et al. Arterial wall degeneration plus hemodynamic insult cause arterial wall remodeling and nascent aneurysm formation at specific sites in dogs. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 73, n. 9, p. 808–819, 2014.