Gislaine Vieira Damiani

“Análise computacional de fibras elásticas e colágenas da aorta humana.”

Campinas, 2012

UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTAUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

Gislaine Vieira Damiani

"Análise computacional de fibras elásticas e colágenas da aorta humana."

Orientador: *Prof Dr Konradin Metze*

Co-orientador: *Prof Dr. Carlos Lenz Cesar*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutora em Fisiopatologia Médica, na área de concentração: Biologia estrutural, celular, molecular e do desenvolvimento.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA GISLAINE VIEIRA DAMIANI
E ORIENTADA PELO PROF. DR. KONRADIN METZE

Assinatura do Orientador

_____

CAMPINAS
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

V673a

Vieira-Damiani, Gislaine, 1976-
Analise computacional de fibras elásticas e colágenas da aorta humana / Gislaine Vieira Damiani. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Konradin Metze.
Coorientador : Carlos Lenz Cesar.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Aorta. 2. Tecido elástico. 3. Colágeno. 4. Análise automática de textura. 5. Geração de segundo harmônico. I. Metze, Konradin, 1956-. II. César, Carlos Lenz, 1955-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Computerized texture analysis of elastic fibers and collagen of human aorta.
Palavras-chave em inglês:
Aorta
Elastic tissue
Collagen
Automatic texture analysis
Second harminic generation
Área de concentração: Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento
Titulação: Doutora em Fisiopatologia Médica
Banca examinadora:
Konradin Metze [Orientador]
Paulo Sampaio Gutierrez
Sebastião Roberto Taboga
Claudio Chrysostomo Werneck
Fábio Husemann Menezes
Data da defesa: 15-10-2012
Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

Banca Examinadora de Tese de Doutorado

Gislaine Vieira Damiani

Orientador: Prof. Dr. Konradin Metze
Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Lenz Cesar

Membros:
Professor (a) Doutor (a) Paulo Sampaio Gutierrez
Professor (a) Doutor (a) Sebastião Roberto Taboga
Professor (a) Doutor (a) Claudio Chrysostomo Werneck
Professor (a) Doutor (a) Fabio Husemann Menezes
Professor (a) Doutor (a) Konradin Metze

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 15/10/2012

Esta tese recebeu apoio da FAPESP através do projeto temático: Métodos de aproximação para computação visual. 07/52015-0

As imagens microscópicas desta tese foram adquiridas no Instituto Nacional de Fotônica Aplicada à Biologia Celular- "INFABIC"; CNPq Processo nº: 573913/2008-0, FAPESP Processo no: 08/57906-3

Aos meus pais Darci e Maria,

Ao meu esposo Samuel,

Ao Alex.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, pela força que me ajuda a caminhar.

Ao Dr Konradin, pela dedicação, paciência, confiança, profissionalismo e apoio durante todo este trabalho.

Ao Prof. Dr. Lenz, pela dedicação, estímulo, segurança e disposição em ensinar, em todo momento.

Ao Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho pela colaboração na realização e interpretação das análises de imunofluorescência, sempre disposto a colaborar!

Ao Dr Randall Luis Adam, que graças aos programas criado por ele foi possível à realização desta tese.

Ao Danilo do laboratório do Dr. Hernandes.

Daniela Razolii e Dra. Érika Anne do Núcleo de Medicina Experimental.

A Daniela, Rosana Moradin e Fernanda Priviero.

A Mariana, André, Vitor, Javier do laboratório de física.

Ao Sr. Sérgio e a Sra. Rosana que com tanta perfeição executaram a confecção das lâminas.

A banca de qualificação, pelas contribuições que deram a este trabalho.

Aos funcionários da secretaria do departamento de Anatomia Patológica.

A todas as pessoas que de alguma forma colaboraram para que este trabalho fosse possível: muito obrigada!

A Capes pelo apoio financeiro.

Instituto Nacional de Fotônica Aplicada à Biologia Celular- “INFABIC”; CNPq Processo nº: 573913/2008-0, FAPESP Processo no: 08/57906-3

Aos meus pais pela força, estímulo e pelo caráter.

Ao Samuel, meu esposo, pelo privilégio de te-lô ao meu lado em todos os momentos.

Aos meus irmãos, Jocimara, Jociane, Samuel, Saulo e Eliseu por tudo o que vivemos juntos.

Ao Alex, Daniela, Isabela, Devaldo, Nicolas, Laís, Brenda, Alessandra, Claúdia, Juninho, Lucas, Viviane, Iris, Edilaine, Brenda: por fazerem parte de minha vida.

Aos meus amigos Kátia, Daniel, Rafael e Angélica.

Aos meus amigos do laboratório de Análises clínicas do Hospital Municipal Dr Mário Gatti.

Ao Sr Marino (*in memorian*), a Sra Dirce, ao Edinei e ao Wagner, por tantas vezes terem me ensinado matemática e física.

Ao Prof. José Claudio, e Prof. Sérgio, do E.E.P.S.G. “Dr Thomás Alves”: grandes mestres!

"NÃO HÁ SABER MAIS OU SABER MENOS: HÁ SABERES DIFERENTES."

PAULO FREIRE

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO

Introdução.....20

Fibras elásticas.....20

Colágeno.....22

Dissecção de aorta..... 23

Aquisição de imagens.....24

Microscopia Confocal Multifóton, SHG.....24

Subjetividade na interpretação histológica.....26

OBJETIVO

Objetivo.....29

Objetivos específicos.....29

MATERIAL E MÉTODOS

Sujeitos.....31

Fibras elásticas e colágenas.....32

Imunofluorescência.....32

Microscópio Multifóton 33

Programas de Análise de Imagem.....35

Descritores extraídos da matriz de co-ocorrência Haralick.....38

IOF.....39

Fractal Sarkar.....40

Transformada Rápida de Fourier (FFT).....40

Análises estatísticas.....49

RESULTADOS

Comparação de regiões da aorta corada com picrosirius e sinal SHG.....51

Fibras elásticas.....54

Imunofluorescência.....63

Sinal SHG.....67

Dissecção.....73

Proporção fibras elásticas e colágenas 75

DISCUSSÃO..... 76

CONCLUSÃO.....83

BIBLIOGRAFIA.....85

ANEXOS.....97

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA: albumina sérica bovina

BMP: Bit map, Tipo de representação da imagem no qual cada ponto é associado a um valor.

ECM: matriz extracelular

ELCOR: proporção de fibras elásticas e colágenas.

FCM: Faculdade de Ciências Médicas

FD: Dimensão fractal

FFT: Transformada Rápida de Fourier

HAS: hipertensão arterial sistêmica

H&E: Hematoxilina e Eosina

IC: Instituto Computação

INFABiC: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicada à Biologia Celular

IOF: fluorescência óptica integrada

LSCM: *Laser Scanning Confocal Microscopy*

µ : micras

nm: nanômetros

PBS: tampão fosfato-salino

Pixel "Picture element" (menor ponto da imagem)

PMT: *Photo Multiplier Tube*

RER: reticulo endoplasmastico rugoso

SHG: Geração de Segundo harmônico

Titano-safira: Ti-safira

UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas

UV: ultra violeta

LISTAS DE TABELAS:

Tabela 1: Frequências espaciais em micras por anel.....46

Tabela 2: correlação entre fluorescência do picrossirius e sinal SHG.....52

Tabela 3: Correlação entre fluorescência sinal SHG x picrossirius, entropia e fractalidade.....52

Tabela 4: Variáveis da textura.....54

Tabela 5: Comparação da distribuição de fibras elásticas entre metade interna e externa da camada média.....57

Tabela 6: Variáveis associadas extraídas das imagens FFT.....60

Tabela 7: Variáveis extraídas do espectro de Fourier utilizadas na análise de fibras elásticas.....62

Tabela 8: Distribuição do colágeno tipo I e III em indivíduos normotensos.....65

Tabela 9: Distribuição do colágeno tipo I e III em indivíduos HAS.....66

Tabela 10: Picos do colágeno na espessura da aorta.....66

Tabela 11: Variáveis da textura da imagem de SHG.....67

Tabela 12: Picos do SHG na espessura da aorta. 70

Tabela 13: Variáveis associadas extraídas da imagem FFT.....72

Tabela 14: Variáveis extraídas do espectro de Fourier utilizadas na análise do sinal SHG 72

Tabela 15: Análise do sinal SHG na aorta de normotensos.....73

Tabela 16: Análise do sinal SHG na aorta de HAS.....73

Tabela 17: Proporção entre fibras elásticas e sinal SHG.....75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Geração de segundo harmônico: um feixe de luz com metade do comprimento de onda do feixe incidente é emitido pelos arranjos formados pelas fibras de colágeno 26

Figura 2: Esquema Microscópio Confocal.....33

Figura 3: Microscópio Confocal de Varredura a Laser.....34

Figura 4: Imagens da aorta antes da reconstrução.....35

Figura 5: Imagem da aorta após reconstrução, o quadrado em branco na aorta representa a caixa deslizadora (gliding box) que percorre a aorta pixel a pixel analisando-a.....36

Figura 6: Programa *Cell Sociology*. 36

Figura 7: Programa *Cell Sociology*: Mosaico: Color Filter: permite análise de imagens adquiras simultaneamente, separando-as por canais de cores. 37

Figura 8 A: Exemplo de imagem transformada em níveis de cinza. B: matriz de co-ocorrência formada a partir da luminosidade extraída de cada pixel.....38

Figura 9 (1): Imagem original com ondas diagonais (a), representação pseudo-tridimensional (b), imagem transformada como espectro de Fourier, (c) um par de pixels representam um onda da imagem original. Imagens gentilmente cedidas por: Dr. Randall Luis Adam.....41

Figura 9 (2): Imagem original com duas ondas diagonais (a), representação pseudo tridimensional (b) e como espectro de Fourier (c) dois pares de pixels representam 2 ondas na imagem original. Imagens gentilmente cedidas por: Dr. Randall Luis Adam. 41

Figura 10 Imagem original em diferentes níveis de cinza.....42

Figura 11: Espectro de Fourier: imagem transformada da figura anterior, dois pares de pixels representam duas ondas na imagem original. 42

Figura 12: Programa *Fourier Detect*, programa permite análise de ondulações da imagem tanto na horizontal como na vertical. 43

Figura 13: Esquerda: imagem transforma. Direita: espectro de Fourier, mostrando anéis e setores.....45

Figura 14: A: Imagem com altas frequências no setor nove (vertical), e consequentemente altas variações. B: Setor nove: baixas frequências: poucas variações.....47

Figura 15: Imagens adquiridas no microscópio confocal multifóton. A: imagem de colágeno emitida pelo SHG. B: mesma imagem corada com picrosirius. C: sobreposição das duas imagens.....51

Figura 16: Espessura da aorta de individuo normotenso. Verde: Fluorescência da eosina em fibras elásticas. Vermelho: geração de segundo harmônico (SHG) em fibras colágenas. A seta indica a transição entre camada média e adventícia. IOF: sem unidade.....53

Figura 17: Espessura da aorta de individuo HAS. Verde: Fluorescência da eosina em fibras elásticas. Vermelho: geração de segundo harmônico (SHG) em fibras colágenas. A seta indica a transição entre camada média e adventícia. IOF: unidade não definida. 53

Figura 18: Distribuição da fluorescência emitida pela eosina (corante de fibras elásticas) na aorta de normotensos (verde) HAS (laranja) e dissecadas (vermelho). IOF: Unidade não definida..... 55

Figura 19: Abscissa Y: Coeficiente de correlação entre sinal de fluorescência e distancia da íntima. Com a idade ocorre diminuição da intensidade deste sinal em direção à adventícia. r =-0,49 r2=0,23; p=0,01.....55

Figura 20 Abscissa Y: Coeficiente de correlação entre sinal de fluorescência e distancia da íntima em hipertensos. Não encontramos diferenças significativas na intensidade do sinal ao longo da espessura da média, íntima sentido adventícia, com a idade em HAS. r=0,04, r^2=0.48 p=0,37.....57

Figura 21. Fibras elásticas: Plotamos em cada aorta os cem pontos de maiores valores da Entropia. Nos pacientes normotensos os maiores valores concentram-se na transição do terço interno e médio.....58

Figura 22. Fibras elásticas: Plotamos em cada aorta os cem pontos de maiores valores da Entropia. Nos portadores de HAS os maiores valores estão localizados no terço externo da camada média. 59

Figura 23: Análise de Fourier. Vermelho: Valores de frequências no setor um (S1): corresponde a ondulações no eixo horizontal. Verde: frequências no setor nove (S9: ondulações no eixo vertical).....60

Figura 24: Análise de Fourier. Ondulações na imagem: quociente das frequências do setor nove e um. 61

Figura 25: Análise de Fourier. Cem maiores valores do quociente 9/1: ondulações na imagem de fibras elásticas de normotensos.....62

Figura 26: Análise de Fourier. Cem maiores valores do quociente 9/1: ondulações na imagem de fibras elásticas: em hipertensos.....63

Figura 27: controle: Imunofluorescência da aorta. Esquerda: imagem marcada com anticorpo, direita: imagem negativa.....63

Figura 28: Distribuição do colágeno Tipo I ao longo da espessura da aorta. IOF: unidade não definida. 64

Figura 29: Distribuição do colágeno Tipo III ao longo da espessura da aorta. IOF: unidade não definida.....64

Figura30: A: IOF do colágeno tipo I B: IOF do colágeno tipo III em aorta de normotensos. Metade interna (próximo à íntima) e externa (próximo à adventícia). IOF: unidade não definida.....65

Figura 31: A: IOF do colágeno tipo I B: IOF do colágeno tipo III em aorta de hipertensos. Metade interna (próximo à íntima) e externa (próximo à adventícia). IOF: unidade não definida.....66

Figura 32: Distribuição do SHG na espessura da camada média em normotensos (verde) HAS (laranja) e que sofreram dissecção (vermelho). 68

Figura 33: Distribuição do sinal SHG na espessura da camada média em individuo HAS. A seta em vermelho indica o vale formado entre dois picos do sinal SHG, a seta em preto indica a transição entre as camadas média e adventícia. IOF: Unidade não definida. 69

Figura 34: Abscissa Y: Ordenada Y: Coeficiente de correlação entre sinal SHG e distancia da íntima em aorta de normotensos. x: idade. Com o envelhecimento ocorre diminuição do sinal em direção á adventícia em normotensos. r: -0,4848, r^2: 0,23885 p=0.08…….....70

Figura 35: Ordenada Y: Coeficiente de correlação entre sinal SHG e distancia da íntima em aorta de hipertensos. X: idade. Com envelhecimento ocorre diminuição do sinal em direção á adventícia nos portadores de HAS. r: -0,31672; r^2: 0,10031; p=0,03……...…..……...70

Figura 36: A: imagem da espessura da aorta de individuo dissecado, adquirida no microscópio multifóton, verde: fibras elásticas, vermelho SHG. B: imagem de aorta em microscópio de luz comum corada com A HE. C: gráfico mostrando a IOF Do sinal SHG na espessura da camada média, a seta indica o local onde ocorreu a dissecção.....74

Figura 37**:** Proporção entre colágeno e fibras elásticas (ELCOR) em aorta de normotensos, hipertensos e de dissecção. 75

RESUMO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) bem como o envelhecimento provoca mudanças na estrutura dos grandes vasos sanguíneos - aorta e seus ramos - propiciando o desenvolvimento de processos degenerativos que são a causa de diversas doenças. O uso de ferramentas fotônicas na aquisição de imagens, associado a recursos matemáticos para a interpretação delas representa um avanço para as análises histopatológicas, pois permitem a visualização e compreensão de pequenas estruturas que antes eram impossíveis de serem observadas. O objetivo desse trabalho foi associar estas duas tecnologias (ferramentas fotônicas e recursos matemáticos) e com isso criar uma metodologia para a análise simultânea de fibras elásticas e colágenas na aorta. Para tanto utilizamos aorta ascendente de 72 pacientes, sendo 22 normotensos, 38 portadores de HAS e 12 aortas de dissecção. As lâminas coradas com hematoxilina eosina foram examinadas no microscópio multifoton, com dois fótons: laser de argônio para fluorescência da eosina, corante de fibras elásticas e Ti:safira para SHG, sinal gerado por moléculas de colágeno. A distribuição e organização das fibras elásticas e colágenas foram analisadas pelas seguintes variáveis: morfometria geométrica, derivadas da matriz de co-ocorrência de Haralick, Transformada de Fourier e fluorescência ótica integrada. Usando estes descritores da textura associados a fractais, observamos que a geração do SHG é dependente não só da presença do colágeno como também do arranjo destas fibras. Observamos ainda que em indivíduos normotensos, quando comparados aos portadores de HAS, ocorre uma diminuição na distribuição do sinal SHG ao longo da espessura da camada média partindo da íntima em sentido à adventícia. Dessa maneira concluímos que os maiores distúrbios das fibras elásticas, nos indivíduos normais ocorrem na transição do terço interno para o médio, enquanto que nos portadores de HAS eles estão distribuídos em toda a espessura da aorta. Além disso, estes estudos nos permitiram verificar que a dissecção da aorta ocorre entre dois reforços de colágeno, uma vez que este fenômeno foi constatado entre dois picos de SHG.

Abstract

The arterial hypertension as well as aging induces changes in the structure of large blood vessels – aorta and its branches – leading to development of degenerative processes which are the cause of many diseases. The use of photonics tools for image acquisition, associated to mathematical resources for interpretation of them represents an advance in histopathological analysis, because it allows the visualization and understanding of small structures that were impossible to be observed before. The main objective of this study was to associate both technologies (photonics tool and mathematical resources) to create a new methodology to evaluate, simultaneously, elastic and collagen fibers in aorta. For this we've used autopsies of ascending aortas from 72 patients, being 22 samples from normotensives individuals, 38 from HAS patients and 12 aortas from dissection. HE-stained paraffin sections from ascending aortas were analyzed by multifoton microscopy, with 2 types of photons: Two-photon excited fluorescence (TPEF) for elastin and Ti:safira for SHG to analyze collagen fibers. The distribution and organization of elastic and collagen fibers were analyzed by the following variables: geometric morphometric, derived from the co-occurrence matrix of Haralick, Fourier Transform and Fluorescence optics integrated. Using these texture descriptors associated to analysis of fractals, we've observed that SHG generation is not only dependent on the presence of collagen but on the arrangement of these fibers as well. We also observed that in normotensives individuals, if compared to HAS patients, occurs a decrease in the SHG intensity along the medial thickness from intimate in direction to adventitia. Thus we conclude that the major disorders of elastic fibers in normal subjects occur in the transition from the third layer to the middle, while in HAS individuals these disorders are distributed throughout the thickness of the aorta. Furthermore, this study has allowed us to verify that the aortic dissection has occurred between two peaks of SHG, since this phenomenon was observed between two ribs collagen.

INTRODUÇÃO

Introdução

A hipertensão arterial sistêmica (HAS), bem como o envelhecimento provoca mudanças na estrutura dos grandes vasos sanguíneos – aorta e seus ramos (Junqueira e Carneiro, 1995) – propiciando desenvolvimento de processos degenerativos que causam diversas doenças (Groenink *et al*, 1999; Vieira-Damiani, 2010).

A aorta é formada por três túnicas, a saber: íntima, média e adventícia. A camada íntima é formada por células endoteliais que se apoiam sobre uma matriz extracelular (ECM) (Jacob, 2003). A camada média é constituída por células musculares lisas interpostas entre fibras e lamelas elásticas, fibras colágenas, e componentes da ECM tais como: proteoglicanos e glicoproteínas estruturais (Silver et al, 1989, Junqueira e Carneiro, 1995, Halloran, 1995; Choudhury 2008, De Figueiredo et al, 2008). Já a adventícia é composta por colágeno, nervos, pequenos vasos e vaso vasorum, cuja função é irrigar a adventícia e a parte externa da média (Junqueira e Carneiro 1995), enquanto a parte interna desta camada é irrigada, por difusão, a partir do lúmen.

As fibras elásticas e colágenas são os principais constituintes da camada média. As primeiras conferem a elasticidade necessária para que os vasos suportem o volume sistólico, já as fibras colágenas fornecem resistência aos tecidos. Juntos, estes dois componentes contribuem para a estabilidade do vaso.

Na aorta o número de lamelas elásticas diminui distalmente, enquanto o colágeno mostra tendência oposta. (Schlatman, 1977). Alterações na estrutura e na quantidade relativa destas fibras comprometem a propriedade biomecânica e podem levar a ruptura dos vasos (Farquharson e Robins, 1991; Vieira, 2009). Conhecer a arquitetura da aorta normal e de pacientes hipertensos é imprescindível para compreender os mecanismos de formação de diversas doenças, dentre elas a dissecção é a mais grave (Roberts, 1981).

Fibras elásticas

Nos mamíferos adultos, o sistema elástico é composto por três tipos de fibras: oxitalânicas, elaunínicas e fibra elástica madura (Montes, 1992). O processo de elastogênese inicia-se com as

fibras oxitalânicas que, formadas exclusivamente por microfibrilas de natureza glicoprotéica, são secretadas por fibroblastos e formam feixes de 10-12nm de diâmentro. Quando pequenas porções de material amorfo (a elastina) se associam a estes feixes ocorre a formação das fibras eulanínicas. Contudo, a deposição contínua de elastina sobre as fibras eulalínicas leva a formação de uma fibra espessa envolta por microfibrilas gerando assim a fibra elástica madura. (Fullmer e Lille, 1958; Fahrenbach et al, 1966; Mecham e Davis, 1994, Montes,1992). Dessa maneira a fibra elástica madura apresenta dois principais componentes: um amorfo central, que representa 90% do conteúdo e encerra a proteína elastina, e o outro microfibrilar, periférico, de natureza glicoprotéica. (Mecham e Davis, 1994).

A elastina é sintetizada a partir de monômeros de tropoelastina solúvel que, por sua vez, possui mais de 800 resíduos de aminoácidos, principalmente apolares, tais como: glicina, valina, alanina e resíduos de prolina, estes em menor quantidade. A tropoelastina forma hélices que contém regiões ricas em resíduos de glicina, as quais são separadas por regiões curtas contendo resíduos de lisina e alanina. (Rosenbloom *et al*, 1993; Lehninger, 2004)

Graças à ação da lisina oxidase a tropoelastina sofre desaminação oxidativa, em alguns de seus resíduos de lisina, e se anastomosa formando polímeros funcionais (Mecham e Davis, 1994; Junqueira e Carneiro, 2004). Posteriormente estes polímeros se associam e são convertidas, por ação enzimática, em desmosina e isodesmosina – moléculas responsáveis pela cor amarela da elastina – contribuindo assim para a formação de uma rede fibrosa, altamente polarizada e insolúvel: a elastina madura. (Reiser et al, 1992; Shinohara et al, 2003). As moléculas de elastina por sua vez são unidas por pontes covalentes que geram uma rede interconectada, extensível e com boa estabilidade que pode expandir-se em qualquer direção (Junqueira e Carneiro 2004; Mithieux *et al* 2009).

A distribuição dos componentes do sistema elástico varia nos tecidos e órgãos conforme a função destes (Montes, 1996): as fibras oxitalânicas já foram descritas no ligamento periodontal humano, pele, nervos, membrana basal da traquéia e cartilagens; as fibras elaunínicas foram encontradas em derme, cartilagen, nervos, traquéias e bronquio; as fibras elásticas maduras foram encontradas em tecidos que necessitam de elasticidade como: pulmão, pele, ligamentos,

cartilagens e camada média dos grandes vasos. (Carvalho e Vidal, 1995; Montes, 1996; Milewicz et al, 2000).

Em aorta de individuos adultos há uma média de 55 a 70 fibras dispostas em lamelas paralelas e conectadas umas as outras por fibras menores, as lâminas elásticas. Com o envelhecimento, estas lamelas sofrem rupturas causando fragmentação das fibras e consequentemente, levando a um remodelamento da parede do vaso. (Schlatmann e Becker, 1977; Nakashima e col, 1990; Junqueira e Carneiro1997)

Colágeno

O colágeno pertence a uma família de proteínas fibrosas, provenientes de genes diferentes muito abundantes em mamíferos (Junqueira e Carneiro 2004). Estas moléculas são insolúveis e resistentes e sua principal função é a estrutural. São conhecidos 28 tipos de colágenos (Ricard-Blum,2010), sendo que todos eles possuem um domínio proteíco que consiste em três cadeias alfa (α) organizados em uma estrutura helicoidal. Em alguns tipos de colágeno este domínio protéico pode representar mais de 96% da estrutura da molécula (exemplo: tipo I) e, em outros menos que 10% (tipo XII).

Cada cadeia alfa (α) é composta por repetições de Gly-X-Y, sendo que X é frequentemente uma prolina e Y 4-hidroxiprolina, porém já foram identificados resíduos de 3-hidroxiprolina nas estruturas de alguns tipos de colágeno (I, II, III e V) (Weiss et al. 2010). A glicina representa 33% dos aminoácidos da cadeia, enquanto 13% são prolina e 9% hidroxiprolina. Três cadeias se unem em tripla hélice simétrica e a estabilidade desta hélice se deve aos seguintes fatores: resíduos de glicina, grande quantidade de prolina e hidroxiprolina, pontes de hidrogênio e interaçãoes eletrostáticas entre lisina e aspartato (Persikov et al. 2005; Fallas et al. 2009). Posteriormente, tripla hélice é reforçada por ligações covalentes. (Junqueira e Carneiro, 1999).

A síntese do colágeno começa no retículo endoplasmastico rugoso (RER), onde as cadeias α, devido à conformação em tripla hélice, recebem o nome de procolágeno. Ainda no interior desta organela os resíduos de prolina e lisina sofrem hidroxilação e, posteriormente, glicosilação dos resíduos hidroxilisil. Por exocitose, o procolágeno alcança o meio extracelular e neste local sofre clivagem, que gera regiões funcionais chamadas de tropocolágeno. O

tropocolágeno por sua vez pode organizar-se em filamentos e microfibrilas, os quais podem originar: i) fibras e estas em feixes; ii) fibrilas de ancoragem; iii) delicadas redes que vão compor as membranas basais, ou ainda, podem se organizar de forma mista gerando os chamados heterotrópicos. Estas diferentes formas de organização das cadeias de colágeno culminam nos 28 tipos de colágenos conhecidos até o momento.

Como mencionado anteriormente a distribuição do colágeno nos tecidos depende da função deste, dessa maneira tecidos que necessitam de resistência são compostos por colágenos que formam feixes, já a interação entre as células ocorre através do colágeno fibrilar. Os tipos de colágenos presentes, em maior abundância, na aorta humana – vaso que necessita de resistência e elasticidade – são os fibrilares do tipo I, III (80 e 90%) e 10 % de outros tipos IV, V, VI (Kielty et al, 1993). Enquanto os primeiros (I, III) conferem rigidez ao vaso, os últimos (IV, V e VI) fornecem resistência (Barnes et al, 1999). O colágeno do tipo I organiza-se formando fibrilas de 70 a 100nm de diâmetro que, posteriormente, se unem e formam fibras com diâmetro entre 100 e 500nm. O colágeno do tipo III – formado por fibrilas finas com longitude entre 60 e 300 nm e diâmetro entre 35 a 50 nm – muitas vezes associado ao tipo I estrutura-se em forma de rede nos tecidos que necessitam de resistência. (Fleischmajer et al, 1980; Sato, Leo e Liber, 1986, Lodish et al, 2000).

Assim como as fibras elásticas, o colágeno sofre alterações estruturais, provocadas pelo envelhecimento, que são acentuadas pela HAS. Durante a hipertensão ocorre ativação de metaloproteinases, as quais degradam componentes da matriz extracelular como a elastina e o colágeno (McEniery et al. 2005; Ahmed et al 2006), provocando um remodelamento da arquitetura da aorta capaz de comprometer a estabilidade do fluxo sanguíneo e causar diversas doenças vasculares, dentre elas a mais grave é a dissecção da aorta.

Dissecção de aorta

A dissecção da aorta é uma delaminação da camada média que se inicia com uma ruptura da camada íntima e permite a entrada de sangue na média. Tal fenômeno disseca este vaso em duas partes criando um falso lúmen, podendo romper a íntima ou a adventícia. A formação deste novo lúmen aumenta a espessura da parede da aorta, diminui o lúmen verdadeiro e consequentemente, o fluxo sanguíneo para os órgãos vitais (Juang et al, 2008).

DeBakey e colaboradores (1965) sugeriram uma classificação para esta enfermidade (dissecção da aorta) dependente do segmento e do tipo de delaminação que sofre a aorta. Tal classificação é composta por três tipos: tipo I – quando há comprometimento da aorta ascendente e descendente; tipo II – quando a delaminação se restringe a aorta ascendente; tipo III – quando a delaminação ocorre exclusivamente na aorta descendente. Outra classificação mais simples foi realizada por Daily e colaboradores em 1970. Tal classificação compreende os tipos Stanford A**:** delaminação da aorta ascendente, independente da extensão e Stanford B: comprometimento da aorta descendente, que pode ou não estender-se à região diafragmática.

As dissecções têm incidência de 5-30 por um milhão de pessoas ao ano e estão relacionadas à alta letalidade. Estas enfermidades são mais frequentes em homens (66% dos casos) sendo que as mulheres são afetadas em idades mais avançada. (Hagan, 2000; Nienabee et al, 2004). É importante ressaltar que a HAS está presente em 70% dos casos.

Diversos pesquisadores têm analisado a arquitetura da aorta dissecada, porém os achados são conflitantes. Alguns estudiosos encontraram diminuição do colágeno (Rahkonen e col, 2004; De Figueiredo col, 2009), outros aumento (Bode e col, 2003; Wang e col 2006) e um terceiro grupo não encontrou diferença (Sariola e col, 1986). As interpretações são controversas e o mecanismo fisiopatológico da doença permanece obscuro. Há uma peculiaridade da dissecção da aorta ainda não satisfatoriamente explicada: a dissecção ocorre, na maioria das vezes, até o terço externo da média, porém não o ultrapassa, criando dessa maneira um canal de dissecção entre o terço médio e externo da média.

Aquisição de imagens

Microscopia Confocal Multifóton, SHG

Fibras elásticas e colágenas podem ser visualizadas, simultaneamente, quando excitadas pela Luz UV, a primeira através da autofluorescência e a segunda por geração de sinal de segundo harmônico (SHG). Rotineiramente o colágeno é analisado na microscopia de luz comum corado com picrossirius e as fibras elásticas coradas com hematoxilina eosina.

A microscopia confocal consiste em focalizar a imagem de uma amostra fluorescente em um *pinhole* para rejeitar a luz fora do plano focal e permitir a reconstrução na terceira dimensão. O termo confocal se refere às técnicas que utilizam duas focalizações, isso permite a obtenção de resoluções laterais limitadas por difração da ordem de 100 nm e axiais da ordem de 200 nm. Nos primeiros microscópios confocal a varredura era obtida movimentando a amostra, e não a fonte de luz. Nos LSCM (*Laser Scanning Confocal Microscopy*) atuais a varredura é obtida movimentando o feixe de laser, o que confere velocidade muito maior na aquisição de imagens.

A utilização dos lasers pulsados abre caminho para utilização da óptica não linear e processos multifótons. Processos multifotônicos ocorrem quando mais de um fóton se encontram no mesmo tempo e no espaço. Os lasers pulsados garantem a superposição dos fótons no tempo, enquanto a superposição no espaço só acontece no foco do laser. Essa microscopia foi descrita pela primeira vez por Denk *et al*,1990.

A excitação da fluorescência por um processo de absorção de dois fótons é feita no dobro do comprimento de onda dos processos de um fóton. Uma das principais vantagens da microscopia confocal é a profundidade de observação na amostra. O espalhamento Rayleigh de luz depende do comprimento de onda com $1/\lambda^4$ sendo 16 vezes menor para a excitação por 2 fótons comparada à de 1 fóton, portanto. Essa é uma das principais vantagens da microscopia multifóton quando comparada com a de um fóton (Denk *et al.*, 1990; Centonze e White, 1998). Com dois fótons só o volume focal é excitado, enquanto que técnicas que utilizam apenas um fóton todo o cone de luz dentro e fora de foco é excitado. Assim, a nova técnica reduz os danos na amostra e mantém sua viabilidade durante o tempo de exposição aos lasers.

Outro processo de óptica não linear que pode ser utilizado na microscopia é a geração de Segundo harmônico (SHG) (Cox *et al.*, 2004; Zoumi *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2003; Campagnola *et al.*, 2002; Provenzano *et al.*, 2006. Nesta técnica um feixe de luz, com metade do comprimento de onda do feixe incidente, é gerado por moléculas que possuem assimetria de inversão, como é caso dos arranjos formados pelas fibras de colágeno. (Chiu et al, 2010). (Figura 1)

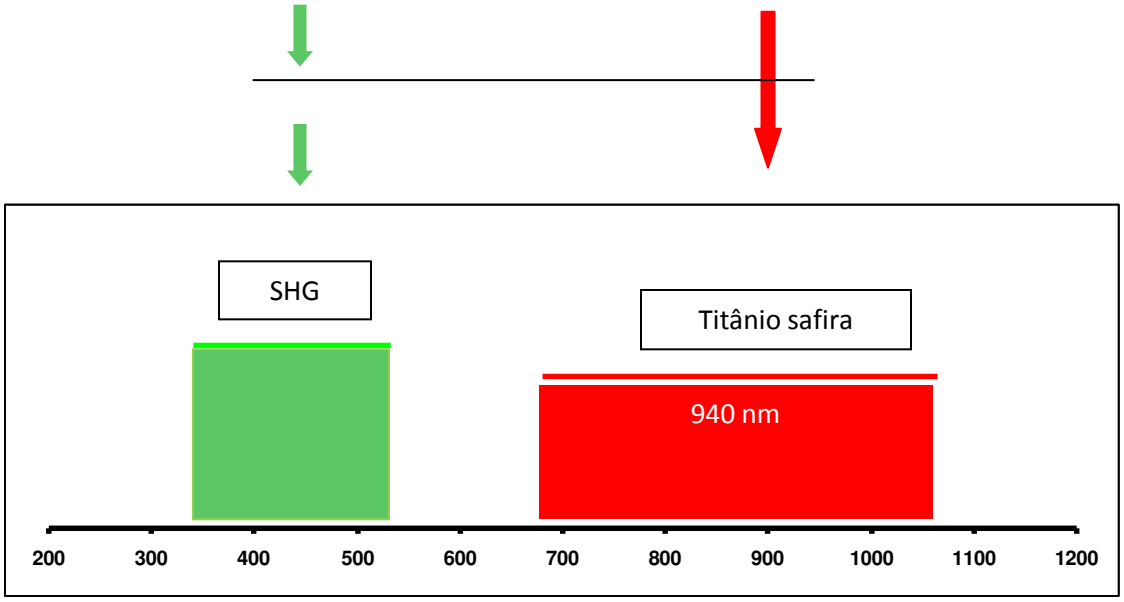

Figura 1: Geração de segundo harmônico: um feixe de luz com metade do comprimento de onda do feixe incidente é emitido pelos arranjos formados pelas fibras de colágeno.

Subjetividade na interpretação histológica.

Um dos principais problemas das análises histológicas e patológicas é a falta de concordância entre observadores. Outros agravantes são a incidência de erros devido a cansaço, limitações na resolução, tamanho dos dispositivos de visualização, dentre outros. Além disso, estas análises geralmente são demoradas e trabalhosas, o que acaba sendo o fator limitante na produtividade dos laboratórios. Métodos quantitativos de análise de imagens histológicas permitem reduzir as incertezas no diagnóstico e podem produzir fatores prognósticos relevantes para prever a resposta terapêutica e a sobrevida do paciente. Diversos pesquisadores tem demonstrado alto grau discordâncias entre patologista, mesmo entre aqueles com anos de experiência s (Elsheikh et al., 2008; Sobrinho-Simões, 2000).

A textura da imagem de equivalência histológica dos tecidos está intimamente relacionada com o estado fisiológico e com o distúrbio fisiopatológico do organismo, pequenas alterações que não perceptíveis ao olho humano pode ser fundamental para o diagnóstico precoce e consequentemente para prognóstico do paciente. A automação total ou parcial da análise, utilizando-se de ferramentas matemáticas aplicadas no estudo de imagens microscópicas, permite

que pequenas alterações sejam quantificadas além de possibilitar a análise da lâmina inteira sem custo adicional.

Neste trabalho, as imagens foram adquiridas no microscópio multifóton que permite à visualização de estruturas delicadas que não poderiam ser analisada na microscopia óptica tradicional. A interpretação destas imagens foi possível graças a ferramentas matemáticas que estimam pequenas alterações que não são visíveis ao olho humano.

OBJETIVO

2.0 Objetivo

Objetivo

Desenvolver uma metodologia automática para a análise simultânea de fibras elásticas e colágenas

Objetivos específicos

1. Descrever a topografia das estruturas do colágeno que geram sinal de segundo harmônico. (SHG).

2. Analisar, por fluorescência da eosina, a arquitetura das fibras elásticas e os arranjos formados pelas moléculas de colágeno na aorta ascendente de pacientes normotensos, hipertensos e dissecção.

3. Analisar se sexo e a idade influenciam na arquitetura de fibras elásticas e colágenas.

MATERIAL E MÉTODOS

3.0 Material e Métodos

Sujeitos:

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (FCM-UNICAMP). (Número: 549/2007)

Os blocos de parafina utilizados neste estudo pertencem ao Departamento de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas, Unicamp. Foi utilizado material proveniente de autópsia (normotensos e HAS) e as aortas que sofreram dissecções eram provenientes tanto de material de necropsia como de material cirúrgico.

Foram analisados os prontuários médicos (dados clínicos: aferição de pressão arterial, peso, idade, uso de medicamentos, histórico de doenças) e relatórios de autópsias (peso do coração, histologia renal e cardíaca) de todos os pacientes. Os pacientes foram distribuídos em três grupos: normotensos, hipertensos, e dissecção.

Critérios de inclusão para o grupo de pacientes normotensos:

- Ausência de aterosclerose macroscópica na aorta ascendente próxima a pulmonar;
- Ausência de medicação anti-hipertensiva e diabetes;
- Peso do coração normal em relação ao peso corporal e altura do paciente. (0,4% do peso do corpo, sendo permitida uma tolerância de 10%.);
- Histologia renal sem alteração (ausência de nefrosclerose);

Critérios de inclusão para o grupo de pacientes hipertensos:

- Ausência de aterosclerose macroscópica na aorta ascendente próxima a pulmonar;
- Uso de medicamento anti-hipertensivo ou diagnóstico de HAS;

Foram excluídos dos grupos, aqueles pacientes que apresentaram qualquer doença ou situação que pudesse comprometer a estrutura da aorta, tais como: usuários de crack, gestantes e portadores da Síndrome de Marfan.

Em anexo segue tabela caracterizando os indivíduos.

Fibras elásticas e colágenas.

Para análise de fibras elásticas (fluorescência da eosina) e colágenas (SHG), os blocos foram cortados com 15 micras de espessuras, desparafinizados, reidratados e corados com hematoxilina eosina no Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental. As imagens foram adquiridas no microscópio multifóton utilizando, simultaneamente, dois lasers: laser de argônio 488nm, para coletar fluorescência da eosina em fibras elásticas e Ti safira (860nm) para geração de segundo harmônico (SHG) em moléculas de colágeno.

Para padronização do trabalho coramos cinco lâminas de aorta com Sirius Red 3BA em solução saturada de ácido pícrico (picrosirius), procedimento rotineiro em patologia para coloração de colágeno, e adquirimos duas imagens de cada local, sendo uma de SHG excitada com Ti-safira 890 nm e coletado na metade do comprimento de onda e a outra com laser 788 nm para excitar a fluorescência do picrossirius.

Imunofluorescência

Os cortes foram feitos com cinco micras de espessura colocados em lâminas silanisadas, desparafinizados e reidratados. Em seguida foram lavados três vezes por 5 minutos com PBS (tampão fosfato-salino) 0,1M pH 7,4; tratados por 15 minutos com Triton a 2% em PBS 0,1 pH 7,4; repetiu-se a lavagem com PBS. Para bloquear a imunoperoxidase utilizou-se peróxido de hidrogênio 0,3% em PBS por 15 minutos, seguido de lavagem em PBS três vezes 5 minutos cada.

Bloqueou-se por 1 hora a ligação inespecífica do anticorpo com BSA (albumina sérica bovina) 5% em PBS 0,1M pH 7,4 e 5% soro de coelho. Foi incubado overnight com anticorpo primário (colágeno tipo I, monoclonal mouse IgG1, SC-59772; e para colágeno tipo III monoclonal rabbit IgG SC 8781) diluído a (1:50) em BSA a 1% em PBS. Repetiu-se lavagem com PBS. Incubou-se por 1 hora a temperatura ambiente com anticorpo secundário (para colágeno I: goat anti

mouse IgG-FITC SC 2010 e para colágeno III: Donkey anti-rabbit IgG-TR SC 3923), após este procedimento as reações seguintes foram realizadas na ausência de luz. Repetiu-se lavagem com PBS, para montagens das lâminas foi utilizado Vectashield. Todo este procedimento foi realizado no Laboratório de Biologia Celular (IB/UNICAMP), coordenado pelo Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho.

As imagens foram adquiridas, por varredura a laser, no microscópio Multifoton no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicada à Biologia Celular (INFABiC).

Microscópio Multifóton

O sistema experimental do INFABIC, UNICAMP é um microscópio invertido Olympus IX-81 com dois fótons (figura: 4), equipado com scaner FV300, laser de argônio FV-5 COMB2 para fluorescência e para geração de segundo harmônico (SHG) Titano-safira (Ti-safira).

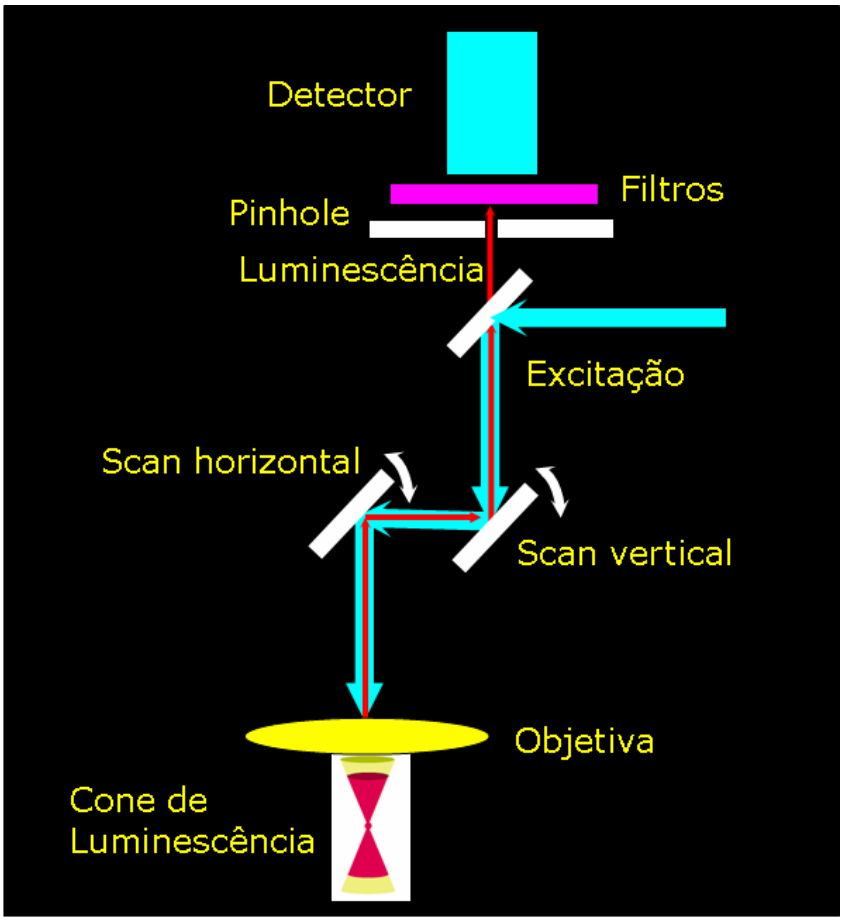

Figura 2: Esquema Microscópio Confocal

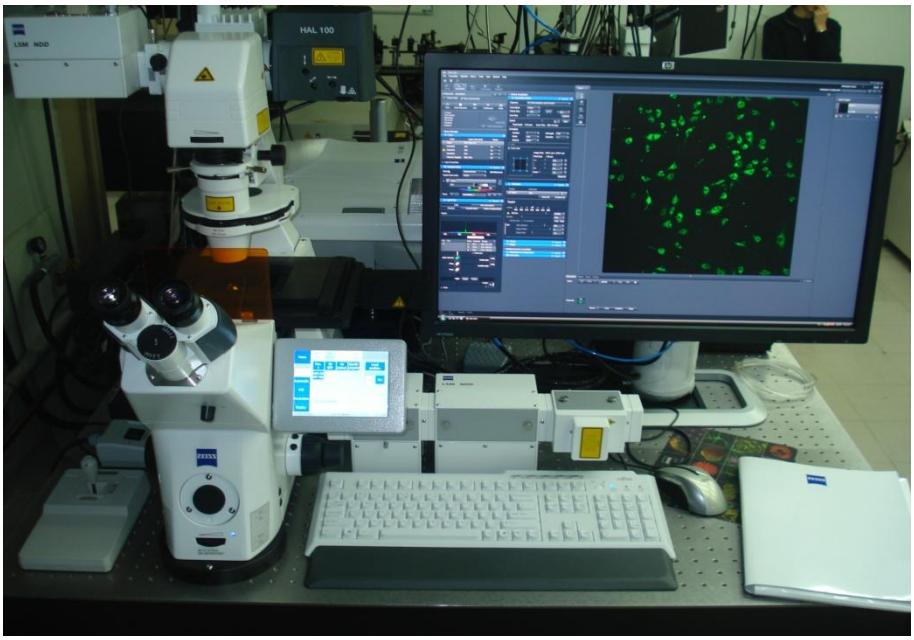

Figura 3: Microscópio Confocal de Varredura a Laser

Este equipamento tem capacidade de adquirir imagens em 16 comprimentos diferentes. Os fótons são coletados por 16 micro-channel- PMT ("*Photo Multiplier Tube"*) com tempos de resposta de 20 picosegundos. O sistema eletrônico detecta os tempos de todos os fótons sincronizados com a varredura e reconstrói as imagens de tempo de vida.

A possibilidade de utilizar este equipamento nas aquisições de imagens permite algumas vantagens em relação a outros equipamentos ópticos convencionais, tais como: maior resolução em imagens em três dimensões em relação à lâmpada de mercúrio, reconstrução de imagens tridimensional, maior visualização em profundidade do tecido a ser observado, e possibilidade de utilizar várias técnicas de aquisição de imagens simultaneamente.

A fluorescência acontece por um fenômeno onde elétrons do fluoróforo absorvem fótons com energia proveniente de uma fonte (lâmpada ou feixe laser) e passam de um estado fundamental (baixa energia) para um estado excitado (alta energia). Neste estado, o fluoróforo passa por uma mudança em sua conformação e pode interagir com uma série de moléculas ao seu redor. Com isso a energia deste estado excitado é dissipada e o elétron passa para um estado de menor energia,

(não o estado fundamental). A diferença de energia entre o estado excitado e o estado de menor energia é emitida em forma de um fóton. (Thomaz, 2007)

A técnica de microscopia de fluorescência consiste justamente em captar este fóton que é emitido e com ele gerar uma imagem. Estes procedimentos permitem maiores detalhamentos de estruturas (Koning et al, 2001).

As imagens foram adquiridas, utilizando laser de argônio a 488 nm e Titânio safira (Ti: safira) 890 simultaneamente, óleo de imersão e objetiva 40x, com resolução de dois micrômetros por pixel. As mesmas foram iluminadas com o laser até que o sinal SHG aparecesse e então iniciou a aquisição da imagem.

Programas de Análise de Imagem

Cada imagem adquirida tem a dimensão de 512x512, como a espessura da aorta varia de 1,3 à 2,3 cm as imagens foram justapostas (Figura 4 e 5) pelo software *Cell sociology* (Figura 6 e 7), desenvolvido pelo Dr. Adam Luis Randal do Instituto de Computação, Unicamp.

A imagem composta, que abrange toda a espessura da camada média, percorre uma janela deslizadora (gliding box), 128x128 pixels, em passos de um pixel. Para cada janela podemos registrar dados básicos como volume dos valores de cinza, fluorescência óptica integrada (IOF), variáveis da matriz de co-ocorrência e da Transformada de Fourier. Conforme a espessura da parede da aorta podemos ter de 2000 a 4500 *gliding box* e para cada um destes, calculamos com o auxilio do computador os diferentes descritores da textura acima mencionados. Assim é possível obter uma descrição minuciosa da textura relacionando a topografia da aorta. Para eliminar os ruídos das imagens, fizemos os cálculos usando *threshold* 128.

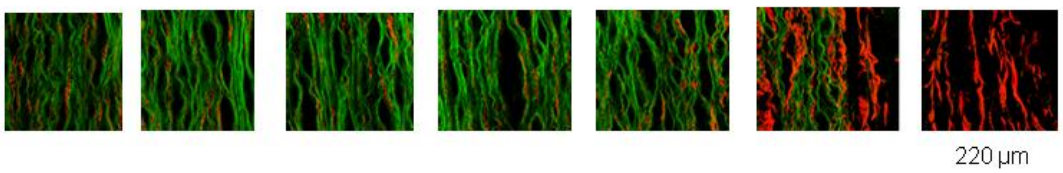

Figura 4: Imagens da aorta antes da reconstrução.

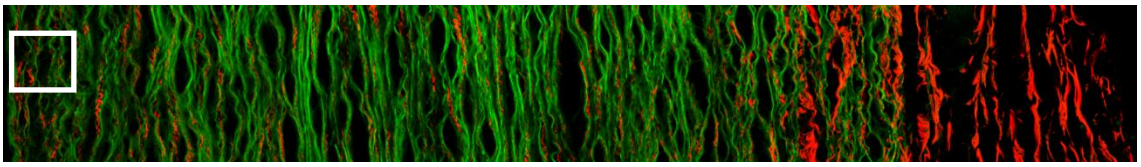

Figura 5: Imagem da aorta após reconstrução, o quadrado em branco na aorta representa a caixa deslizadora (gliding box) que percorre a aorta pixel a pixel analisando-a.

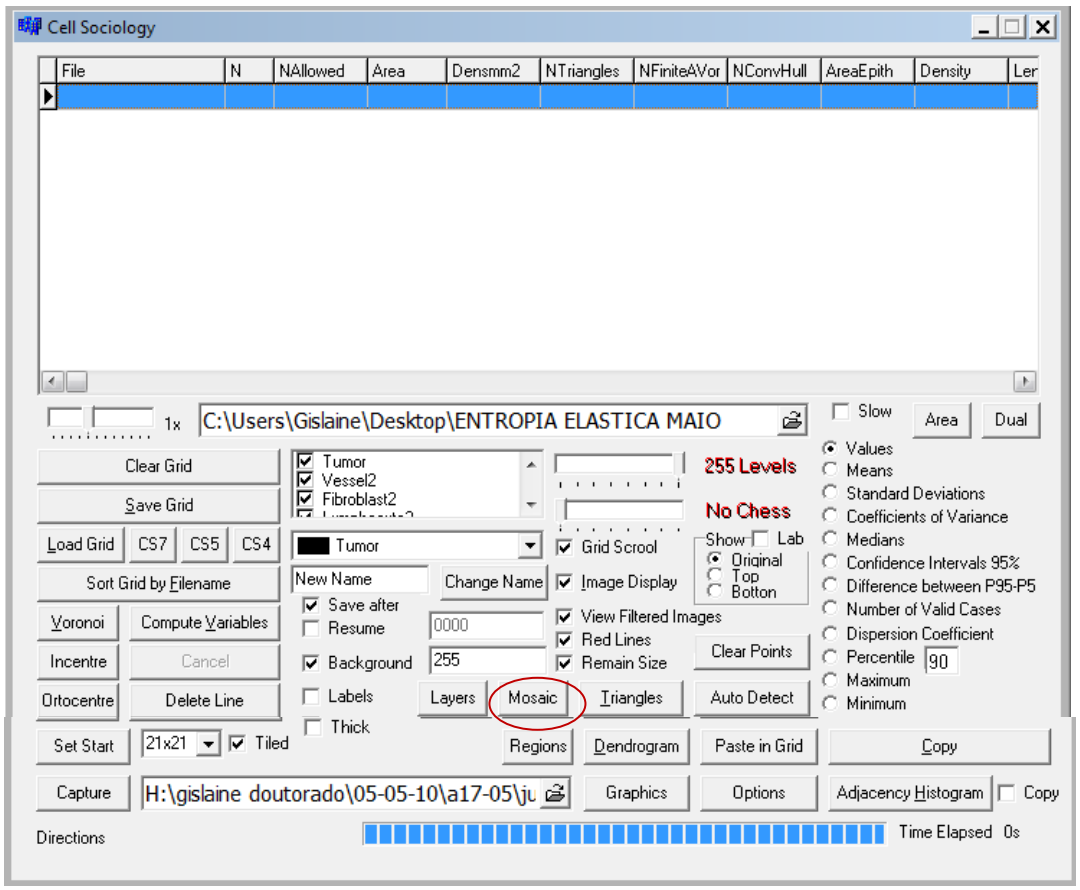

Figura 6: Programa *Cell Sociology*.

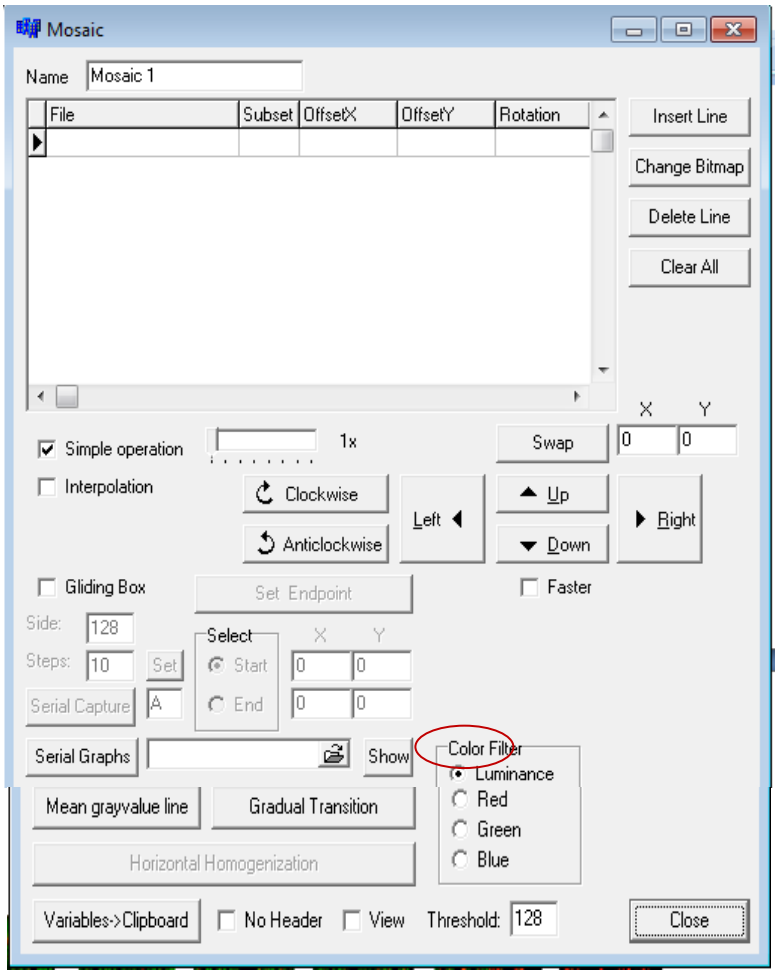

Figura 7: Programa *Cell Sociology*: Mosaico: Color Filter: permite análise de imagens adquiras simultaneamente, separando-as por canais de cores.

Para a análise das imagens usamos para cada sinal, fluorescência ou SHG, somente as escalas de cinza. A ausência de luz corresponde ao nível zero e o brilho intenso 255. Esta é a escala perceptivelmente uniforme em relação à visão humana em cores (Van der Wouver, 2000).

As características da textura calculadas de acordo com Haralick et al, 1973, foram: Entropia, homogeneidade local e segundo Momento Angular, inseridas no programa Cell Sociology. Das imagens transformadas, são extraídos níveis de cinza (luminância) de cada pixel (menor elemento que compõe a imagem) (Figura 9) e construída uma matriz de co-ocorrência que é uma matriz simétrica em relação a sua diagonal principal, onde cada elemento na posição i (linha), j (coluna) indica o número de vezes que um pixel com nível de cinza i tem um vizinho com nível de cinza j (figura: 10 e 11), semelhante a um histograma bidimensional.

$$(i; j) = \frac{p(i; j)}{R}$$

Onde:

R é o numero total de pares de pixels utilizados para se construir a matriz de co-ocorrência.

A

B

	3	0	0	3	1		
	1	4	6	6	5		
	0	2	3	1	3		
	4	3	0	4	6		
	2	5	6	2	2		

	0	1	2	3	4	5	6
0	1	0	1	1	1	0	1
1	0	0	0	1	1	0	0
2	0	0	1	1	0	1	0
3	2	2	0	0	0	0	0
4	0	0	0	1	0	0	2
5	0	0	0	0	0	0	1
6	0	0	1	0	0	1	1

Figura 8 **A**: Exemplo de imagem transformada em níveis de cinza. **B**: matriz de co-ocorrência formada a partir da luminosidade extraída de cada pixel.

Descritores extraídos da matriz de co-ocorrência Haralick

Entropia: mede o número de transições entre os diferentes graus de cinza na imagem. (Kayser et al, 2007). A entropia mede o grau de desorganização de fibras, regiões da aorta onde há maior homogeneidade há menores valores de entropia e regiões muito heterogêneas há maiores valores.

$$\text{Entropia} = -\sum_i \sum_j p(i, j) \log_2 p(i, j)$$

Onde: ∑=somatória
p(i; j) = representa a probabilidade de ocorrer um pixel com nível de cinza i vizinho com um de nível de cinza j.

Homogeneidade local: mede a homogeneidade da imagem.

$$\text{Homogeneidade local} = \sum_i \sum_j \frac{1}{1+(i-j)^2} p(i, j)$$

Segundo Momento Angular: representa a suavidade da imagem (Theodridis e Koutroumbas, 2006); valores maiores mostram as variações abruptas de brilho da imagem.

$$\text{Segundo Momento Angular} = \sum_i \sum_j (p(i, j))^2$$

Além das características extraídas da matriz de co-ocorrência Haralick, utilizou-se a IOF, fractal Sarkar (para comparação da imagem corado com picrossirius e sinal SHG) e Transformada de Fourier.

IOF: Fluorescência ótica integrada, é a soma da fluorescência integrada extraída de cada pixel.

$$IOF = \log F/Fo$$

F= fluorescência de cada pixel
Fo = Threshold

Fractal Sarkar: utilizada para correlacionar a distribuição do colágeno, a partir da fluorescência do picrossirius e a geração do SHG. A fractalidade está presente quando características semelhantes podem ser encontradas independentemente do aumento da imagem. Utilizamos a dimensão fractal (FD) que representa o nível de irregularidade de um fractal, e a sua "goodness of fit" (taxa de ajuste da dimensão fractal da fluorescência do picrossirius ao fractal ideal – R^2) após transformação pseudo-3D (METZE, 2009; BEDIN, 2010), foi usada a correção a 45 graus ($R^2$45) segundo Albregtsen, 2009. O R^2 é um importante critério de fractalidade e é definido como uma estimativa da "qualidade do fractal". O R^2 pode ser interpretado como uma medida da rugosidade da superfície da imagem (Adam, 2006)

Transformada Rápida de Fourier (FFT):

Após transformação das imagens em 255 níveis de cinza, (variando do zero, ou seja, ausência de luz até 255, brilho intenso) a mesma foi processada no programa Fourier Detect, também desenvolvido pelo Dr Adam Luis Randal, Adam.

A FFT transforma informações da imagem em períodos e frequências que são representados no espectro de Fourier. Estes dados podem ser usados principalmente para análise de imagens bidimensionais como é o caso da imagem histológica (Adam, 2002). A frequência espacial é a medida que expressa o ritmo das alterações de brilho (ou seja, variações dos níveis de cinza entre 0 a 255) que ocorrem numa sequencia de pontos em uma dada direção na imagem. Altas frequências espaciais correspondem à intensidade de brilho que variam rapidamente, baixas frequências representam variações lentas. A distribuição das frequências descrevem a periodicidade da imagem e as interferências direcionais. As características de textura de Fourier podem ser calculadas a partir das distribuições das frequências em diferentes regiões do espaço transformado.

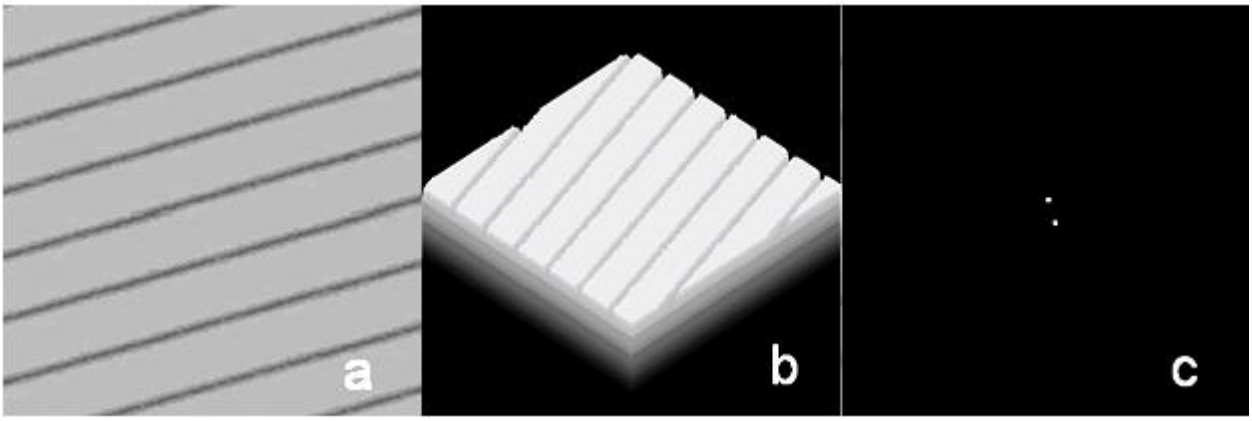

Figura 9 (1): Imagem original com ondas diagonais (a), representação pseudo-tridimensional (b), imagem transformada como espectro de Fourier, (c) um par de pixels representam um onda da imagem original. Imagens gentilmente cedidas por: Dr. Randall Luis Adam.

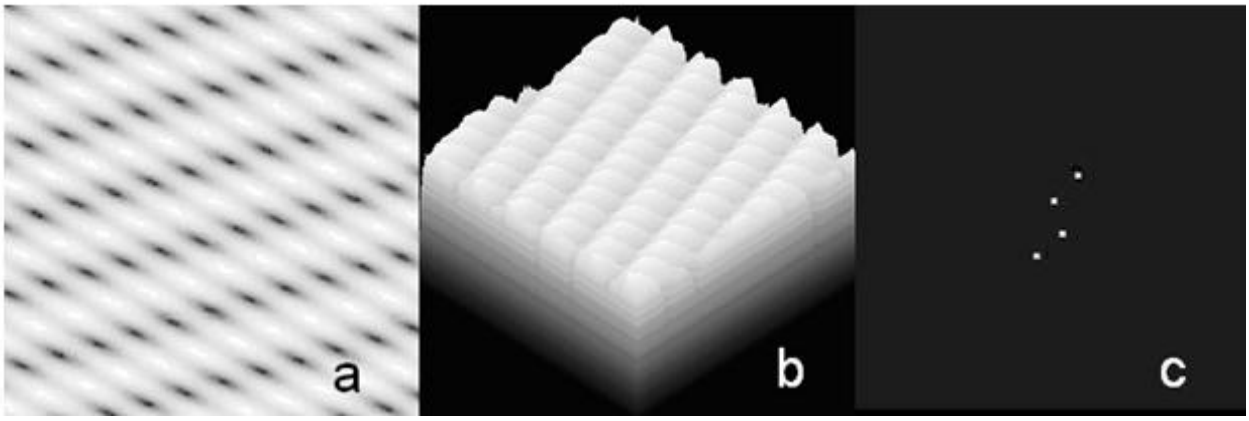

Figura 9 (2): Imagem original com duas ondas diagonais (a), representação pseudo tridimensional (b) e como espectro de Fourier (c) dois pares de pixels representam 2 ondas na imagem original. Imagens gentilmente cedidas por: Dr. Randall Luis Adam.

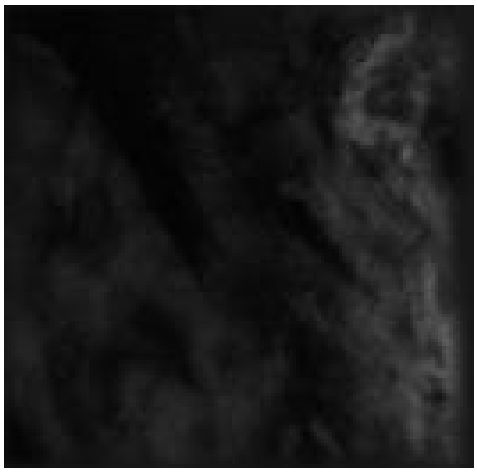

Figura 10: Imagem original em diferentes níveis de cinza.

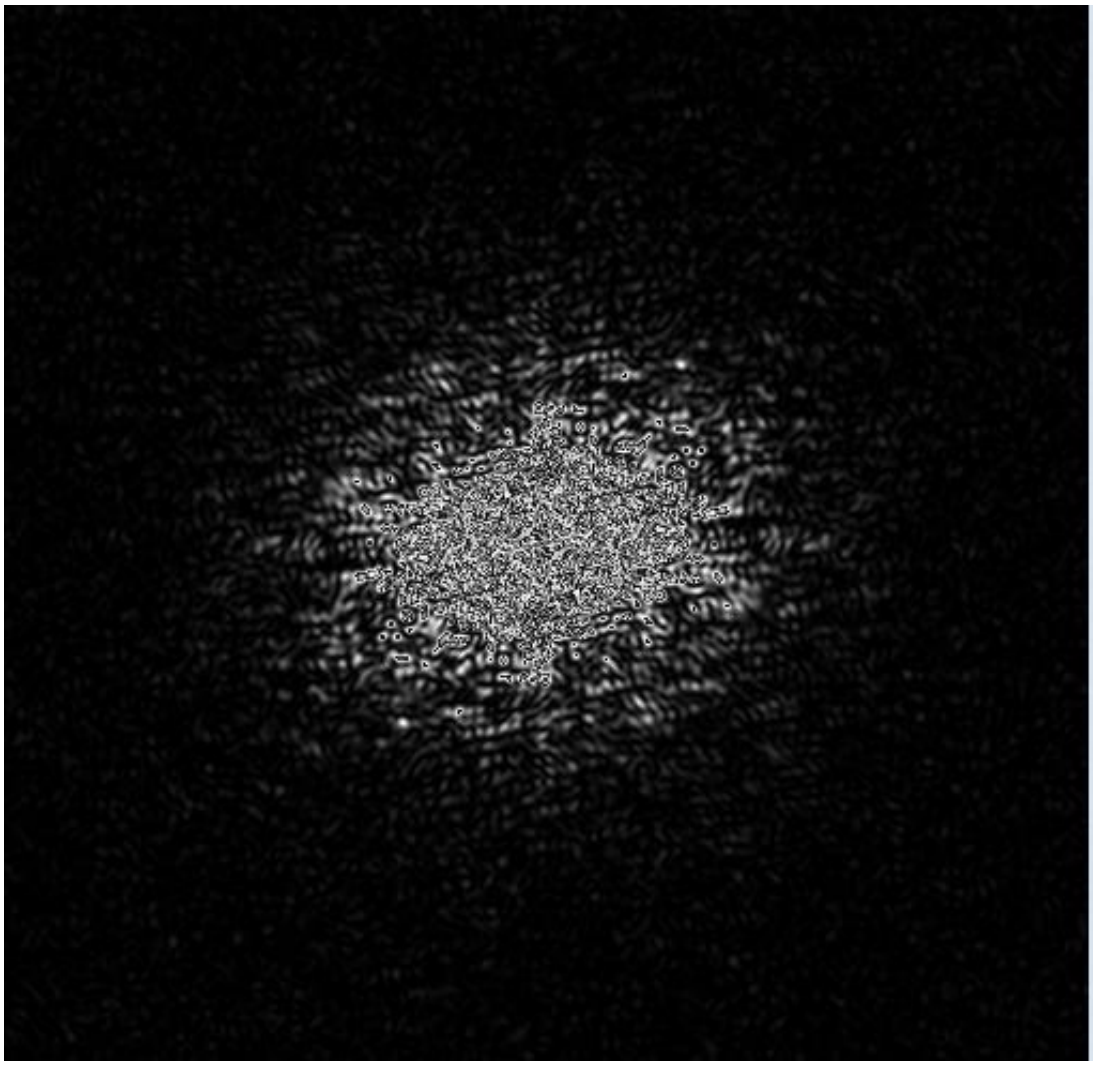

Figura 11: Espectro de Fourier: imagem transformada da figura anterior, dois pares de pixels representam duas ondas na imagem original.

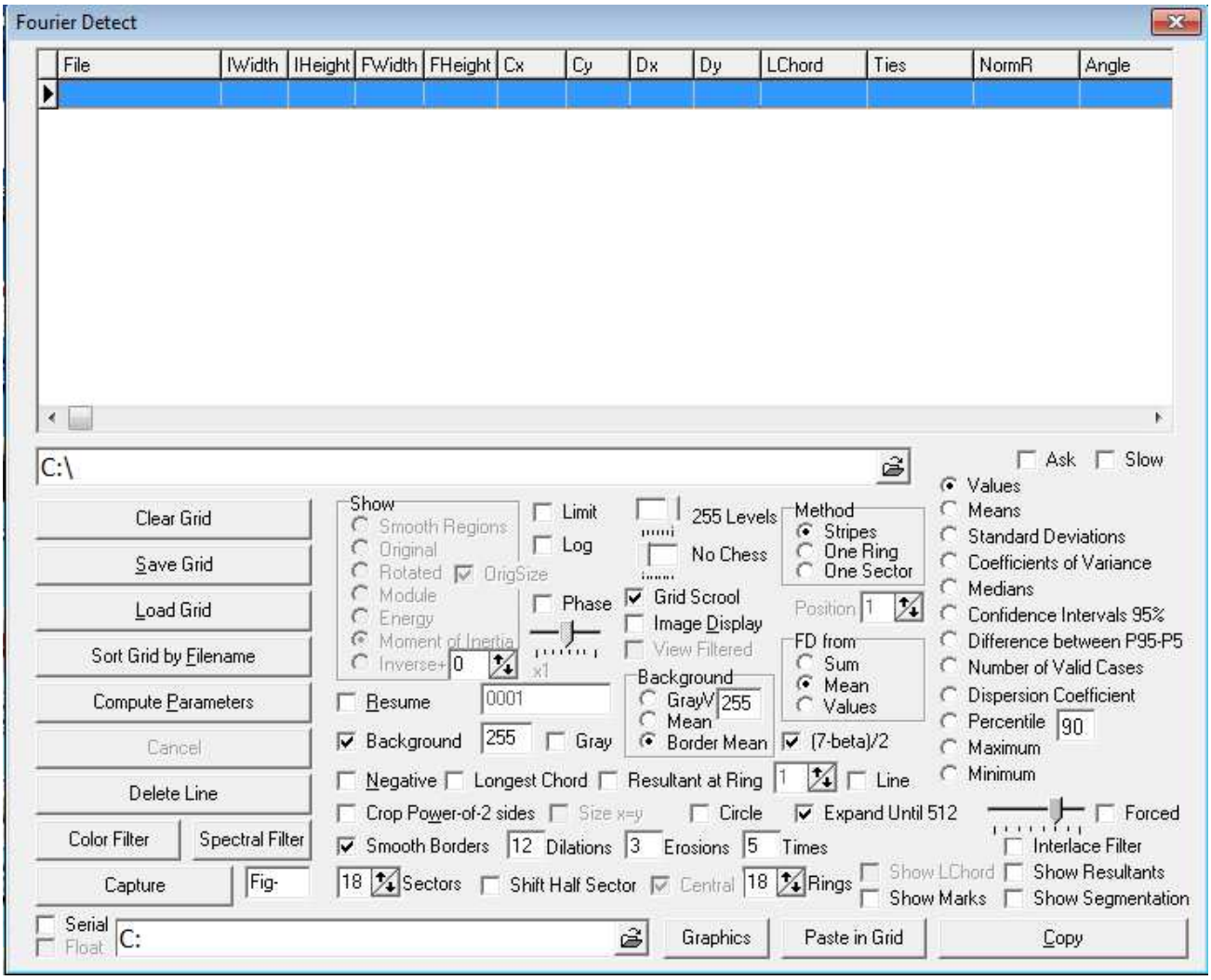

Figura 12: Programa *Fourier Detect*, programa permite análise de ondulações da imagem tanto na horizontal como na vertical.

A partir da imagem transformada criou-se uma imagem pseudotridimensional, no sentido horizontal representado o nível de cinza (luminância) de cada *pixel,* com a altura de um eixo-z, interpretando o resultado de muitas funções harmônicas sobreposta. Cada onda da figura original foi transformada, utilizando o algoritmo FFT, em um par de pixels na imagem transformada, com pontos simétricos ao centro da imagem FFT. O vetor formado entre os dois pontos representa a direção da função harmônica e a distância da periferia ao centro da imagem transformada. Com isso, a função harmônica na imagem original é representada por um par de pixels (simétrico ao ponto central) na imagem FFT.

Para obter informações úteis calculamos os valores de amplitudes das ondas harmônicas que construíram a imagem microscópica. Regiões com altas amplitudes são equivalentes a um padrão de textura repetitivo.

A imagem transformada detecta padrões de variação de luminância da imagem original, que se repetem em uma dada direção na imagem original. Um padrão que se repete a cada n *pixels* resultará num ponto intenso (função harmônica com grande amplitude), situado a N=L/n *pixels* de distância do centro, sendo L o número de *pixels* do lado da imagem transformada. Uma forma de se detectar padrões de repetição dentro de uma imagem transformada, diminuindo-se a quantidade de variáveis a serem testadas, é somar a amplitude das funções harmônicas em cada região da imagem transformada.

A FFT permite analisar cada imagem em anéis e setores (figura 11), sendo que os anéis representam texturas onduladas com ondas espaciais definidas conforme tabela abaixo, onde os valores foram adaptados para imagens adquiridas com resolução de 0,54 micras por pixel.

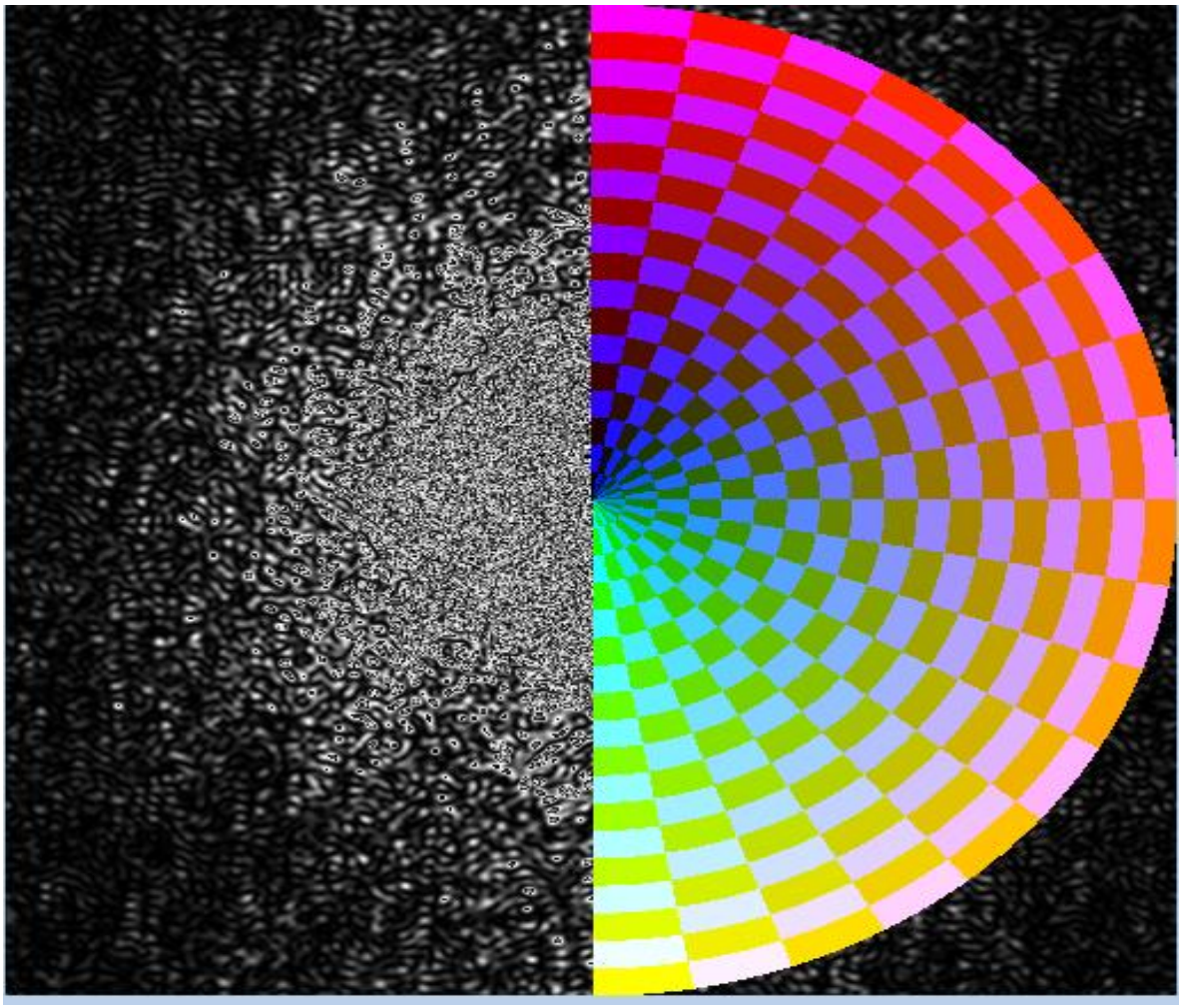

Figura 13: Esquerda: imagem transforma. Direita: espectro de Fourier, mostrando anéis e setores.

Tabela 1: Frequências espaciais em micras por anel.

Anéis	Frequências micras
1	9,73 á 19,46
2	6,49 á 9,73
3	4,86 á 6,49
4	3,89 á 4,86
5	3,24 á 3,89
6	2,78 á 3,24
7	2,43 á 2,78
8	2,16 á 2,43
9	1,94 á 2,16
10	1,77 á 1,94
11	1,62 á 1,77
12	1,49 á 1,62
13	1,39 á 1,49
14	1,29 á 1,39
15	1,21 á 1,29
16	1,14 á 1,21
17	1,08 á 1,14
18	1,08

Além da análise por anéis, é possível rastrear a direção espacial das ondulações tanto no sentido horizontal como vertical. Para isso, a imagem da aorta foi dividida em 18 setores, cada um equivalente a 10 graus, o primeiro setor resume a soma de ondulações no eixo horizontal, o

segundo, ondulações entre 10 e 20 graus, e assim sucessivamente. O setor oito e nove corresponde às direções entre 80 e 100 graus, o que equivale à análise no eixo vertical.

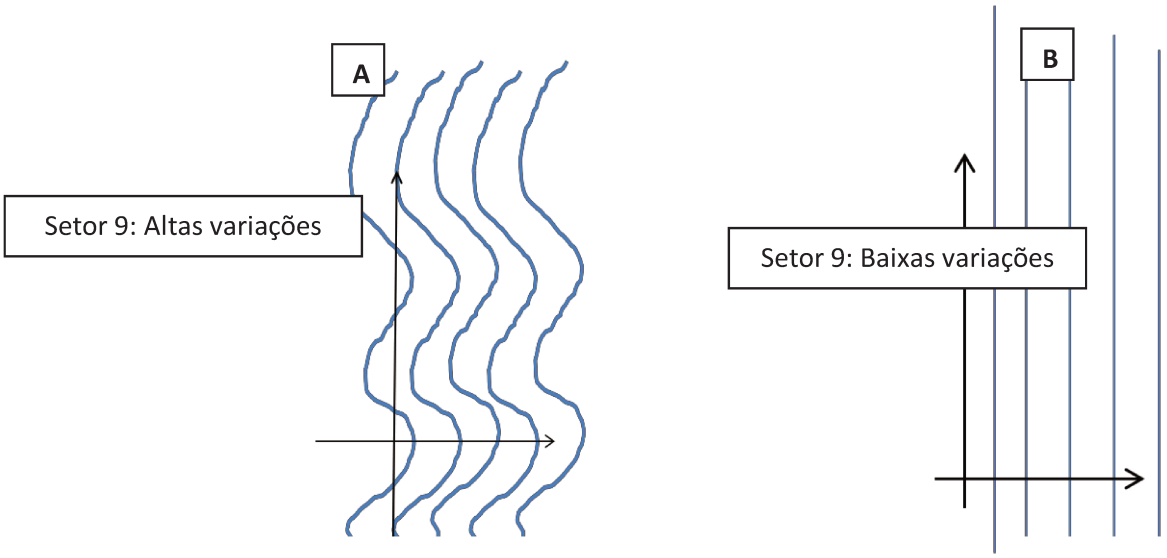

Figura 14: A: Imagem com altas frequências no setor nove (vertical), e consequentemente altas variações. B: Setor nove: baixas frequências: poucas variações.

As informações que se pode extrair das imagens FFT são muitas, energia de 18 anéis, setores e quocientes entre eles, então, utilizamos análise multivariada associado com rotação quartemax para determinar o grau de associação entre as variáveis extraídas do espectro de Fourier. A rotação pelo método quartemax, rotaciona um fator inicial de modo que uma variável tenha peso alto em um fator e peso tão baixo quanto possível em outros fatores, com isso permite simplificar o número de variáveis utilizadas. (Hair et al, 1998).

Tanto para análise de fibras elásticas e colágenas utilizamos o quociente entre setor 9/1(razão entre as frequências extraídas na horizontal e vertical) e anel 18, (frequências de até 1,08μ).

Obervamos a arquitetura da aorta começando na íntima, definido como ponto 0%, em direção à adventícia. A última fibra muscular marca o fim da camada média, definido como ponto 100%.

Comparação de regiões da aorta corada com picrosirius e sinal SHG:

Comparamos as imagens de picrosirius, rotineiramente utilizada para coloração de colágeno, com as imagens do sinal SHG. Para tanto, com o auxilio do *gliding box*, selecionamos pequenas regiões da imagem (1x1, 2x2, 4x4, 8x8, 16x16, 32x32, 64x64, 128x128 em pixels) e comparamos as mesmos áreas em ambas as imagens, registrando a fluorescência óptica integrada, bem como variáveis que descrevem a fractalidade (R^2 e FD) e a entropia. P

Através da correlação de Pearson foi investigada se a fluorescência óptica integrada do picrosírius juntamente com as alterações da arquitetura do colágeno pode explicar a intensidade dos valores integrados ópticos do SHG.

Análises estatísticas:

- ✓ Os dados foram calculados usando média e desvio padrão.
- ✓ As variáveis da textura foram comparadas entre os grupos por análise de variância ANOVA e por Kruskal Wallis (nível de significância $p<0,05$).

- ✓ Análise da textura comparando a metade externa com a interna de cada aorta por teste T dependente. (nível de significância $p<0,05$).
- ✓ A correlação de Pearson foi calculada comparando variáveis da textura e idade.
- ✓ Análise Fatorial: para medir o grau de associação entre as variáveis extraídas do espectro de Fourier. Rotação pelo método quartemax para melhor separação entre os fatores.
- ✓ As análises foram feitas no Programa Winstat 3.1 e uma parte dos gráficos no Excel 2007.

RESULTADOS

Resultados

Participaram deste estudo 72 pacientes: 22 normotensos, idade média 35,36 (± 12,17: maior idade17 e menor 59 anos), 38 pacientes com hipertensão, idade média: 40,8, (± 16,9; de18 a 78 anos), 12 aortas de pacientes que sofreram dissecção, idade média 50 anos (± 10, 9; de(33 a 69 anos).

Comparação de regiões da aorta corada com picrosirius e sinal SHG:

Adquirimos imagem de cinco aortas coradas com picrossirius e da mesma região fizemos uma imagem com sinal SHG (figura 15). Em seguida foi realizada, de cada aorta em diferentes tamanho da janela do glinding Box, correlação de Person entre o sinal SHG e fluorescência óptica integrada do picrosirius (tabela 2). Observamos que as correlações entre a fluorescência óptica integrada do picrosirius e o sinal de SHG, melhoram com o aumento tamanho da janela do *gliding Box*. A adição de variáveis de textura, entropia dimensão fractal (FD) e $R^2$45, em vários modelos multivariados aumentou substancialmente os coeficientes de determinação R, como pose ser observado na tabela 3.

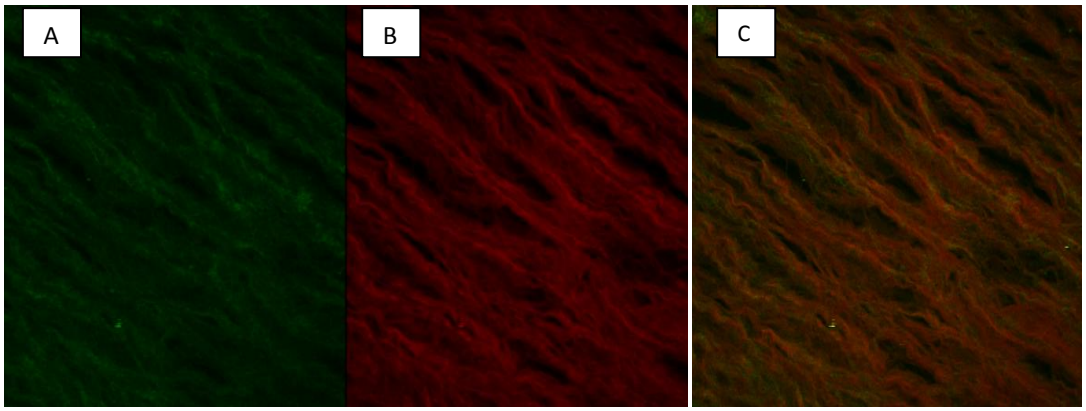

Figura 15: Imagens adquiridas no microscópio confocal multifóton. A: imagem de colágeno emitida pelo SHG. B: mesma imagem corada com picrosirius. C: sobreposição das duas imagens.

Tabela 2: Coeficiente de correlação de Pearson entre fluorescência do picrossirius e sinal SHG.

Gliding box	1x1 r	2x2 r	4x4 r	8x8 r	16x16 r	32x32 r	64x64 r	128x128 r
aorta 1	0,11892	0,12505	0,39267	0,30074	0,3716	0,36064	0,7951	0,73151
aorta 2	0,33987	0,45344	0,34476	0,3223	0,42008	0,57966	0,64191	0,8443
aorta 3	0,67677	0,70658	0,69311	0,68204	0,73738	0,81271	8,70E-01	0,93188
aorta 4	0,60871	0,64364	0,70217	0,79862	0,81452	-0,33801	0,97711	0,65536
aorta 5	0,62746	0,74802	0,80736	0,88557	0,94265	0,96112	0,91452	0,96522
Total	0,474346	0,535346	0,588014	0,597854	0,657246	0,475224	0,839728	0,825654

Tabela 3: Coeficiente de correlação linear múltipla entre fluorescência sinal SHG x picrossirius, entropia, R^2 e FD .

Gliding box	32x32 R	128x128 R
aorta 1	0,56	0,89
aorta 2	0,87	0,96
aorta 3	0,97	0,98
aorta 4	0,88	0,96
aorta 5	0,98	0,93
Total	0,852	0,944

As figuras 16 e 17 mostram imagem da espessura da aorta acompanhada do gráfico que representa a distribuição de fibras elásticas e colágenas. O verde representa fibras elásticas e o vermelho sinal SHG. Para comparações dentro de cada aorta, dividiu-se a camada média em duas partes: interna, próxima à íntima e externa próxima à adventícia.

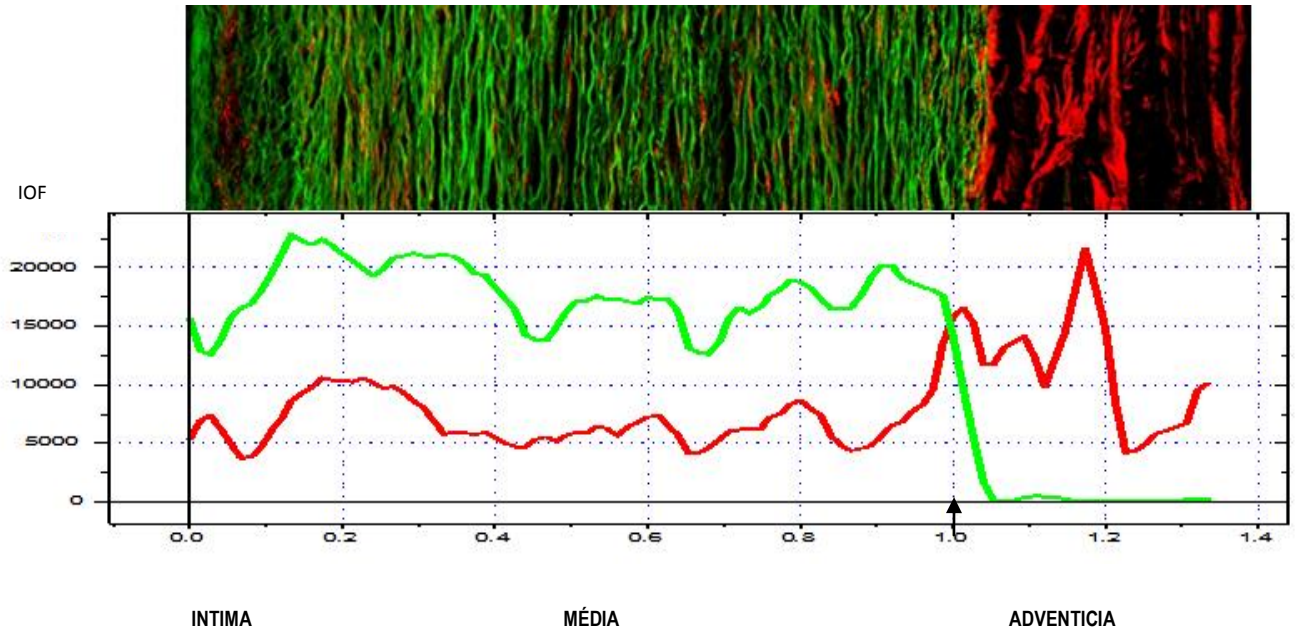

Figura 16: Espessura da aorta de individuo normotenso. Verde: Fluorescência da eosina em fibras elásticas. Vermelho: geração de segundo harmônico (SHG) em fibras colágenas. A seta indica a transição entre camada média e adventícia.

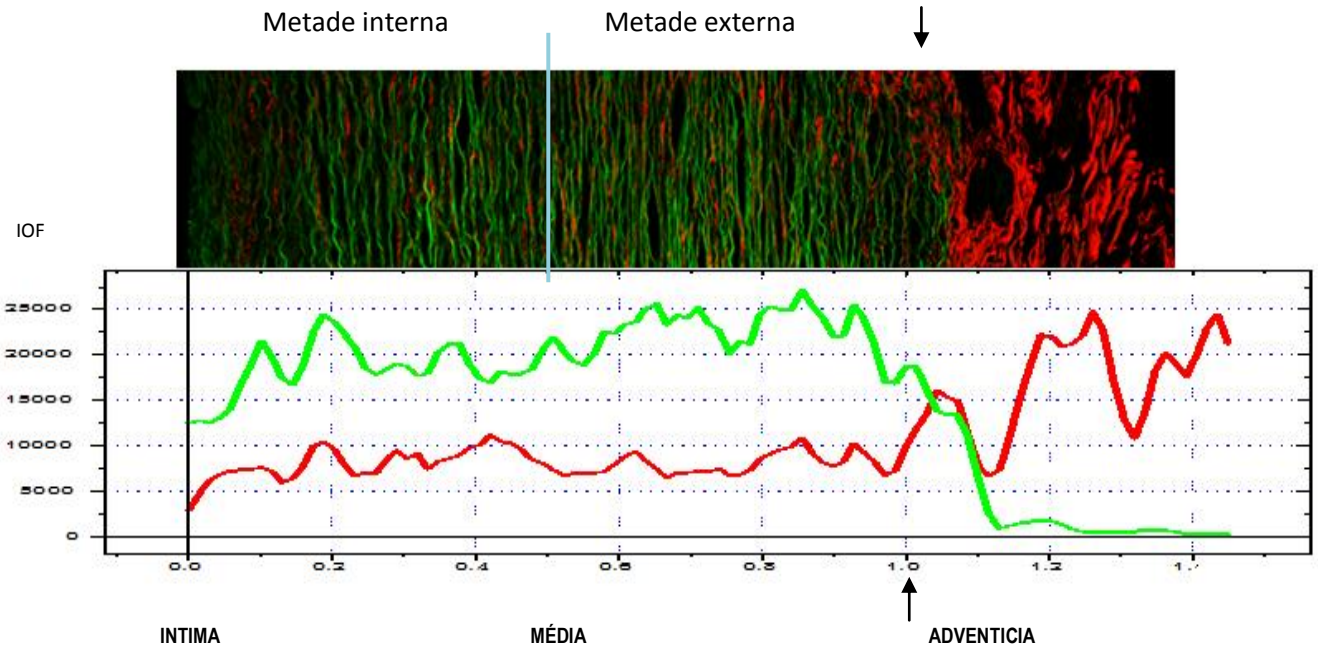

Figura 17: Espessura da aorta de individuo HAS. Verde: Fluorescência da eosina em fibras elásticas. Vermelho: geração de segundo harmônico (SHG) em fibras colágenas. A seta indica a transição entre camada média e adventícia.

Fibras elásticas

Tabela 4: variáveis da textura

	Normotensos	HAS	Dissecção	*Analise de variância*
IOF	14186,9 (±7829,58)	15395,9 (±8442,96)	758,0362 (±112,129)	*p<0,0001*
Homogeneidade Local	0,31 (± 0,08)	0,26 (±0,08)	0,31 (±0,13)	*p =0,09*
Segundo Momento Angular	0,088 (±0,09)	0,064 (±0,05)	0,025 (±0,01)	*p =0,007*
Entropia	12,7 (±0,57)	12,9 (±0,61)	9,7 (±1,9)	*p<0,01*

Unidades não definidas.

Analisamos a distribuição das fibras elásticas nos três grupos de pacientes utilizando fluorescência óptica integrada, O teste post-hoc (LSD) mostrou diferença entre o grupo dissecção x normotensos e dissecção x HAS.

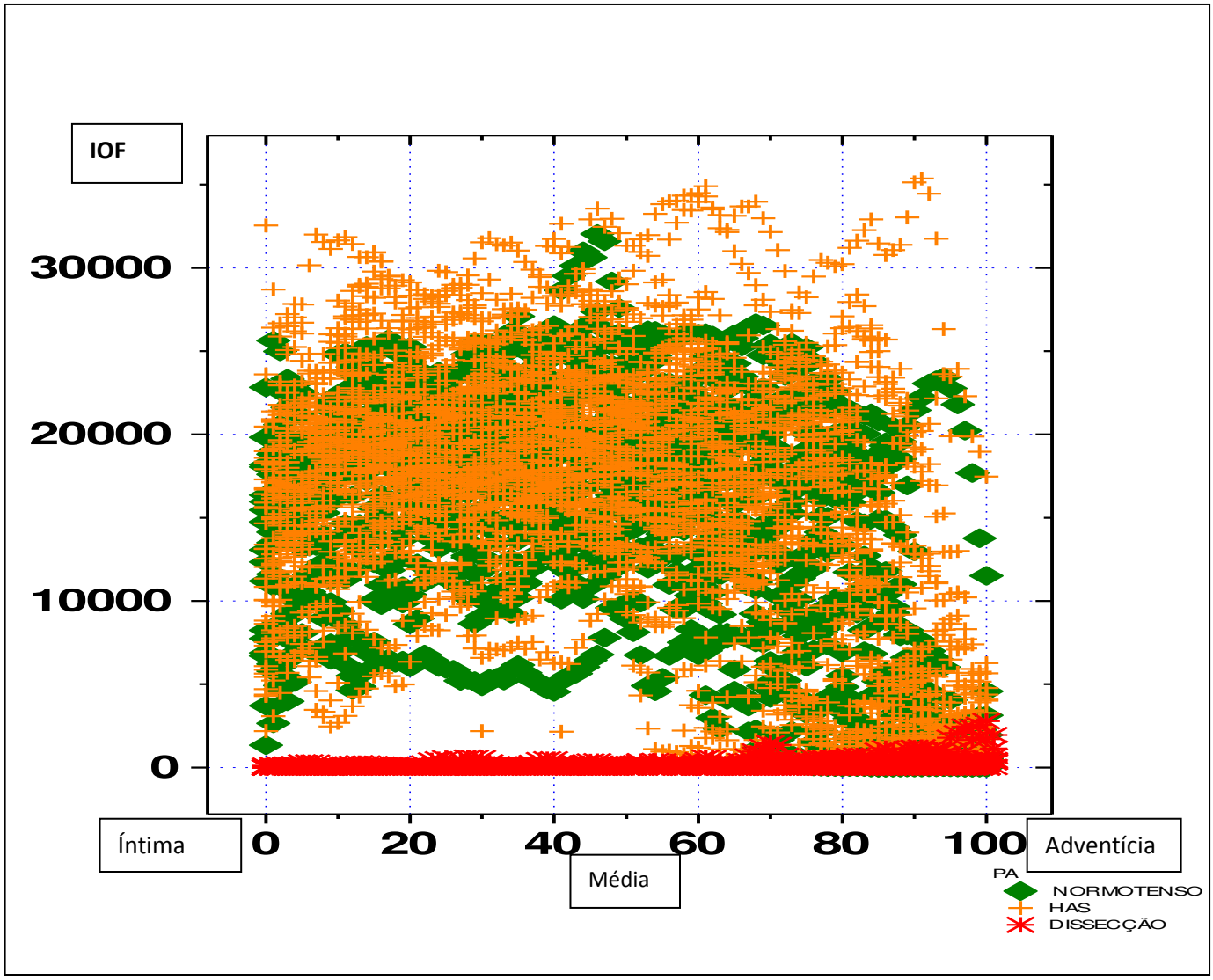

Figura 18: Distribuição da fluorescência emitida pela eosina (corante de fibras elásticas) na aorta de normotensos (verde) HAS (laranja) e dissecadas (vermelho).

Com o intuito de descrever a magnitude do sinal SHG na camada media de cada aorta, percorremos toda a espessura da média, partindo da íntima em direção à adventícia, e correlacionamos através da correlação de Pearson, a intensidade do sinal com a espessura da camada, valores da reta positivos significam aumento da intensidade de sinal próximo a adventícia valores negativos significam diminuição. Plotamos o resultado (r) encontrado em cada aorta e correlacionamos com a idade.

Observamos que com a idade, nos indivíduos normotensos, ocorre diminuição deste sinal em direção à adventícia (r =-0,49 r^2=0,23; p=0,01), porém no grupo HAS este fenômeno não ocorreu (r=0,064; r^2=0.0049 p=0,34). Figura 19 e 20.

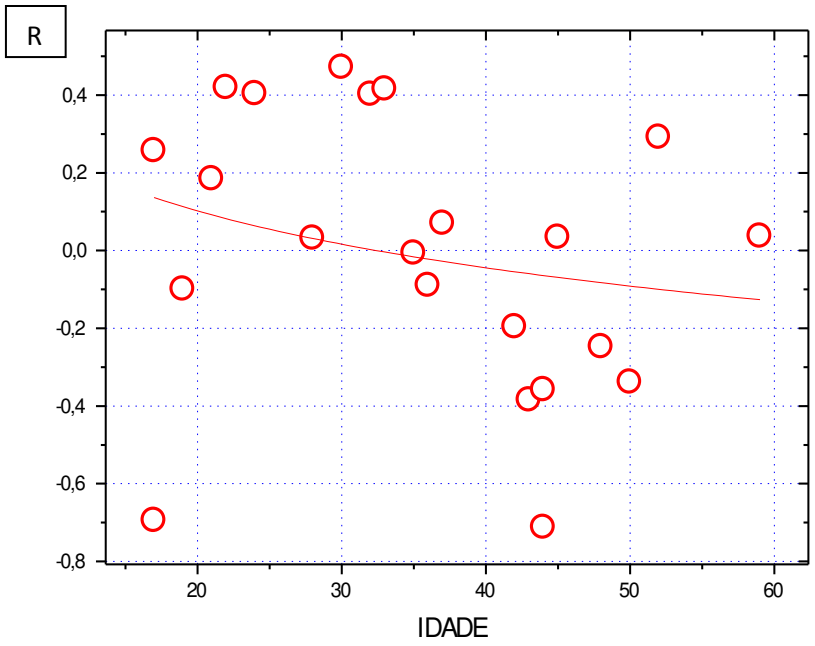

Figura 19: Ordenada Y: Coeficiente de correlação entre sinal de fluorescência e distancia da íntima em normotensos. Com a idade ocorre diminuição da intensidade do sinal. r =-0,49 r^2=0,23; p=0,01

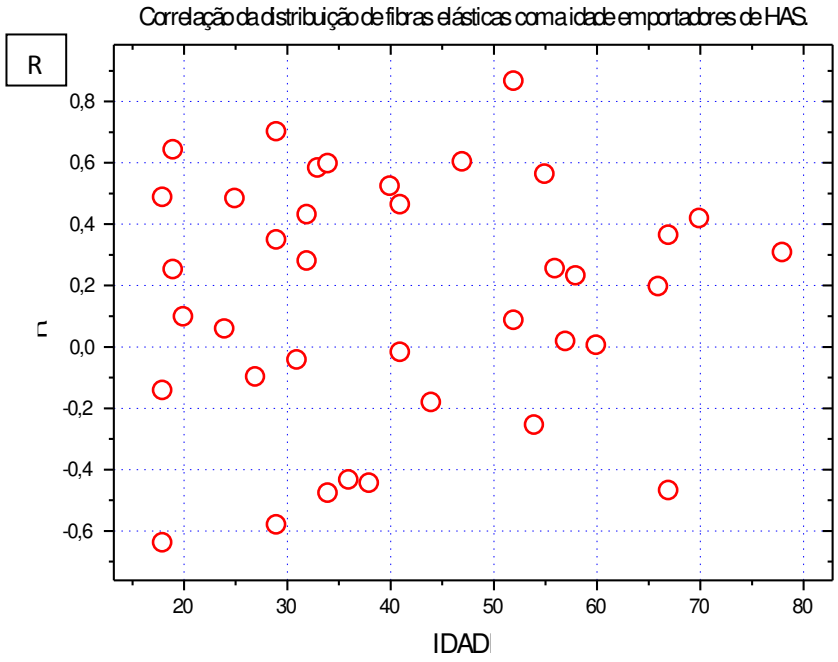

Figura 20 Ordenada Y: Coeficiente de correlação entre sinal de fluorescência e distancia da íntima em hipertensos. Não encontramos relação com a idade em HAS. r=0,064; r^2=0.0049 p=0,34

A tabela 5 mostra a IOF de fibras elásticas dentro de cada aorta, tanto nos grupos dos portadores de HAS como normotensos.

Tabela 5: Comparação da distribuição de fibras elásticas entre metade interna e externa da camada média.

	IOF média		
	Metade interna	Metade externa	
Normotensos	17.881 (±3320,14)	10.556,9 (±5123,20)	p<0,0001
HAS	18.730 (±24549,23)	11.888,2 (±5979,8)	p<0,0001
Dissecção	141,953	142,627	p=0,98

Metade interna: próximo à íntima; externa: próximo à adventícia. Unidade não definida.

Não houve diferença significativa na Homogeneidade Local entre os grupos, mesmo quando correlacionado com idade. No Segundo Momento Angular a diferença encontrada foi entre normotensos e dissecção; HAS e dissecção.

Plotamos os cem maiores valores da entropia e obervamos que, apesar da entropia não apresentar diferença significativa entre os grupos normotensos e HAS, os cem maiores valores estão localizados em regiões diferentes, conforme mostra os gráficos 24 e 25. O desvio padrão do grupo dissecção é alto quando comparado com os outros grupos, ($p<0,0001$).

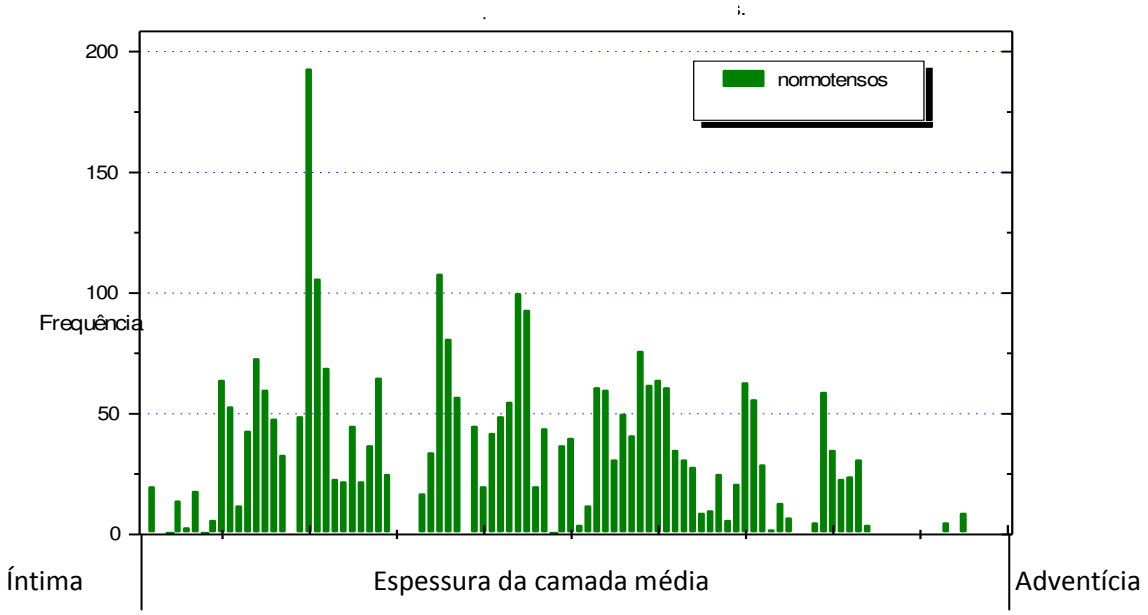

Figura 21. Fibras elásticas: Plotamos em cada aorta os cem pontos de maiores valores da Entropia. Nos pacientes normotensos os maiores valores concentram-se na transição do terço interno e médio.

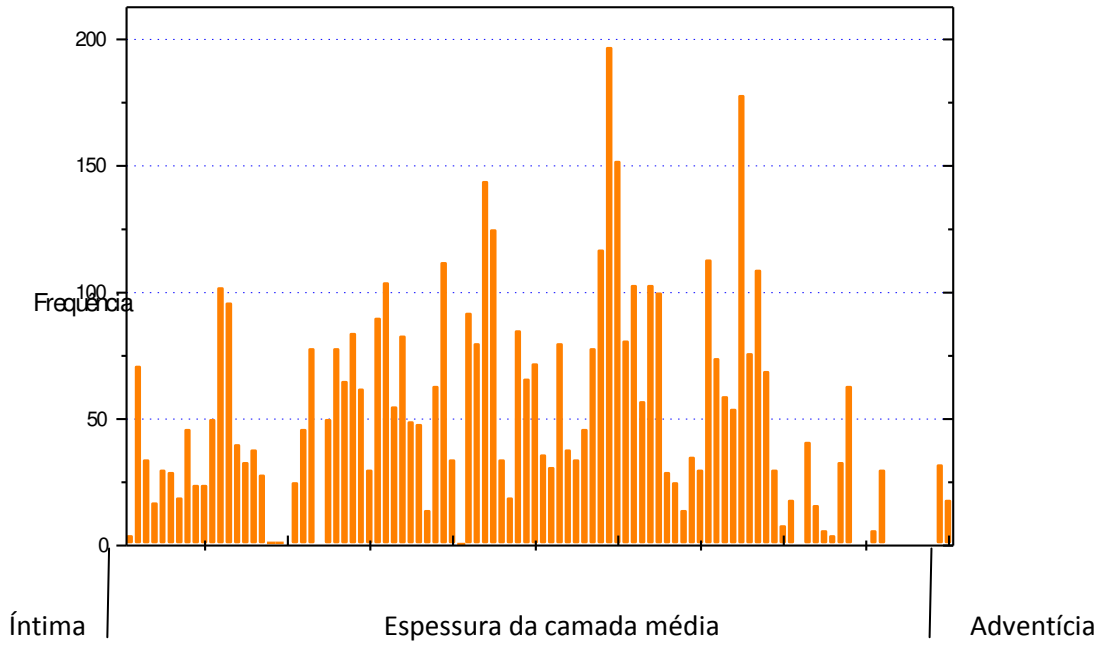

Figura 22. Fibras elásticas: Plotamos em cada aorta os cem pontos de maiores valores da Entropia. Nos portadores de HAS os maiores valores estão localizados no terço médio da camada média.

Variáveis extraídas do espectro de Fourier na análise de fibras elásticas:

A partir do espectro da imagem FFT é possível extrair diversas variáveis tais como: energia dos anéis de 1 à 18, energia dos setores e o quociente dos mesmos. Para não usarmos ferramentas que fazem a mesmas análises, calculamos o grau de associação das mesmas usando análise fatorial com rotação quatermax. Em anexo segue imagem do programa Winstat usado para realização deste procedimento e tabelas dos dados de todas variáveis extraídas da imagem FFT.

Os setores:

- ✓ 1 a 8: entraram em todos os casos no fator um.
- ✓ Quociente 9/1: entrou 16 vezes de 21 no fator três como fator único,

Os anéis:

- ✓ 5 a 18: 20 de 21 vezes no fator um.

- ✓ Quociente 3/18: entrou 15x de 21 no fator dois
- ✓ Quociente 4/18: entrou 13 vezes de 20 no fator dois

Tabela 6: Variáveis associadas extraídas das imagens FFT.

Fator 1	*Fator 2*	*Fator3*
Setor 1 a 8	Anel Quociente 3/18	Setor 9/1
Anéis 5 a 18		

Diante dos resultados obtidos na analise multivariada, utilizamos para análise da aorta o anel 18 (frequências de até 1,08 micras) e o quociente entre os setores 9/1, que representa a razão entre as somas das frequências extraídas na direção vertical e horizontal. A figura 26 mostra ondulações nos setores um e nove e a figura 23 a razão entre os dois setores.

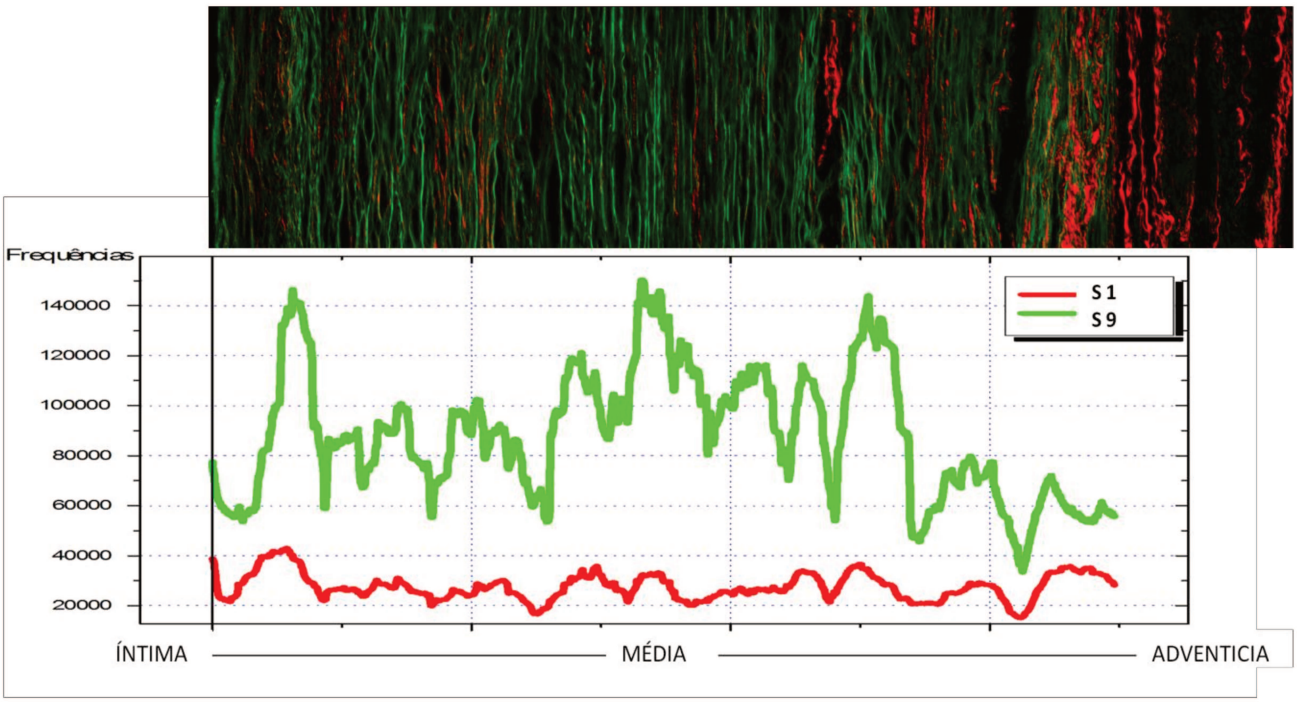

Figura 23: Análise de Fourier. Vermelho: Valores de frequências no setor um (S1): corresponde a ondulações no eixo horizontal. Verde: frequências no setor nove (S9: ondulações no eixo vertical).

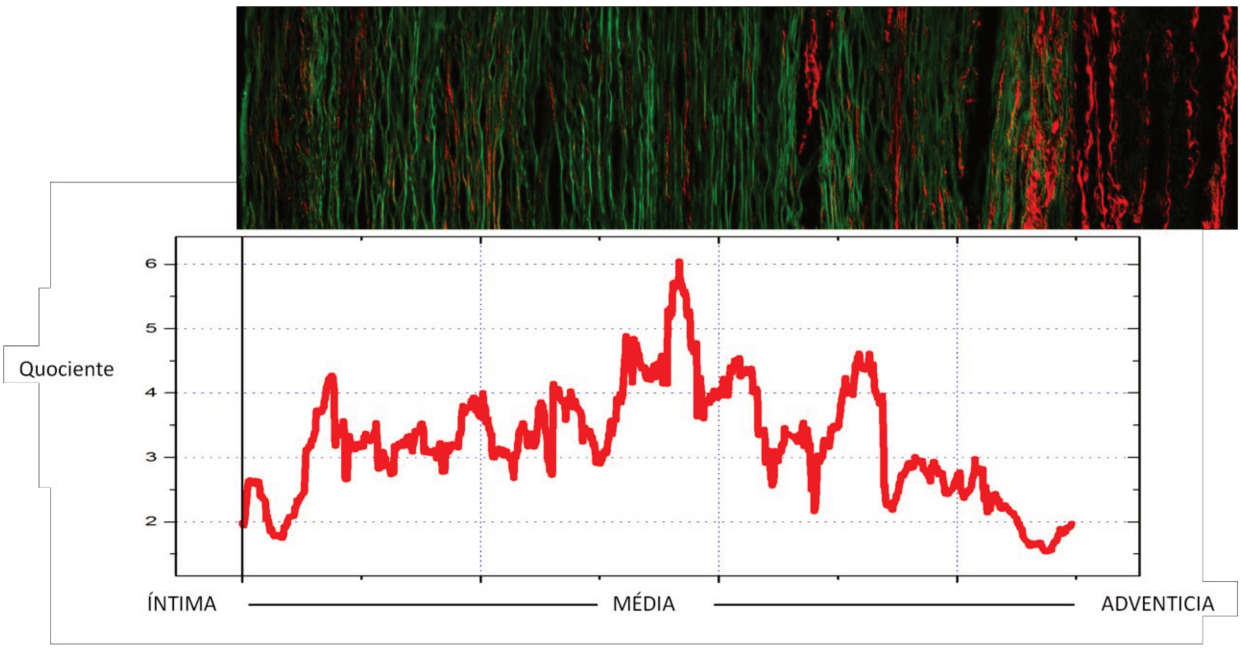

Figura 24: Análise de Fourier. Ondulações na imagem: quociente das frequências do setor nove e um.

Analisamos o quociente entre setores 9/1 e obervamos que a variância é maior nos indivíduos que sofreram dissecção, p=0,05. Em outras palavras, houve diferenças significativas no quociente entre a soma dos períodos espaciais da direção vertical e horizontal.

O grupo dissecção apresentou menores valores no anel 18 e maiores valores de variância no mesmo anel. Isso significa que o grupo dissecção tem diferente distribuição de estruturas neste anel, que corresponde aos períodos espaciais, comprimentos de onda, de até 1,08 µm. Plotamos para cada aorta, os cem pontos com maiores valores do quociente das energias dos setores nove e um, os gráficos abaixo mostram a localização destes pontos em normotensos (figura 25) e HAS (figura 27).

Tabela 7: Variáveis extraídas do espectro de Fourier utilizadas na análise de fibras elásticas:

	Normotensos	HAS	Dissecção	
Variância do quociente das energias dos setores 9/1	0,23 (±0,04)	0,20 (±0,05)	0,27 (±0,16)	*p*=0,05
Energia do anel 18 (frequência até 1,08 micras)	81696,6 (±25831,5)	85667,6 (±27129,2)	45685,0 (±21866,6)	*p<0,0001*
Variância da energia do anel 18	0,16014 (±0,05)	0,16313 (±0,03)	0,2708 (±0,1)	*p<0,0001*

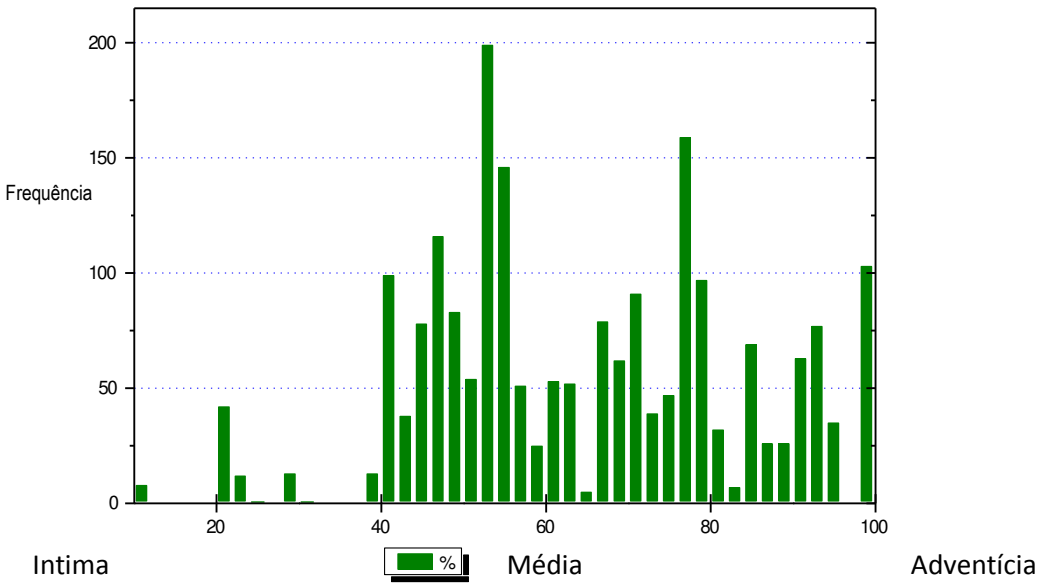

Figura 25: Análise de Fourier. Fibras elásticas: Plotamos para cada aorta, os cem pontos com maiores valores do quociente das energias dos setores nove e um em normotensos.

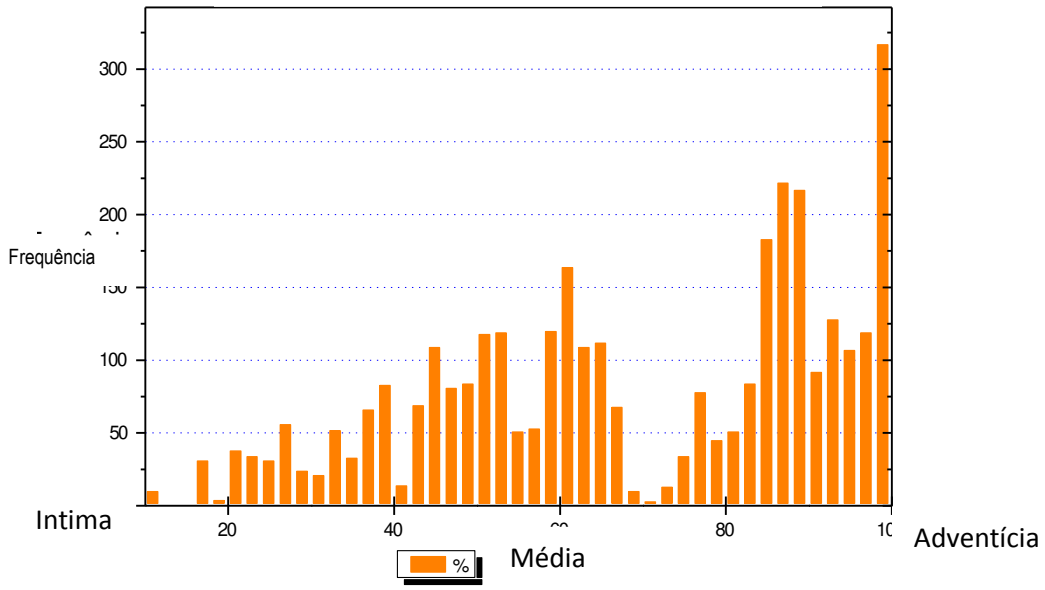

Figura 26: Análise de Fourier. Fibras elásticas: Plotamos para cada aorta, os cem pontos com maiores valores do quociente das energias dos setores nove e um em hipertensos.

Imunofluorescência

A distribuição do colágeno tipo I e III ao longo da espessura da aorta ocorre conforme figura 27 e 28.

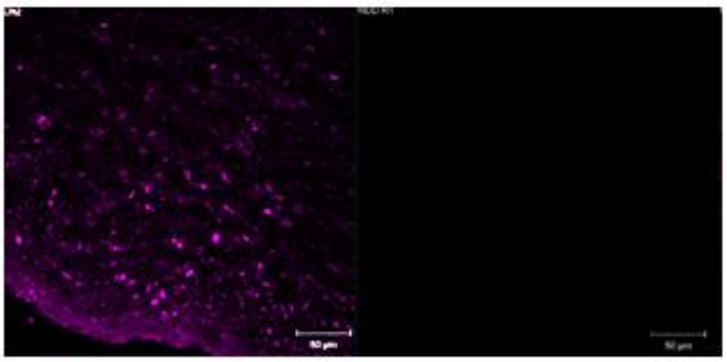

Figura 27: controle: Imunofluorescência da aorta. Esquerda: imagem marcada com anticorpo, direita: imagem negativa.

Imunofluorescência colágeno I

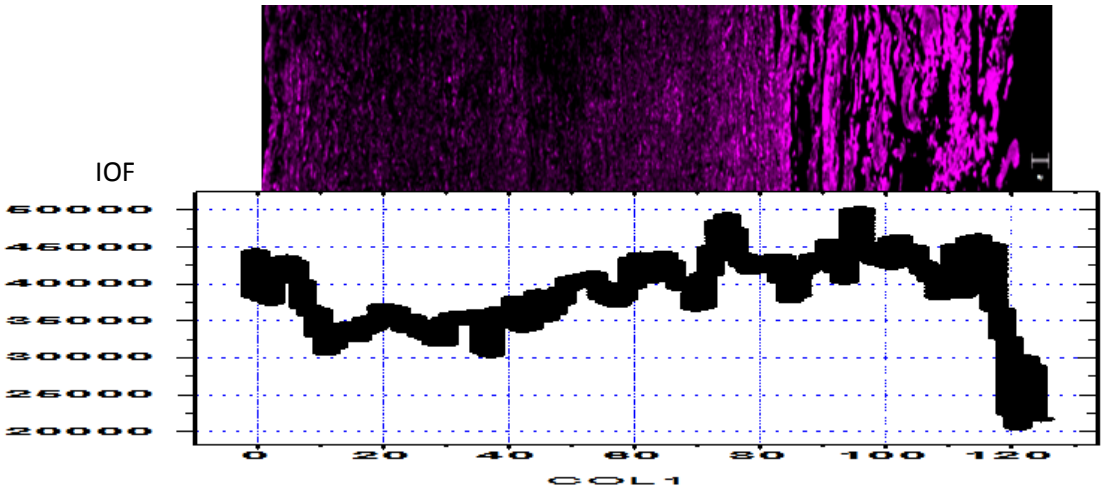

Figura 28: Distribuição do colágeno Tipo I ao longo da espessura da aorta.

Imunofluorescência colágeno III

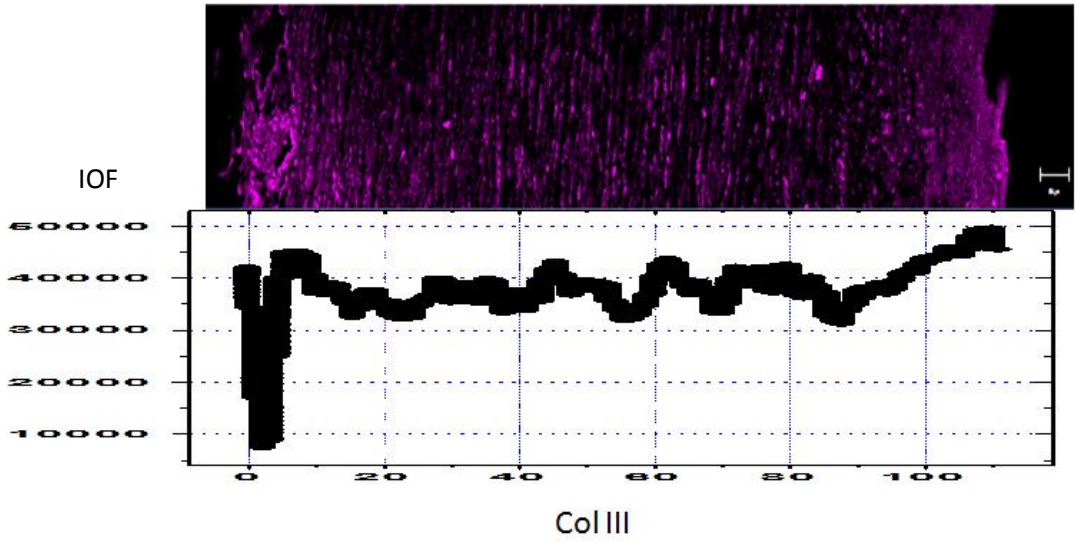

Figura 29: Distribuição do colágeno Tipo III ao longo da espessura da aorta.

As tabelas oito e nove mostram a distribuição da IOF do colágeno tipo I e III ao longo da espessura da média, tanto na aorta de normotensos como na de hipertensos. O colágeno tipo I foi maior na metade externa próximo á adventícia, o tipo III não apresentou diferença na distribuição na espessura da aorta.

Tabela 8: Distribuição do colágeno tipo I e III em indivíduos normotensos.

Normotensos	Metade		
Colágeno	IOF Interna	IOF Externa	
Tipo I	26799,6 (±10085,0)	33091,4 (±6699,44)	p=0,05
Tipo III	30108,5 (±9289,33)	28481,8; (± 12145,2)	p=0,46

Metade interna: próximo à íntima; externa próxima a adventícia.

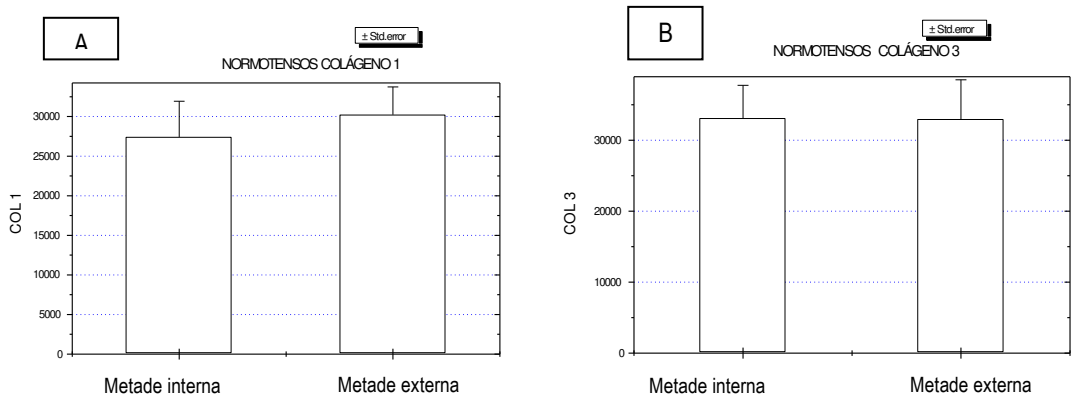

Figura30: A: IOF do colágeno tipo I B: IOF do colágeno tipo III em aorta de normotensos. Metade interna (próximo à íntima) e externa (próximo à adventícia).

Tabela 9: Distribuição do colágeno tipo I e III em indivíduos HAS.

HAS	Metade		
Colágeno	IOF interna	IOF externa	
Tipo I	30535,9 (±8154,69)	35840,9 (±9544,08)	p=0,01
Tipo III	30274,06 (±8.614,9)	31319,69(±9682,86)	p=0,5

Metade interna: próximo à íntima; externa próxima a adventícia.

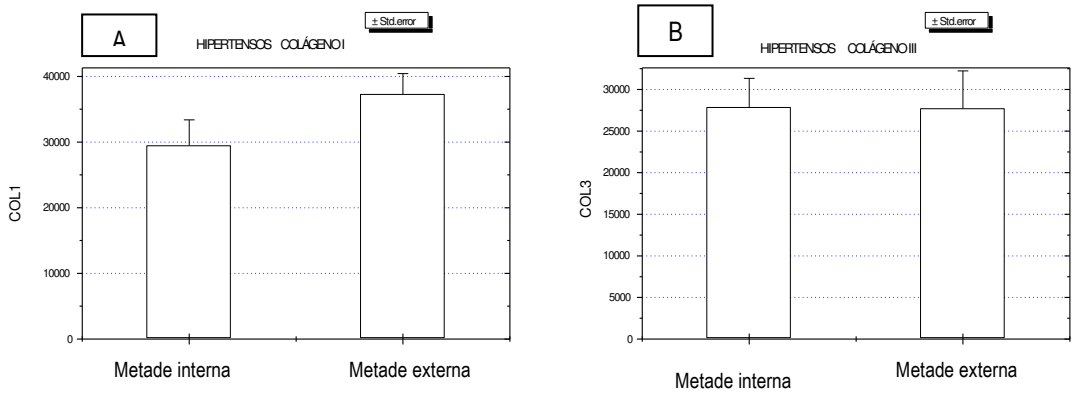

Figura 31 : A: IOF do colágeno tipo I B: IOF do colágeno tipo III em aorta de hipertensos. Metade interna (próximo à íntima) e externa (próximo à adventícia).

Na espessura da camada média, em sentido à adventícia, ocorre ponto de aumento do colágeno conforme tabe abaixo.

Tabela 10: Picos do colágeno na espessura da aorta.

Ponto de aumento do colágeno I	
Normotensos	99%
HAS	96,40%

Ponto de aumento do colágeno III	
Normotensos	99,50%
HAS	94%

Sinal SHG

Tabela 11: Variáveis da textura

	Normotensos	HAS	Dissecção	*p*
IOF	6.831,16 (±2953,40)	7.047,49 (±3291,29)	123,946 (±273,9)	<0,0001
Homogeneidade Local	0,56 (±0,13)	0,53 (±0,11)	0,452 (±0,06)	*0,07*
Segundo Momento Angular	0,31 (±0,13)	0,27 (±0,12)	0,177 (±0,07)	*0,02*
Entropia	10,1 (±1,6)	10,08 (±1,2)	6,65 (±1,7)	*0,001*

Analisamos a distribuição do sinal SHG emitido pelo colágeno nos três grupos de pacientes utilizando a IOF. As aortas dos indivíduos que sofreram dissecção, assim como nas fibras elásticas, tiveram uma redução brusca do SHG, conforme mostra o gráfico abaixo.

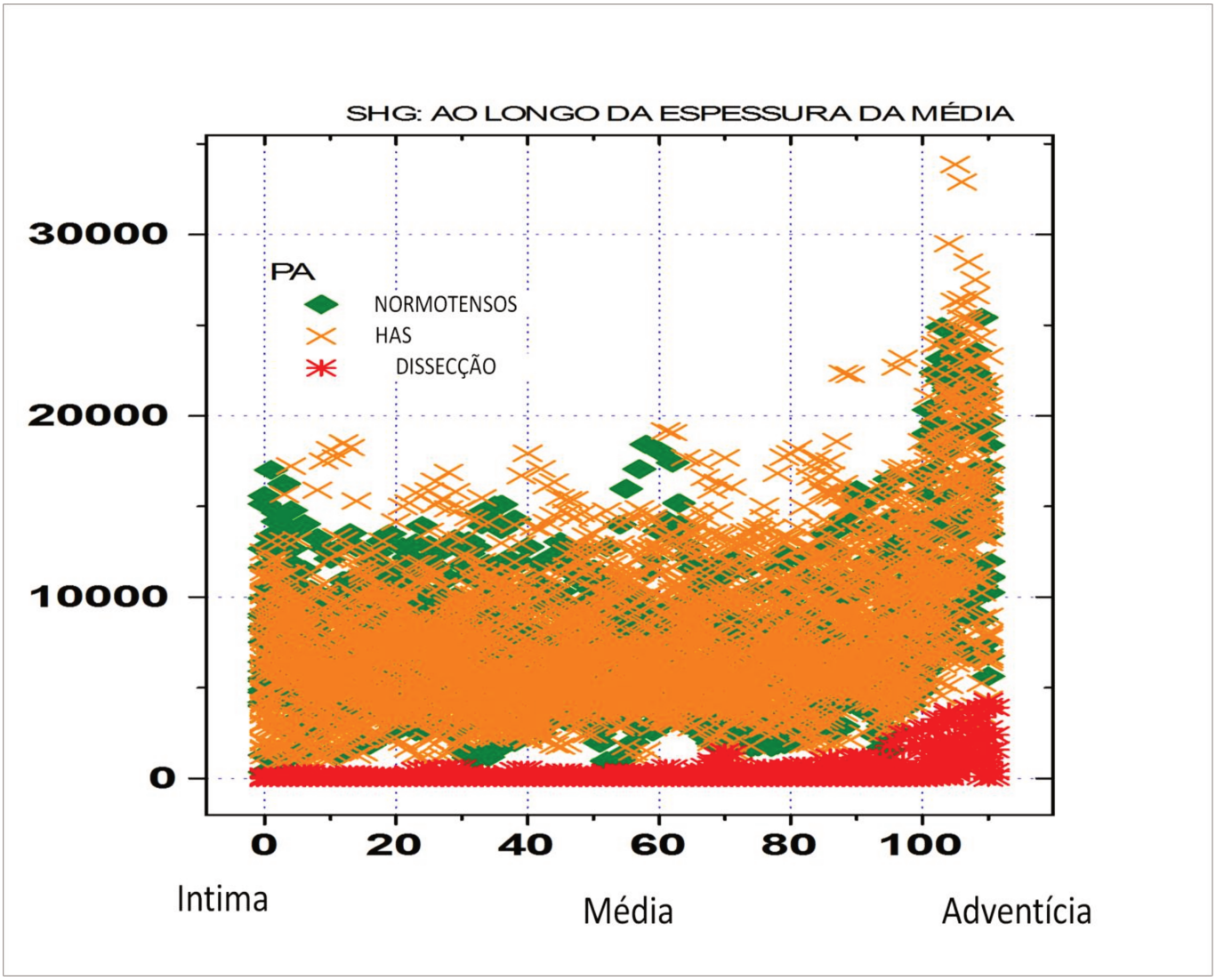

Figura 32: Distribuição do SHG na espessura da camada média em normotensos (verde) HAS (laranja) e que sofreram dissecção (vermelho).

Na espessura da camada média, em direção à adventícia, ocorre um ponto de aumento do sinal SHG e antes dele um vale, ou seja, uma região onde há menor intensidade do sinal, conforme mostra a tabela abaixo.

Tabela 12: Pontos de aumento do sinal SHG na espessura da aorta.

	Ponto de aumento do sinal SHG
Normotensos	79,2% (±11,3); 1189,64µ
HAS	89,96% (±6,9); 1577,05µ

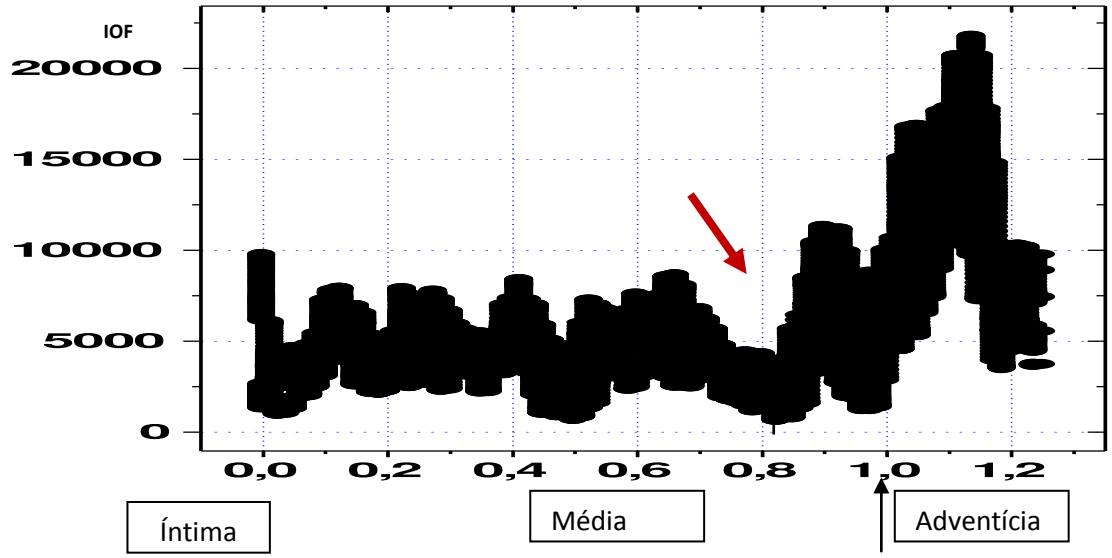

Figura 33: Distribuição do sinal SHG na espessura da camada média em individuo HAS. A seta em vermelho indica o vale formado entre dois picos do sinal SHG, a seta em preto indica a transição entre as camadas média e adventícia.

Com o intuito de descrever a magnitude do sinal SHG na camada media de cada aorta, percorremos toda a espessura da média, partindo da íntima sentido adventícia, e correlacionamos a intensidade do sinal com a espessura da camada , valores de correlação positivos significam aumento da intensidade de sinal próximo a adventícia valores negativos significam diminuição. Plotamos o resultado encontrado em cada aorta e correlacionamos com a idade.

Observamos que com a idade, ocorre diminuição deste sinal em direção à adventícia tanto nos indivíduos normotensos (r: -0,4848 r2: 0,23885 p=0.08) como nos portadores de HAS (r: -

0,31672; r^2: 0,10031; p=0,03), porém nos primeiros a diminuição é mais acentuada. Figura 34 e 35 respectivamente.

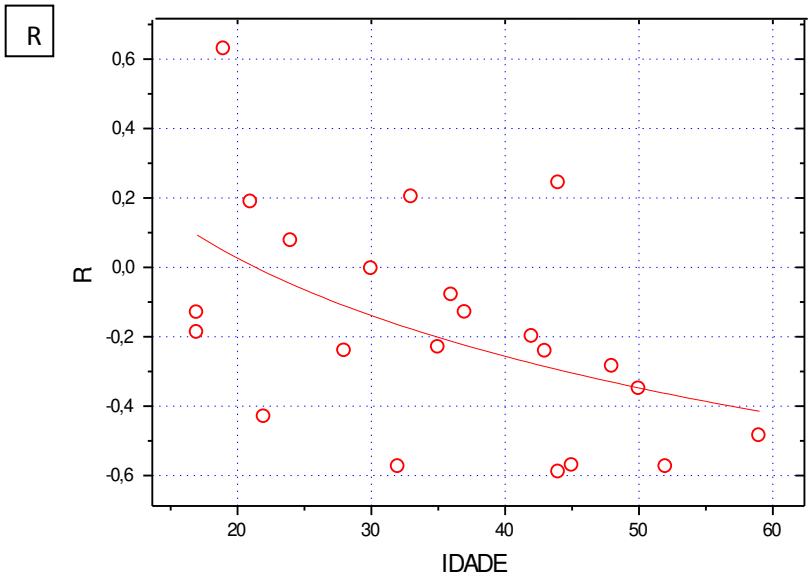

Figura 34: Ordenada Y: Coeficiente de correlação entre sinal SHG e distancia da íntima em aorta de normotensos. x: idade. Com o envelhecimento ocorre diminuição do sinal em direção á adventícia em normotensos. r: -0,4848, r^2: 0,23885 p=0.08

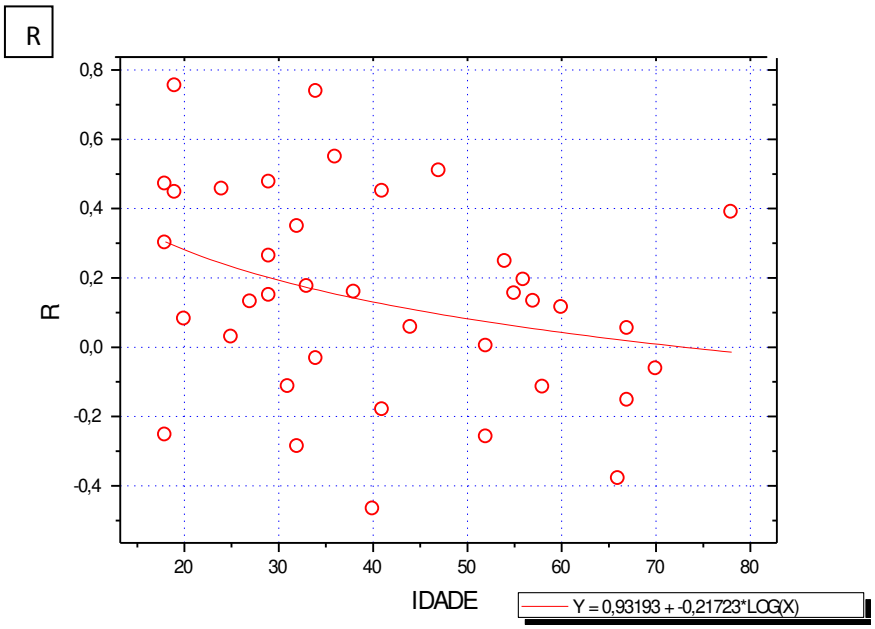

Figura 35: Ordenada Y: Coeficiente de correlação entre sinal SHG e distancia da íntima em aorta de hipertensos. x: idade. Com envelhecimento ocorre diminuição do sinal em direção á adventícia nos portadores de HAS. r: -0,31672; r^2: 0,10031; p=0,03

As aortas das mulheres mais velhas portadoras de HAS apresentam diminuição maior (r^2=0,54) do sinal SHG, em sentido íntima adventicia, em relação aos homens da mesma faixa etária e portadores da doença (r^2=0,3).

Não houve diferença significativa na Homogeneidade Local e no Segundo Momento Angular, dentro dos grupos, quando correlacionado com idade.

Variáveis extraídas do espectro de Fourier na análise do SHG emitida por estruturas de colágeno:

Utilizamos análise multivariada associado com rotação quartemax, conforme anexo, para determinar o grau de associação entre as variáveis extraídas do espectro de Fourier na análise do SHG.

Energia dos Setores:

- ✓ 1 a 8: entraram em todos os casos no fator um.
- ✓ Quociente 9/1: entrou como fator individual 18 de 21 no fator três, e 17 vezes ficou como fator isolado.

Energia dos Anéis:

- ✓ 5 a 17: entraram todos no fator um;
- ✓ 18: entrou 20 vezes no fator 1.
- ✓ Um: entrou 20 vezes no fator 2,

Tabela 13: Variáveis associadas extraídas da imagem FFT:

Fator 1	*Fator 2*	*Fator3*
Setor 1 a 8	Anel 1	Setor 9/1
Anéis 5 a 17		
Anel 18		

Utilizamos para análise os dados obtidos no anel 18 (frequências até 1,08 micras) e o quociente entre os setores 9/1, que representa a razão entre as somas das frequências extraídas na direção vertical e horizontal.

Tabela 14: Variáveis extraídas do espectro de Fourier utilizadas na análise do sinal SHG.

SHG	Normotensos	HAS	Dissecção	*p*
Variância do quociente das energias setores 9/1	0,20 (±0,046)	0,18 (±0,035)	0,18 (±0,1)	*0,35*
Variância da energia anel 18	0,34273 (±0,33)	0,25151 (±0,28)	0,34 (±0,23)	0,46
Energia do anel 18	16.7476 (±26856,3)	16.3030 (±27649,6)	10.8847 (±45356)	<0,0001

Anel 18: Na análise *post hoc* identificamos que o grupo dissecção foi diferente dos demais.

A variância da energia do quociente entre setores 9/1 diminui com a idade nos indivíduos normotensos r=-0,593, p=0,0023. Nos portadores de HAS, não ocorreu este fato. r=0,25031; p=0,08.

Análise do sinal SHG dentro de cada aorta:

Tabela 15: Análise do sinal SHG na aorta de normotensos

Normotensos	Metade interna	Metade externa	*p*
IOF	6.982,90 (±2514,03)	6.939,67 (±2591,08)	p=0,06
Entropia	6,3 (±1,9)	5,68 (±1,7);	p<0,001

Metade interna: próximo à íntima; externa: próximo à adventícia.

Tabela 16: Análise do sinal SHG na aorta de HAS

HAS	Metade interna	Metade externa	*p*
IOF	6.509,36; (±2326,51)	7.400,11 (±2724,54)	p=0,04
Entropia	6,22 (±1,5);	6,28 (±1,57)	p=0,06

Metade interna: próximo à íntima; externa: próximo à adventícia.

A partir dos 40 anos, a metade interna da aorta dos normotensos apresenta maiores valores para IOF e Entropia, quando comparados com a mesma região dos HAS. Já a metade externa não apresenta diferença de IOF entre os grupos, porém a entropia tem maiores valores nos HAS.

Dissecção

As dissecções ocorreram entre 52,2% e 80% da espessura da média (média 64,5%). Nos casos analisados, observamos que o sinal gerado pelas estruturas de colágeno possui dois pontos máximos, um antes da dissecção próximo a 60% da espessura da média e outro logo após a

dissecção, próximo a 80% da espessura da média, local que chamamos de ponto de aumento do SHG e foi justamente entre estes pontos que ocorreram as dissecções. Figura 36. A distância média entre dissecção e ponto do aumento do sinal SHG, foi de: 187,2 micras; maior: 675,8 menor: -12,9.

Observamos em todas as aortas que sofreram dissecção a presença de um discreto infiltrado inflamatório, com predominância de neutrófilos.

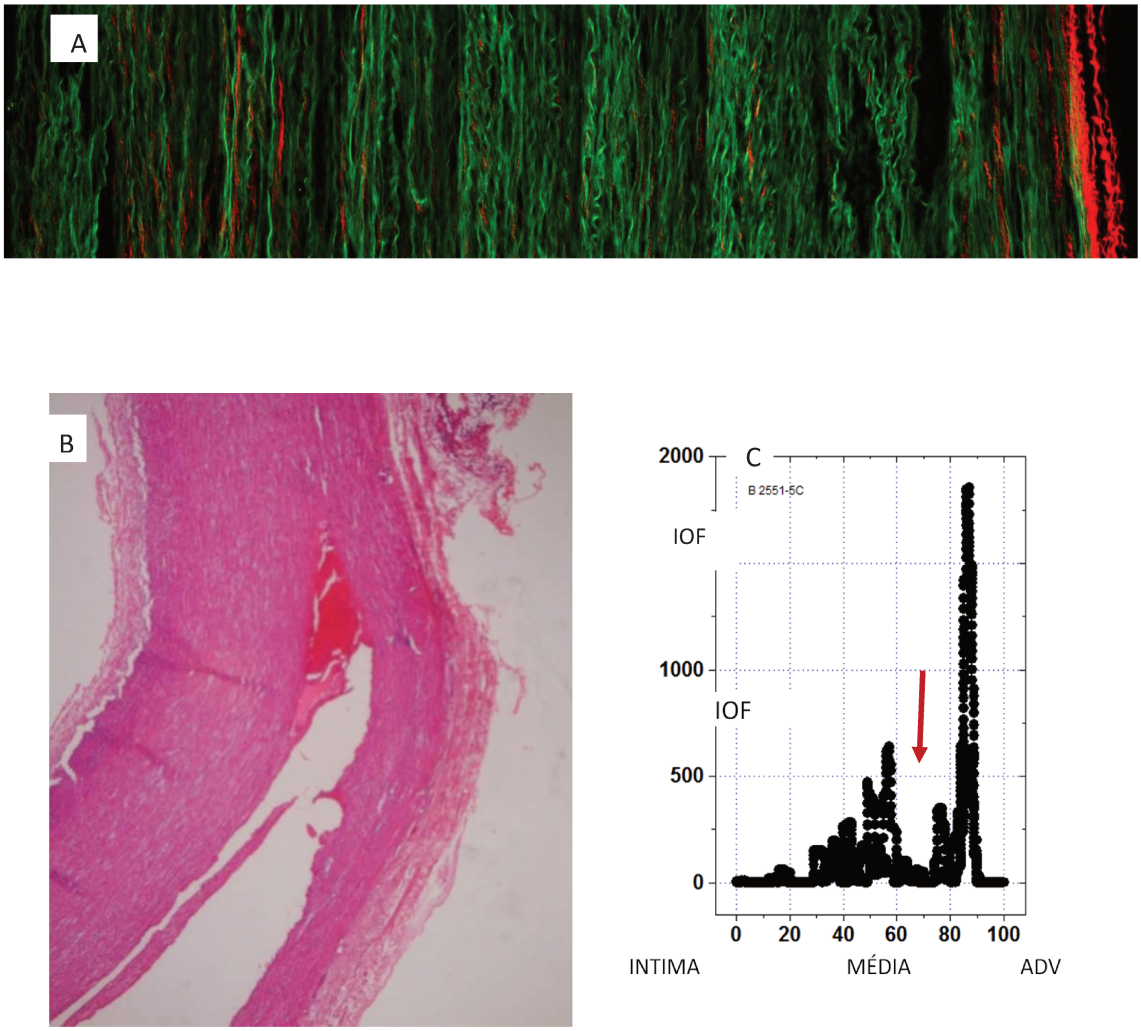

Figura 36: A: imagem da espessura da aorta de individuo dissecado, adquirida no microscópio multifóton, verde: fibras elásticas, vermelho SHG. B: imagem de aorta em microscópio de luz comum corada com A HE. C: gráfico mostrando a IOF Do sinal SHG na espessura da camada média, a seta indica o local onde ocorreu a dissecção.

Proporção fibras elásticas e colágenas.

Calculamos a proporção entre colágeno fibras elásticas (ELCOR) usando a IOF do sinal SHG e IOF da fluorescência da eosina em cada aorta.

Tabela 17: Proporção entre fibras elásticas e sinal SHG.

SHG	Normotensos	HAS	Dissecção	*p*
ELCOR	0,658 (±0,29)	0,565(±0,21)	1,8 (±0,1,5)	*0,002*

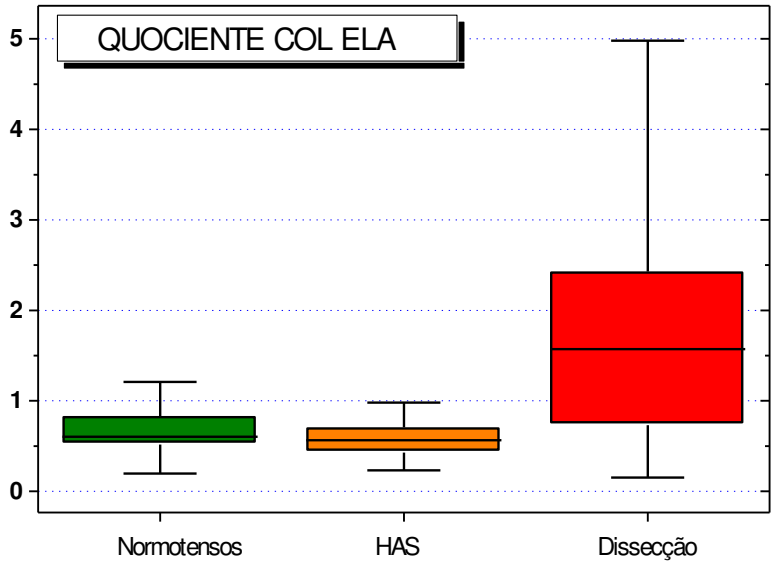

Figura 37: Proporção entre colágeno e fibras elásticas (ELCOR) em aorta de normotensos, hipertensos e de dissecção.

Dentro de uma mesma aorta, observamos que enquanto nos normotensos e hipertensos a proporção entre colágeno/ fibras elástica é menor que um, indicando maior intensidade de sinal sinal SHG do que de fluorescência, nos indivíduos dissecados ocorreu inverso.

DISCUSSÃO

Discussão

O diagnóstico em anatomia patológica é dependente de técnicas que demandam tempo no preparo, custos e experiência do observador. Considerando que, o acesso ao diagnóstico em países em desenvolvimento está aquém do necessário, o emprego de técnicas que possam agilizar e diminuir os custos destas análises é bastante desejável. Uma metodologia pela qual seja possível, de maneira simultânea, quantificar e analisar colágeno e fibras elásticas, independente da experiência do observador, e com custos menores representa um novo horizonte na análise destas estruturas.

O emprego de lasers no estudo de tecidos humanos representou um avanço não só no que diz respeito a pesquisa básica, mas também na aplicada, contribuindo para diagnósticos e prognósticos. A aquisição de imagens com lasers permite a análise de estruturas que outrora só era possível observá-las através de colorações químicas, imunohistoquímica ou imunofluorescência, técnicas estas sujeitas a problemas de foto decaimento, além de despender tempo e custos elevados. Além disso, estes procedimentos geram resíduos que precisam ser gerenciados corretamente para que não contaminem o meio ambiente.

Os arranjos de fibras colágenas formam estruturas não lineares que são fundamentais para geração de sinal SHG (Chiu et al, 2010). Diversos trabalhos empregam geração de segundo harmônico para análise de colágeno em tumores (Guo et al, 1999, Adur, 2011), vasos sanguíneos (Zoumi, 2004, Vieira et al 2009), cicatrizes (Ferro et al, 2012) e córnea (Teng, 2006). A geração do sinal SHG além de não causar dano aos tecidos possibilita a análise de lâminas não coradas, inclusive arquivadas há anos.

A análise computadorizada de imagens representa um avanço na interpretação destas, uma vez que novas tecnologias em aquisições de imagens requerem o uso de análise quantitativa dos tecidos (Kayser, 2006). A quantificação das alterações morfológicas da textura pode ser feita por análise humana e computadorizada (Lorand-Metze,1996; Irazusta et al., 1998; Lorand-Metze et al., 1998; Cia et al.,1999; Oliveira et al., 2001; Auada et al., 2006; Rocha et al., 2006; Adam et al., 2006; Herreros et al., 2007; Kayser et al., 2007; Mello et al., 2008; Rocha et al., 2008; Prado 2008;). No entanto, os parâmetros de análise de imagem computacional possuem a vantagem de estimar pequenas mudanças – que não são óbvias ao olho humano ou mesmo invisíveis e por isso difíceis

de incluir numa descrição qualitativa (Metze, 1999; Adam, 2002) – além de ser independe da subjetividade humana.

A análise de textura utilizando variáveis derivadas da matriz de co-ocorrência de Haralick, entropia e homogeneidade local, já foi utilizada em estudo de carcinomas (Rybka e col, 2008); da derme (Herreros e col, 2006); de mielomas (Ferro, 2011); para diagnóstico diferencial entre tireoidite folicular e neoplasias (Ferreira e col, 2006) e também de fibras elásticas (Vieira, 2009). A análise de imagens utilizando-se de Transformada de Fourier já foi utilizada para diferenciar a arquitetura de fibras elásticas e de colágeno em doenças dermatológicas (Metze et al., 2002; Van Zuijlen et al., 2002).

Neste trabalho, utilizamos estas ferramentas matemáticas para analisar quantitativamente a disposição das fibras elásticas e colágenas em regiões da aorta que na microscopia ótica pareciam inalteradas. Das variáveis extraídas da matriz de co-ocorrência de Haralick a entropia demonstrou boa capacidade em localizar regiões da aorta que apresentavam maiores distúrbios da arquitetura. Não conseguimos detectar diferenças da arquitetura de indivíduos HAS e normotensos utilizando a Homogeneidade local e Segundo momento angular, contudo a última ferramenta distinguiu a aorta de dissecção das de normotensos e hipertensos.

Das variáveis extraídas do espectro de Fourier, a variância do anel 18 (frequências de até 1,08μ) diferenciou a dissecção dos outros grupos, tanto nas análises de colágeno como nas fibras elásticas. O quociente entre os setores nove e um diferenciou a dissecção dos outros grupos nas análises de fibras elásticas. Para colágeno esta ferramenta não conseguiu diferenciar os grupos, porém mostrou as diferenças provocadas pelo envelhecimento.

Além das ferramentas acima citadas, utilizamos também a fluorescência ótica integrada (IOF), que foi eficaz em analisar a distribuição de colágeno e fibras elásticas nas imagens. Os estudos do colágeno utilizando geração de segundo harmônico vêm sendo mundialmente utilizada desde que Campagnhola em 1999 publicou o primeiro artigo sobre esta técnica de geração de sinal. Porém nenhum trabalho foi desenvolvido com o intuito de descrever em quais estruturas do colágeno ou em qual situação este sinal é gerado, nosso trabalho vem colaborar com a comunidade cientifica neste quesito. Demonstramos que apesar do colágeno estar presente numa determinada

estrutura, neste caso na aorta, o sinal SHG é emitido apenas quando existe uma organização do mesmo, ou seja, a presença de colágeno e seus arranjos são fundamentais.

A análise conjunta, de imunofluorescência e SHG, para analise de colágeno na aorta é de suma importância, pois enquanto a primeira permite visualizar delicadas estruturas fibrilares, inclusive intracelulares, a segunda permite analisar arranjos e orientação do colágeno, (Chiu et al, 2010). A imunofluorescência mostra os reforços fibrilares presentes entre os arranjos formados pelas moléculas de colágeno, e estes arranjos de colágeno apesar de não serem visualizadas pela imunomarcação o são através da geração de segundo harmônico (SHG).

Sabemos que a hipertensão induz degeneração mixóide na aorta, que pode ser facilmente observada por meio da microscopia óptica. O objetivo deste trabalho foi saber se há alterações morfológicas detectáveis antes da instalação da degeneração. Para isso as imagens foram realizadas em regiões que na microscopia óptica pareciam normais, e para interpretá-las utilizamos ferramentas computacionais. Apesar de (analisado a partir da IOF) não encontrarmos diferenças significativas na distribuição de fibras elásticas entre HAS e normotensos, encontramos alterações da arquitetura – maiores desvios da entropia e ondulações do quociente 9/1 da FFT – na transição entre o terço interno e médio da aorta de indivíduos normotensos, enquanto na aorta de indivíduos portadores de HAS estes distúrbios se concentraram principalmente na região externa.

A irrigação da aorta ocorre de duas formas: i) por difusão, a partir da íntima até o terço médio; ii) por vasos *vasorum,* da adventícia até o terço externo. Angouras e colaboradores (2000) observaram que, em suínos, numa situação de isquemia o terço médio da aorta é o primeiro a sofrer privação de oxigênio e nutrientes. Coincidentemente foi nesta região que encontramos maiores distúrbios de fibras elásticas em indivíduos normotensos, dessa maneira sugerimos que estes distúrbios estão associados ao tipo de irrigação da aorta. Por outro lado o remodelamento do sistema elástico encontrado nos indivíduos HAS, possivelmente está associado ao aumento da força mecânica do fluxo sanguíneo que, colidindo constantemente na parede da aorta, promove uma nova arquitetura deste vaso. Nesse sentido Vieira e colaboradores (2009) descreveram que, em hipertensão, as fibras elásticas apesar de não diminuírem em quantidade, apresentam maiores distúrbios o que as torna mais suscetíveis à fragmentação.

Observamos que o envelhecimento cursa com uma discreta diminuição da intensidade do sinal de fluorescência (fibras elásticas) ao longo da espessura da aorta de normotensos se comparado aos portadores de HAS. Como não ocorre diminuição do número de fibras elásticas (Vieira, 2009) este achado pode estar associado à fragmentação destas estruturas provocada pelo envelhecimento (Hirst, 1976). Nas aortas dos pacientes HAS, o aumento da síntese de fibras elásticas interlamelares (Keeley e Alatawi, 1991), responsáveis pela conexão entre uma fibra e outra, compensam a perda, o que pode justificar a ausência na diminuição do sinal de fluorescência nestes indivíduos.

A redução na intensidade do sinal SHG, sentido íntima adventícia, que ocorre com o avanço da idade nos indivíduos normotensos, deve ser interpretado como uma diminuição dos arranjos formados por moléculas de colágeno, o que não implica, necessariamente, na diminuição da quantidade de colágeno. Porém, De Figueiredo e colaboradores (2008) encontraram menor concentração de colágeno na metade externa da aorta, diante disso pensamos que a redução do sinal se deve não só pela diminuição dos arranjos, mas também pelo *turnover* de colágeno.

Fenômeno interessante ocorreu quando analisamos a intensidade do sinal SHG ao longo da espessura da média, partindo da íntima em sentido à adventícia. Observamos que o envelhecimento provoca, nos indivíduos normotensos, uma diminuição na intensidade deste sinal à medida que se aproxima da adventícia. Mesmo nos portadores de HAS, onde há um aumento no *turnover* de colágeno, ocorre uma discreta diminuição do sinal SHG. Sabidamente o envelhecimento provoca degradação de colágeno (Jacob, 2003) bem como de outras estruturas da matriz extracelular. Já a hipertensão proporciona aumento desta proteína (Laviades et al *1998*; Olivetti et al, 1982), isso nos leva a acreditar que o aumento do colágeno nos hipertensos compensaria a perda provocada pela idade.

Em mulheres, se comparado aos homens na mesma faixa etária, o envelhecimento da aorta coincidiu com uma diminuição acentuada do sinal SHG, em sentido íntima adventicia. É conhecido que os hormônios sexuais modulam o remodelamento dos vasos sanguíneos e tem papel crucial na deposição de colágeno (Orshal and Raouf, 2004; Natoli et al, 2005; Spinale, 2007). Sabe-se ainda que, após a menopausa, a secreção de progesterona é praticamente ausente, e a síntese de estrogênio cai significativamente. Além disso, estudos com ratas demonstraram que estradiol e

progesterona aumentam a deposição de colágeno. (Fischer and Swain, 1977; Fischer and Swain 1985; Natoli et al, 2005). Dessa maneira a diminuição deste hormônio, que ocorre com envelhecimento, pode explicar a redução de colágeno encontrado na aorta de mulheres mais velhas.

Na metade externa da aorta observamos a presença de um vale – onde ocorre menor intensidade do sinal SHG – o qual é ladeado por dois picos de maior intesidade do sinal SHG, isto parece indicar que há uma região com menor quantidade de estruturas de arranjos de colágeno. Este "vale" também foi visualizado tanto na distribuição do colágeno tipo I como no tipo III, ou seja, na metade externa da camada média existe um canal onde há menor quantidade de estruturas organizadas e também menor quantidade de colágeno tipo III e I. Em portadores de HAS observamos que nesta região estão concentrados os maiores distúrbios da arquitetura, observados a partir da entropia.

As dissecções analisadas neste trabalho, todas de portadores de HAS, ocorreram na metade externa da média sempre entre dois picos do sinal SHG. Então sugerimos que, a arquitetura do "canal", por apresentar menor quantidade de arranjos de colágeno e menor quantidade de colágeno tipo I e III, é uma região fragilizada e o aumento da pressão sanguínea presente em HAS, pode torná-las mais suscetível a delaminações.

A incidência de hipertensão é alta, cerca de *22,7%* dos brasileiros são diagnosticados como hipertensos *(*MS, 2011), enquanto nos Estados Unidos, 1 em cada 3 indivíduos desenvolvem HAS (NIH). Já a incidência da dissecção é baixa, esta enfermidade acomete entre 5 – 30 indivíduos por um milhão de pessoas ao ano (Nienaber et al, 2004). Diante desse quadro nos questionamos por que apenas algumas aortas dissecam, se há em todas elas um canal com menor quantidade e arranjos de colágeno? Segundo os nossos estudos acreditamos que, nos indivíduos que sofrem dissecção, deve haver alguma diferença estrutural ou bioquímica no colágeno do interior deste canal, que o tornaria mais suscetível a delaminações numa situação em que ocorre aumento de pressão.

Além disso, mudanças na proporção colágeno/elastina, como as que encontramos nas aortas dissecadas, provocam alterações na função biomecânica dos vasos. Isso nos leva a pensar que além da degradação intensa da matriz extracelular, que já torna a aorta mais suscetível a rupturas, a mudança na proporção destas proteínas colabora para o rompimento deste vaso.

O valor da entropia para o grupo dissecção foi menor em relação ao outros dois grupos, isso provavelmente está associado à diminuição do sinal emitido pela aorta dissecada. Porém, mesmo com a diminuição do sinal, os distúrbios das fibras elásticas e colágenas geram maiores desvios da média da entropia e maiores variância da FFT, principalmente em estruturas de até 1,08 μ, que estão localizados nas aortas dissecadas, apontado para uma maior desorganização e fragmentação nestas aortas.

O motivo pelo qual ocorreu intensa redução do sinal de fluorescência da eosina ligada a fibras elásticas e também do sinal SHG, ainda não está esclarecido. Uma possível explicação é a ação das metaloproteinases que degradam matriz extracelular (Xiaoming et al, 2009). A ação destas proteínas, ao longo do tempo, provocaria perdas ou mudanças nas estruturas da camada média e no ambiente químico da aorta, o que poderia explicar a diminuição dos sinais mencionados anteriormente, e contribuir, principalmente, para o enfraquecimento da aorta, que em situações de hipertensão a tornaria mais suscetível à delaminação.

Apesar destas teorias, o esclarecimento deste fato necessitaria de um modelo animal, no qual pudéssemos acompanhar o desenvolvimento da dissecção, ativação e ação das metaloproteinases ao longo do tempo com a intensidade do sinal, tanto SHG como o de fluorescência emitido pela aorta.

CONCLUSÃO

Conclusão

- ✓ As ferramentas para análises histológicas como: homogeneidade local e entropia de Haralick; quociente do setor 9/2 e anel 18 extraído do espectro de Fourier a partir das FFT e fluorescência integrada óptica (IOF), são ferramentas úteis para análise de estruturas da aortas.

- ✓ Nos indivíduos normotensos há uma diminuição da intensidade do sinal SHG, ao longo da espessura da média, partindo da íntima em sentido à adventícia, enquanto em portadores de HAS ocorre um aumento.

- ✓ O envelhecimento provoca uma diminuição mais acentuada na intensidade do sinal SHG em sentido íntima à adventícia em indivíduos normotensos, ao passo que nos portadores de HAS essa diminuição é mais discreta.

- ✓ A dissecção da aorta ocorreu entre dois picos de SHG, apontado que a mesma ocorre entre dois reforços de colágeno.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

Adam, R.L. Análise espectral usando a Transformada de Fourier Discreta para o estudo de núcleos celulares: Elaboração de Programa e aplicação no desenvolvimento do coração. (Dissertação – Mestrado) Campinas, SP – Universidade Estadual de Campinas. 2002.

Adam, R.L., Silva, R.C., Pereira, F.G., Leite, N.J., Lorand-Metze, I., Metze, K. The fractal dimension of nuclear chromatin as a prognostic factor in acute precursor B lymphoblastic leukemia. Cell Oncol. v. 28, p. 55–59. 2006.

Adam, R.L., Silva, R.C., Pereira, F.G., Leite, N.J., Lorand-Metze, I., Metze, K. The fractal dimension of nuclear chromatin as a prognostic factor in acute precursor B lymphoblastic leukemia. Cell Oncol. v;28(1-2), p. 55-9. 2006.

Adur, J., Pelegati, V.B., Costa, L.F., Pietro, L., de Thomaz, A.A., Almeida, D.B., Bottcher-Luiz, F., Andrade, L.A., Cesar, C.L. Recognition of serous ovarian tumors in human samples by multimodal nonlinear optical microscopy. J Biomed Opt. v. 16(9), p. 96017. 2011.

Ahmed, S.H., Clark, L.L., Pennington, W.R., Webb, C.S., Bonnema, D.D., Leonardi, A.H., et al. Matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of metalloproteinases: relationship between changes in proteolytic determinants of matrix composition and structural, functional, and clinical manifestations of hypertensive heart disease. Circulation. v. 113(17), p. 2089-96. 2006.

Albregtsen, How to calculate the goodness-of-fit of a fractal dimension. Cell Oncol. v. 31(6), p. 501. 2009.

Angouras, D., Sokolis, D.P., Dosios, Kostomitsopoulus, Boudoulas, H., Skalkeas, Karaynnacos, P.E. Effect of impaired vasa vasorum flow on the structure and mechanics of the thoracic aorta: implications for the pathogenesis of aortic dissection. European Journal of Cardio-Thoracic Surgery 17. p. 468-473. 2000.

Auada, M.P., Adam, R.L., Leite, N.J., Puzzi, M.B., Cintra, M.L., Rizzo, W.B., et al Texture analysis of the epidermis based on fast Fourier transformation in Sjögren-Larsson syndrome. Anal Quant Cytol Histol. v. 28, p. 219-227. 2006.

Barnes, M.J., Farndale, R.W. Collagens and atherosclerosis. *Exp Gerontol*. v. 34, p. 513–525. 1999.

Bedin, V., Adam, R.L., de Sá, B.C., Landman, G., Metze, K. Fractal dimension of chromatin is an independent prognostic factor for survival in melanoma. *BMC Cancer. v.* 10, p. 260. 2010.

Bode, M.K., Soini, Y., Melkko, J., Satta, J., Risteli, L., Risteli, J. Increased amount of type III pN-collagen in human abdominal aortic aneurysms: evidence for impaired type III collagen fibrillogenesis. *J Vasc Surg*. v. 32 p. 1201–120. 2000.

Brown, E., McKee, T., diTomaso, E., Pluen, A., Seed, B., Boucher, Y. ,Jain, K.R.. Dynamic imaging of collagen and its modulation in tumors in vivo using second-harmonic generation. Nat. Med. v. 9, p. 796–800. 2003.

Campagnhola, P.J., Wei, M., Lewis, A., Loew, M.L. High-Resolution Nonlinear Optical Imaging of Live Cells bySecond Harmonic Generation. Biophysical Journal, v. 77(6), p. 3341-3349. 2009

Campagnola, P.J., Millard, A.C., Mohler, W.A. "Second Harmonic Generation Imaging Microscopy of Endogenous Structural Proteins" Methods. v. 29, p. 97 – 109. 2002.

Carvalho, H.F., Vidal B.C. The elastic system of a pressure bearing tendon of the frog, Annals of Anatomy, v. 177, p. 397-404. 1995

Centonze, V. E. and White, J. G. Multiphoton excitation provides optical sections from deeper within scattering specimens than confocal imaging. Biophysical Journal. v. 75, p. 2015-2024.1998.

Chiu, Y.W., Lo, M.T., Tsai, M.R., Chang, Y.C., Hsu, R.B., et al. Applying Harmonic Optical Microscopy for Spatial Alignment of Atrial Collagen Fibers. PLoS ONE. 2010.

Choudhury, N., Bouchot, O., Rouleau, L., Tremblay, D., Cartie, R., Butany, R., Mongrain, R., Leask, R.L. Local mechanical and structural properties of healthy and diseased human ascending aorta tissue. Card Path. v 18, p. 83-91. 2008.

Cia, E.M.M., Trevisan, M., Metze, K. Argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) technique: a helpful tool for differential diagnosis in urinary cytology. Cytopathology v. 10, p. 30-39. 1998.

Cox, G. and Sheppard, C. J. R. Practical limits of resolution in confocal and non-linear microscopy *Microscopy Research and Technique* v. 63, p. 18-22. 2004.

Daily, P.O., Trueblood, W., Stinson, E.B., et al. Management of acute aortic dissections. Ann Thorac Surg v. 10, p. 237-47. 1970.

De Figueiredo, L.B., Jaldin, R.G., Dias, R.R., Stolf, N., Michel, J., Gutierrez, P.S. Collagen is reduced and disrupted in human aneurysms and dissections of ascending aorta. Human Phatology. v. 39, Issue 3, p. 437-443. March 2009.

De Figueiredo. B. L., Jaldin, R., Dias, R., Stolf, N. G., Michel, J., & Gutierrez, P.Collagen is reduced and disrupted in human aneurysms and dissections of ascending aorta. *Human Pathology*. v.*39* (3), p. 437-443, 2008.

Debakey, M.E., Cooley, D.A., Creech, O. Surgical management of dissecting aneurysm of the aorta. J Thorac Cardiovasc Surg. v. 49, p. 130-149. 1965.

Denk, W., Strickler, J.H., Webb, W.W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. Science. v. 248, p. 73. 1990.

Elsheikh TM, Asa SL, Chan JKC, DeLellis RA, Heffess CS et al. Interobserver and Intraobserver Variation Among Experts in the Diagnosis of Thyroid Follicular Lesions With Borderline Nuclear Features of Papillary Carcinoma. Am J Clin Pathol 130 (5): 736-744.2008

Fahrenbach, W.H., Sandberg, L.B. Ultra structural studies on early elastogenesis. The Anatomical Record. v.155 (4), p. 563–575.1966.

Fallas. J.A., Gauba, V., Hartgerink, J.D. Solution structure of an ABC collagen heterotrimer reveals a single-register helix stabilized by electrostatic interactions. J Biol Chem. v. 284, p. 26851–26859. 2009.

Farquharson, C., Robins, S.P. Immunolocalization of collagen types I, III and IV, elastin and fibronectin within the heart of normal and copper-deficient rats. Journal of Comparative Pathology. v. 104 (3), p. 245–255. 1991.

Ferreira, R.C., de Matos, P.S., Adam, R.L., Leite, N.J., Metze, K. Application of the Minkowski-Bouligand fractal dimension for the differential diagnosis of thyroid follicular neoplasias. *Cell Oncol. v.* 28, p. 331–3. 2006.

Ferro, D. P., Vieira-Damiani, G., Adam, R. L., Cesar, C. L., Metze, Konradin. Nonlinear optics for the study of human scar tissue. Proceedings of the SPIE. v. 8226, p. 82263J-82263J-7. 2012.

Ferro, D.P., Falconi, M.A., Adam, R.L., Ortega, M.M., Lima, C.P., et al. Fractal Characteristics of May-Grünwald-Giemsa Stained Chromatin Are Independent Prognostic Factors for Survival in Multiple Myeloma. PLoS ONE 6(6). 2011.

Fischer, G.M., Swain, M.L. Effect of sex hormones on blood pressure and vascular connective tissue in castrated and noncastrated male rats. *Am J Physiol.* V. 232, p.H617–H621. 1977.

Fischer, G.M., Swain, M.L. Effects of estradiol and progesterone on the increased synthesis of collagen in atherosclerotic rabbit aortas. *Atherosclerosis*. v. 54, p.177–185. 1985.

Fleischmajer. R., Gay, S., Perlish, J.S., Cesarini, J.P. Immunoelectron microscopy of type III collagen in normal and scleroderma skin. J Invest Dermatol. v. 75(2), p.189-91.1980.

Fullmer, H.M., Lille, R.D. The oxytalan fiber, a previously undescribed connective tissue fibers. J. Histochem. Cytochem. V. 6, p.425-30. 1958.

Groenink, M., Langerak, S.E., Vanbavel E., Wall. E.E., Mulder, B. J.M., Allard C Wal,c., Spaan, J.A.E. The influence of aging and aortic stiffness on permanent dilation and breaking stress of the thoracic descending aorta. Cardiovascular Research. v. 43 p. 471–480. 1999.

Guo, Y., Savage, H.E., Liu, F., Schantz, P.S., Ho, P.P., Alfano, R.R. Subsurface tumor progression investigated by noninvasive optical. second harmonic tomography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* v. 96, p. 10854-10856. 1999.

Hagan, P.G., Nienaber, C.A., Isselbacher, E.M., et al. The International Registry of Acute Aortic Dissection (IRAD). *JAMA.* v. 283, p. 897-903. 2000.

Hair, Joseph, F., Tatham, Ronald, L., Anderson, Rolph, E., Black Willian. Multivariate Analysis, 5th Edition Prentice Hall. 1998.

Halloran, B.G., Davis, V.A., McManus, B.M., Lynch, T.G., Baxter, B.T. Localization of aortic disease is associated with intrinsic differences in aortic structure. J Surg Res. v59 (1) p. 17-22.1995

Haralick, R.M., Shanmugan, K., Dinstein, I. Texture features for image classification. IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics. v. 3, p. 610-21. 1973.

Herreros, F.O., Cintra, M.L., Adam, R.L., de Moraes, A.M., Metze, K. Remodeling of the human dermis after application of salicylate silanol. *Arch Dermatol Res. v.* 299, p. 41–5 . 2007.

Hirst. A.E., Gore, I. Is cystic medionecrosis the cause of dissecting aortic aneurysm? Circulation. v. 53, p. 915-6. 1976.

Irazusta, S.P., Vassallo, J., Magna, L.A., et al. The value of PCNA and AgNOR staining inendoscopic biopsies of gastric mucosa Pathol. Res.Pract. v. 194 (1), p. 33-9. 1998.

Jacob,M.P. Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. Biomedicine & Pharmacotherapy. v.57, p. 195–202. 2003.

Juang, D., Braverman, A.C. and Eagle, K. Aortic Dissection. *Circulation. v.* 118, p. 507-510. 2008.

Junqueira, J., Carneiro, J. Histologia Básica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

Junqueira, L.C., Carneiro, J. Histologia Básica, 10.ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2004.

Junqueira, L.C., Carneiro, J., Histologia Básica, 8 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 1–18. 1995

Junqueira, L.C.U., Carneiro, J. Histologia básica. 9 ed. Riode Janeiro : Guanabara Koogan.1999.

Kayser, K., Kayser, G., Metze, K. The concept of structural entropy in tissue-based diagnosis. Anal Quant Cytol Histol. v. 29, p. 296-308. 2007.

Kayser, K., Kayser, G., Metze, K. The concept of structural entropy in tissue-based diagnosis. Anal Quant Cytol Histol v. 29, p. 296-308. 2007.

Keeley, F.W., Alatawi, A. Response of aortic elastin synthesis and accumulation to developing hypertension and the inhibitory effect of colchicine on this response. Lab Invest. v. 64, p. 499–507. 1991.

Kielty, C.M., Sherratt, M.J., Shuttleworth, C.A. Elastic fibres. J Cell SCI. v. 115, p. 2817-2828. 1993.

Koning. K. Laser tweezrs and multiphoton microscopes in life sciences. Histochem Cell Biol. v. 114, p. 79-92. 2001.

Laviades, C., Varo, V., Fernández, J., Mayor, G., Gil, M.J., Monreal, I., Díez, J. Abnormalities of the Extracellular Degradation of Collagen Type I in Essential Hypertension. *Circulation. v. 98,p. 535-540. 1998.*

Lehninger, A.L., Nelson D.L., Cox, M.M. Princípios de Bioquímica.2.ed. São Paulo, 2004.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. Molecular Cell Biology, 4th edition. New York: W. H. Freeman. 2000.

Lorand-Metze, I., Carvalho, M.A., Metze, K. Relationship between morphometric analysis of nucleolar organizer regions and cell proliferation in acute leukemias. Cytometry v. 32, p. 51-56. 1998.

LorandMetze, I., Metze, K. AgNOR clusters as a parameter of cell kinetics in chronic lymphocytic leukaemia. J Clin Pathol -Clin Mol Pathol. v.49, p. M357.1996.

McEniery, Y.C.M., Dakham, W.S., Pulsalkar, Z.P., Maki-Petaja, K. et al. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness. Arterioscler Thromb Vasc Biol. v. 25(2), p. 372. 2005.

Mecham, R.P., Davis, E.C. Elastic fiber structure and assembly.In: Extracellular matrix assembly and structure, YurchenkoPD, Birk DE, Mecham RP (eds). Academic press, SanDieg. p 281-314. 1994.

Mello, M.R.B., Metze, K., Adam, R.A., Pereira, F.G., Magalhães, M.G., Machado, C.G.F., Lorand-Metze, I. Phenotypic Subtypes of Acute Lymphoblastic Leukemia are associated with different Nuclear Chromatin Texture. Anal Quant Cytol Histol. v. 30, n. 2, p. 92-98. 2008.

Metze, K., Ferro, D.P., Falconi, M.A. *et al.*: Fractal characteristics of nuclear chromatin in routinely stained cytology are independent prognostic factors in patients with multiple myeloma. *Virchows Archiv. v.* 445(Suppl. 1), p. 7. 2009.

Metze. K., Silva, P.V.V.T., Adam, R.L., Cintra, M.L., Leite, N.J. Differentiation of keloid and hypertrophic scar by texture analysis. Anal Cell Pathol. v. 24, p. 196. 2002.

Milewicz, D.M., Urbán, Z., Boyd, C. Matriz Biol. v. 19(6), p. 471-80. 2000.

Ministério da saúde. Disponível em: http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude

Mithieux, S. M., Tu, Y., Korkmaz E. In situ polymerization of tropoelastin in the absence of chemical cross-linking. Biomaterials. v. 30(4), p. 431-435. 2009.

Montes, G.S. Distribution of oxytalan, elaunin and elastic fibres in tissues. Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science.v. 44, p. 224-233. 1992.

Montes, S.G. Structural biology of the fibers of the Collagenous and elastic systems .Cell Biology International, v. 20, p. 1. 1996.

Nakashima, Y., Shiokawa, Y., Sueishi, K. Alterations of Elastic Architecture in Human Aortic Dissecting Aneurysm. Inc the United States and Canadian Academy of Pathology. v. 62, n. 6, p. 751. 1990.

National Institutes of Health (NIH). Disponível em: **http://www.nih.gov/**

Natoli, A.K., Medley, T.L., Ahimastos, A.A., Drew, B.G., Thearle D.J., Dilley, R.J., Kingwell, B.A. Steroids Modulate Human Aortic Smooth Muscle Cell Matrix Protein Deposition and Matrix Metalloproteinase Expression. Hypertension. v. 46, p. 1129-1134. 2005.

Nienaber, C.A., Fattori, R., Mehta, R.H., et al. Gender-related differences in acute aortic dissection. *Circulation.* v. 109, p. 3014-3021. 2004.

Nienaber, C.A., Fattori, R., Mehta, R.H., Richartz, B.M., Evangelista, A., Petzsch, M., Cooper, J., Januzzi, J.L., Ince, H., Sechtem, U., Bossone, E., Fang, Smith, D.E., Isselbacher, E. M., Pape, L.A., Eagle, K.A., Gender-Related Differences in Acute Aortic Dissection**.** *Circulation* v. 109, p. 3014-3021. 2004.

Oliveira, G.B., Pereira, F.G., Metze, K., Lorand-Metze, I. Spontaneous apoptosis in chronic lymphocytic leukemia and its relationship to clinical and cell kinetic parameters. Cytometry v. 46, p. 329-335. 2001.

Olivetti, G., Melissari, M., Marchetti, G., Anversa, P. Quantitative Structural Changes of the Rat Thoracic Aorta in Early Spontaneous Hypertension Circ Res. v. 51, p. 19-26. 1982.

Orshal, J.M. and Khalil, R.A. Gender, sex hormones, and vascular tone *.Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.* 286, p. R233–R249. 2004.

Persikov, A.V., Ramshaw, J.A., Kirkpatrick, A., Brodsky, B. Electrostatic interactions involving lysine make major contributions to collagen triple-helix stability. Biochemistry v. 44, p. 1414–1422. 2005.

Prado, G.L.P. Estudo da Textura Nuclear em Ratos Winstar Intoxicados por Chumbo. (Dissertação – Mestrado) Campinas, SP – Universidade Estadual de Campinas. 2008.

Provenzano. P.P., Eliceiri, K.W., Campbell, J.M., Inman, D.R., White, J.G., Keely, P.J. Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. BMC Medicine. v. 4,p 38. 2006.

Rahkonen. O., Su, M., Hakovirta, H., Koskivirta, I., Hormuzdi, S.G., Vuorio, E., Bornstein, P., Penttinen, R. Mice with a deletion in the first intron of the Col1a1 gene develop age-dependent aortic dissection and rupture. *Circ Res* v. 94, p. 83–9. 2004.

Reiser, K., McCormick, R.J., Rucker, R. B. Enzymatic and nonenzymatic cross-linking of collagen and elastin. The FASEB Journal. v. 6 (7), p. 2439-2449. 1992.

Ricard-Blum, Sylvie. The Collagen Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010.

Roberts, W.C. Aortic dissection: anatomy, consequences and causes. Am Herat J. v. 101, p. 195-21. 1981.

Rocha, L.B., Adam, R.L., Leite, N.J., Metze, K., Rossi, M.A. Biomineralization of polyanionic collagen-elastin matrices during cavarial bone repair. J Biomed Mater Res A. v. 79, p. 237-245. 2006.

Rocha, L.B., Adam, R.L., Leite, N.J., Metze, K., Rossi, M.A. Shannon's entropy and fractal dimension provide an objective account of bone tissue organization during calvarial bone regeneration. Microsc Res Tech. 2008.

Rosenbloom, J., ABRAMS, W.R., MECHAM, R. Extracellular matrix 4: The elastic fiberThe FASEB Journal. v. 7 (13), p. 1208-1218, 1993.

Rybka, M.O., Cintra, M.L., de Souza, E.M., Metze, K. Density of dendritic cells around basal cell carcinomas is related to tumor size, anatomical site and stromal characteristics, and might be responsible for the response to topical therapy. *Int J Dermatol. v.* 47, p. 1240–4. 2008.

Sariola, H., Viljanen, T., Luosto, R. Histological pattern and changes in extracellular matrix in aortic dissections. J. Clin. Pathol. v. 39, p. 1074-1081. 1986.

Sato, S., Leo, M.A., Lieber, C.S. Ultrastructural Localization of Type III procollagen in Baboon Liver. Am.J. Pathol. v. 122, p. 212-17.1986.

Schlatman, T.J.M., Becker, A.E. Histologic changes in the normal aging aorta: implications for dissecting aortic aneurysm. AmJ Cardiol. V. 39(1), P. 13-20. 1977.

Schlatmann, T.J.M., Becker, A.E. Pathogenesis of dissecting aneurysm of aorta: comparative histopathologic study of significance of medial changes. *AmJ Cardiol.* v. 39, p. 21-26. 1977.

Shinohara, T., Suzuki, K., Okada, M., Shiigai, M., Shimizu M., Maehara, T., Ohsuzu, F. Soluble elastin fragments in serum are elevated in acute aortic dissection. Arterioscler Thromb Vasc Biol. v. 23(10), p. 1839-44. 2003.

Silver F.H., Christiansen, D.L., Buntin C.M. Mechanical properties of the aorta: a review. Crit Rev Biomed Eng. v 17(4), p. 323-58. 1989.

Sobrinho-Simões, M. Hail to the histologic grading of papillary thyroid carcinoma? Cancer 88: 1766-1768. 2000.

Spinale, F.G. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. Physiol Rev. v. 87(4), p. 1285-342. 2007.

Teng, S.W., Tan, H.Y., Peng, J.L., Lin, H.H., Kim, K.H., Lo, W., Sun, Y., Lin, W.C., Lin, S.J., Jee, S.H., So, P.T., Dong, C.Y. Multiphoton autofluorescence and second-harmonic generation imaging of the ex vivo porcine eye. Invest Ophthalmol Vis Sci. v. 47(3), p. 1216-24. 2006.

Theodridis, S., Koutroumbas, K. Pattern Recognition. 3. ed. USA: Elsevier. p. 837. 2006.

Thomaz, A.A.C, Ferramentas Biofotônica integrada para manipulação e microscopias confocais. (Dissertação – Mestrado) Campinas, SP – Universidade Estadual de Campinas. 2007.

Van de Wouver, G.V.D., Weyn, B., Scheunders, P., Jacob, W., Marck, E.V., Dyck, D.V. Wavelets aschromatin texture descriptors for the automated identification of neoplastic nuclei. Journal of Microscopy. v. 197, p. 25-35. 2000.

Van Zuijlen, P.P.M., Vries, H.J.C., Lamme, E.N., Cooppens, J.E., Van Marle, J., Kreis, R.W., et al. Morphometry of dermal collagen orientation by Fourier analysis is superior to multi-observer assessment. J. Pathol. v. 198(3), p. 284-91. 2002.

Vieira, G. Analise da arquitetura da aorta de pacientes hipertensos e normotensos. Tese mestrado. FCM Unicamp, 2009.

Vieira, G., Ferro, D.P., Adam, R. L., Thomaz, A. A., Metze, K., Cesar, C.L. Computerized texture analysis of human aorta by co-localization of collagen and elastic fibers with a multi-photon-microscope, 10/2010*, Histopathology (Oxford. Print).* v. 57, p. 191-191. 2010.

Wang, X., LeMaire, S.A., Chen, L., Shen, Y.H., Gan, Y., Bartsch, H., Carter, S.A., Utama, B., Ou, H., Coselli, J.S., Wang, X.L. Increased Collagen Deposition and Elevated Expression of Connective Tissue Growth Factor in Human Thoracic Aortic Dissec. *Circulation.* v. 114, p. I-200-I-205. 2006.

Weiss, M.A., Hudson, D.M., Kim, L., Scott, M., Wu, J.J., Eyre, D.R. Location of 3-hydroxyproline residues in collagens I, II, III, ad V/XI implies a role in fibril supramolecular assembly. J Biol Chem v. 285, p. 2580–2590. 2010.

Xiaoming Zhang, Ying, H., Shen, Scott, A., LeMaire. Thoracic Aortic Dissection: Are Matrix Metalloproteinases Involved? Vascular. v. 17(3), p. 147–157. 2009.

Zoumi, A., Yeh, A., Tromberg, B.J. Imaging cells and extracellular matrix in vivoby using second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence.PNAS. v. 99 (17), p. 11019. 2002.

Zoumi, A.I., Xiao, L., Kassab, G.S., Tromberg, B.J. Imaging Coronary Artery Microstructure Using Second-Harmonic and Two-Photon Fluorescence Microscopy. Biophys J. v. 87(4), p. 2778–2786. 2004.

ANEXOS

Figura 1: Programa utilizado para analisar o grau de associação entre as variáveis extraídas do espectro de Fourier.

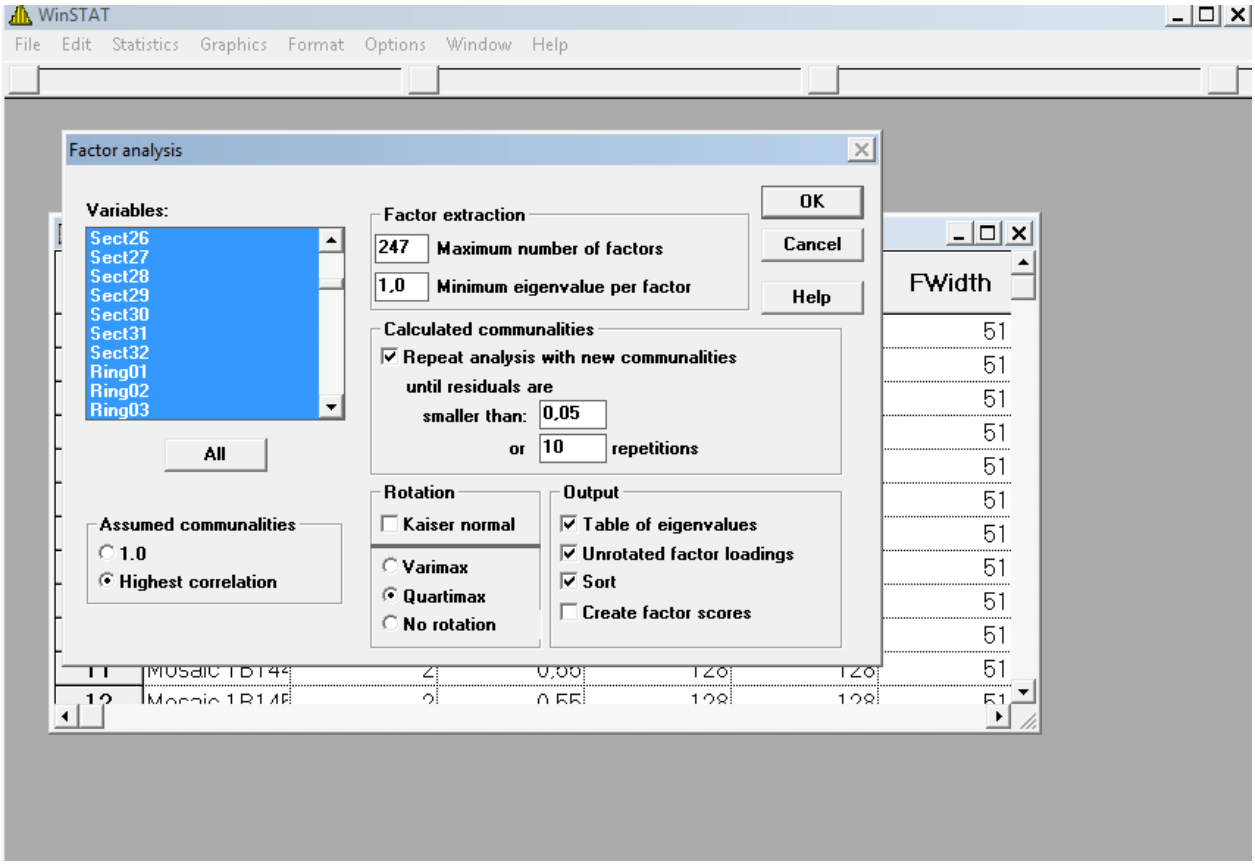

Tabela 1: **Variáveis extraídas do espectro de Fourier na análise de SHG, por setor.**

CASO	Sect01	Sect02	Sect03	Sect04	Sect05	Sect06	Sect07	Sect08	Sect09	SETOR9/1
103-5	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F4 4,7%
106-08	F1 72,4%	F1 72,4%	F1 72,4%	F1 72,4%	F1 72,4%	F1 72,4%	F1 72,4%	F1 72,4%	F1 72,4%	F3 4,6%
113-5	F1 54,9%	F1 54,9%	F1 54,9%	F1 54,9%	F1 54,9%	F1 54,9%	F1 54,9%	F1 54,9%	F1 54,9%	F3 7,8%
13-3	F1 61,3%	F1 61,3%	F1 61,3%	F1 61,3%	F1 61,3%	F1 61,3%	F1 61,3%	F1 61,3%		F3 5,6%
136-8	F1 70,8%	F1 70,8%	F1 70,8%	F1 70,8%	F1 70,8%	F1 70,8%	F1 70,8%	F1 70,8%	F1 70,8%	F3 4,13%
142-4	F1 61,3%	F1 61,3%	F1 61,3%	F1 61,3%	F1 61,3%	F1 61,3%	F1 61,3%	F1 61,3%	F1 61,3%	F3 5,0%
149-4	F1 61,4%	F1 61,4%	F1 61,4%	F1 61,4%	F1 61,4%	F1 61,4%	F1 61,4%	F1 61,4%	F1 61,4%	F3 4,7%
17-5	F1 63%	F1 63%	F1 63%	F1 63%	F1 63%	F1 63%	F1 63%	F1 63%	F3 8,7%	F3 8,7%
18-10	F1 70,3%	F1 70,3%	F1 70,3%	F1 70,3%	F1 70,3%	F1 70,3%	F1 70,3%	F1 70,3%	F1 70,3%	F3 4%
24-4	F1 65,6%	F1 65,6%	F1 65,6%	F1 65,6%	F1 65,6%	F1 65,6%	F1 65,6%	F1 65,6%	F1 65,6%	F3 3,9%
27-4	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F3 6,4%
38-05	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F4 8,2%	
40-07	F1 70%	F1 70%	F1 70%	F1 70%	F1 70%	F1 70%	F1 70%	F1 70%	F1 70%	F3 6%
43-5	F1 63,%	F1 63,%	F1 63,%	F1 63,%	F1 63,%	F1 63,%	F1 63,%	F1 63,%	F1 63,%	
67-5	F1 72%	F1 72%	F1 72%	F1 72%	F1 72%	F1 72%	F1 72%	F1 72%	F1 72%	F3 5,15%
72-7	F1 70%	F1 70%	F1 70%	F1 70%	F1 70%	F1 70%	F1 70%	F1 70%		F2 20%
74-9	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F3 5%
81-7	F1 56%	F1 56%	F1 56%	F1 56%	F1 56%	F1 56%	F1 56%	F1 56%	F1 56%	F3 6%
90-4	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F3 8%
154-3	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F3 7%

Tabela 2: **Variáveis extraídas do espectro de Fourier na análise de SHG, por anel.**

CASO	Ring01	Ring02	Ring03	Ring04	Ring05	Ring06	Ring07	Ring08	Ring09	Ring10
103-5		F2 19,8%	F2 19,8%		F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%
106-08	F2 17,3%		F1 72,4%	F1 72,4%	F1 72,4%	F1 72,4%	F1 72,4%	F1 72,4%	F1 72,4%	F1 72,4%
113-5	F2 24,7%		F2 24,7%	F2 24,7%	F1 54,9%	F1 54,9%	F1 54,9%	F1 54,9%	F1 54,9%	F1 54,9%
13-3	F2 23,4%	F2 23,4%	F2 23,4%	F1 61,3%	F1 61,3%	F1 61,3%	F1 61,3%	F1 61,3%	F1 61,3%	F1 61,3%
136-8	F2 16,6%		F1 70,8%	F1 70,8%	F1 70,8%	F1 70,8%	F1 70,8%	F1 70,8%	F1 70,8%	F1 70,8%
142-4	F2 24,%	F2 24,%	F2 24,%	F1 61,3%	F1 61,3%	F1 61,3%	F1 61,3%	F1 61,3%	F1 61,3%	F1 61,3%
149-4	F2 24,5%	F2 24,5%	F2 24,5%	F2 24,5%	F1 61,4%	F1 61,4%	F1 61,4%	F1 61,4%	F1 61,4%	F1 61,4%
17-5	F2 18%	F2 18%	F1 63%	F1 63%	F1 63%	F1 63%	F1 63%	F1 63%	F1 63%	F1 63%
18-10	F1 70,3%	F1 70,3%	F1 70,3%	F1 70,3%	F1 70,3%	F1 70,3%	F1 70,3%	F1 70,3%	F1 70,3%	F1 70,3%
24-4	F2 20,3%	F2 20,3%	F1 65,6%	F1 65,6%	F1 65,6%	F1 65,6%	F1 65,6%	F1 65,6%	F1 65,6%	F1 65,6%
27-4	F2 22%)	F2 22%)	F2 22%)	F2 22%)	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%
38-05	F3 8,3%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%
40-07	F2 15%	F2 15%	F1 70%	F1 70%	F1 70%	F1 70%	F1 70%	F1 70%	F1 70%	F1 70%
43-5	F2 22%	F2 22%	F2 22%	F1 63,%	F1 63,%	F1 63,%	F1 63,%	F1 63,%	F1 63,%	F1 63,%
67-5	F1 72%	F1 72%	F1 72%	F1 72%	F1 72%	F1 72%	F1 72%	F1 72%	F1 72%	F1 72%
72-7			F1 70%	F1 70%	F1 70%	F1 70%	F1 70%	F1 70%	F1 70%	F1 70%
74-9	F2 28%	F2 28%	F2 28%	F2 28%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%
81-7	F2 24%	F2 24%	F2 24%	F1 56%	F1 56%	F1 56%	F1 56%	F1 56%	F1 56%	F1 56%
90-4	F2 18,3%	F2 18,3%	F2 18,3%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%
154-3	F2 17%	F2 17%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%

Tabela 3: **Variáveis extraídas do espectro de Fourier na análise de SHG, por anel.**

CASO	Ring11	Ring12	Ring13	Ring14	Ring15	Ring16	Ring17	Ring18
103-5	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%
106-08	F1 72,4%	F1 72,4%	F1 72,4%	F1 72,4%	F1 72,4%	F1 72,4%	F1 72,4%	F1 72,4%
113-5	F1 54,9%	F1 54,9%	F1 54,9%	F1 54,9%	F1 54,9%	F1 54,9%	F1 54,9%	F1 54,9%
13-3	F1 61,3%	F1 61,3%	F1 61,3%	F1 61,3%	F1 61,3%	F1 61,3%	F1 61,3%	F1 61,3%
136-8	F1 70,8%	F1 70,8%	F1 70,8%	F1 70,8%	F1 70,8%	F1 70,8%	F1 70,8%	F1 70,8%
142-4	F1 61,3%	F1 61,3%	F1 61,3%	F1 61,3%	F1 61,3%	F1 61,3%	F1 61,3%	F1 61,3%
149-4	F1 61,4%	F1 61,4%	F1 61,4%	F1 61,4%	F1 61,4%	F1 61,4%	F1 61,4%	F1 61,4%
17-5	F1 63%	F1 63%	F1 63%	F1 63%	F1 63%	F1 63%	F1 63%	F1 63%
18-10	F1 70,3%	F1 70,3%	F1 70,3%	F1 70,3%	F1 70,3%	F1 70,3%	F1 70,3%	F1 70,3%
24-4	F1 65,6%	F1 65,6%	F1 65,6%	F1 65,6%	F1 65,6%	F1 65,6%	F1 65,6%	F1 65,6%
27-4	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	
38-05	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%
40-07	F1 70%	F1 70%	F1 70%	F1 70%	F1 70%	F1 70%	F1 70%	F1 70%
43-5	F1 63,%	F1 63,%	F1 63,%	F1 63,%	F1 63,%	F1 63,%	F1 63,%	F1 63,%
67-5	F1 72%	F1 72%	F1 72%	F1 72%	F1 72%	F1 72%	F1 72%	F1 72%
72-7	F1 70%	F1 70%	F1 70%	F1 70%	F1 70%	F1 70%	F1 70%	F1 70%
74-9	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%
81-7	F1 56%	F1 56%	F1 56%	F1 56%	F1 56%	F1 56%	F1 56%	F1 56%
90-4	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%
154-3	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%

Tabela 4: **Variáveis extraídas do espectro de Fourier na análise de SHG, quociente entre anéis.**

CASO	Ring01/Ring18	Ring02/Ring18	Ring03/Ring18	Ring04/Ring18	Ring05/Ring18
103-5	F2 19,8%	F2 19,8%	F2 19,8%	F3 8,2%	
106-08	F2 17,3%	F2 17,3%	F2 17,3%	F2 17,3%	
113-5	F2 24,7%	F2 24,7%	F2 24,7%	F2 24,7%	
13-3	F2 23,4%	F2 23,4%	F2 23,4%	F2 23,4%	F2 23,4%
136-8	F2 16,6%	F2 16,6%	F2 16,6%	F2 16,6%	
142-4	F2 24,%	F2 24,%	F2 24,%	F2 24,%	F2 24,%
149-4	F2 24,5%	F2 24,5%	F2 24,5%	F2 24,5%	F2 24,5%
17-5		F2 18%	F2 18%	F2 18%	F2 18%
18-10	F2 17,17%	F2 17,17%	F2 17,17%	F2 17,17%	F2 17,17%
24-4	F2 20,3%	F2 20,3%	F2 20,3%	F2 20,3%	F2 20,3%
27-4	F2 22%)	F2 22%)	F2 22%)	F2 22%)	F2 22%)
38-05	F3 8,3%			F2 8,3%	F2 8,3%
40-07	F2 15%	F2 15%	F2 15%		
43-5	F2 22%	F2 22%	F2 22%	F2 22%	F2 22%
67-5	F2 14%	F2 14%	F2 14%	F2 14%	F2 14%
72-7	F2 20%	F2 20%	F2 20%	F2 20%	F2 20%
74-9	F2 28%	F2 28%	F2 28%	F2 28%	F2 28%
81-7	F2 24%	F2 24%	F2 24%	F2 24%	F2 24%
90-4	F2 18,3%	F2 18,3%	F2 18,3%	F2 18,3%	
154-3	F2 17%	F2 17%	F2 17%	F2 17%	

Tabela 5: **Variáveis extraídas do espectro de Fourier na análise de fibras elásticas, por setor.**

CASO	Sect02	Sect03	Sect04	Sect05	Sect06	Sect07	Sect08	Sect09	SETOR9/1
103-5	F1 75%	F1 75%	F1 75%	F1 75%	F1 75%	F1 75%	F1 75%	F1 75%	F4 4,4%
106-08	F1 82%	F1 82%	F1 82%	F1 82%	F1 82%	F1 82%	F1 82%	F1 82%	
113-5	F1 71,5%	F1 71,5%	F1 71,5%	F1 71,5%	F1 71,5%	F1 71,5%	F1 71,5%	F1 71,5%	F4 4,2%
13-03	F1 55%	F1 55%	F1 55%	F1 55%	F1 55%	F1 55%	F1 55%	F1 55%	F3 8%
136-08	F1 52%	F1 52%	F1 52%	F1 52%	F1 52%	F1 52%	F1 52%	F4 7,7%	F4 7,7%
142-4	F1 77%	F1 77%	F1 77%	F1 77%	F1 77%	F1 77%	F1 77%	F1 77%	F3 5,7%
149-4	F1 67%	F1 67%	F1 67%	F1 67%	F1 67%	F1 67%	F1 67%	F1 67%	F3 9,2 %
154-3	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F3 8,5%
17-05	F1 67%	F1 67%	F1 67%	F1 67%	F1 67%	F1 67%	F1 67%	F1 67%	F3 9,2%
18-10	F1 65%	F1 65%	F1 65%	F1 65%	F1 65%	F1 65%	F1 65%	F1 65%	F4 5%
24-04	F1 57%	F1 57%	F1 57%	F1 57%	F1 57%	F1 57%	F3 10%	F3 10%	F3 10%
27r	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F3 10,2%	F3 10,2%
38-5	F1 63%	F1 63%	F1 63%	F1 63%	F1 63%	F1 63%	F1 63%	F1 63%	F4 6,3%
40-7	F1 72%	F1 72%	F1 72%	F1 72%	F1 72%	F1 72%	F1 72%	F1 72%	F3 7%
43-5	F1 45,5%	F1 45,5%	F1 45,5%	F1 45,5%	F1 45,5%	F1 45,5%	F2 44%	F2 44%	
67-5	F1 63 %	F1 63 %	F1 63 %	F1 63 %	F1 63 %	F1 63 %		F4 7,4%	F4 7,4%
72-7		F2 14%		F1 66,7%	F1 66,7%	F1 66,7%	F1 66,7%	F1 66,7%	F2 14%(-)
74-9	F1 52%	F1 52%	F1 52%	F1 52%	F1 52%	F1 52%	F1 52%	F4 7%	F4 7%
81-7	F1 58,5%	F1 58,5%	F1 58,5%	F1 58,5%	F1 58,5%	F1 58,5%		F4 8%	F4 8%
90-4	F1 70 %	F1 70 %	F1 70 %	F1 70 %	F1 70 %	F1 70 %	F1 70 %	F1 70 %	F2 7,6%

Tabela 6: **Variáveis extraídas do espectro de Fourier na análise de fibras elásticas, por anel.**

CASO	Ring01	Ring02	Ring03	Ring04	Ring05	Ring06	Ring07	Ring08	Ring09	Ring10
103-5	F1 75%	F1 75%	F1 75%	F1 75%	F1 75%	F1 75%	F1 75%	F1 75%	F1 75%	F1 75%
106-08	F2 7,6%		F1 82%	F1 82%	F1 82%	F1 82%	F1 82%	F1 82%	F1 82%	F1 82%
113-5	F2 9,7%	F1 71,5%	F1 71,5%	F1 71,5%	F1 71,5%	F1 71,5%	F1 71,5%	F1 71,5%	F1 71,5%	F1 71,5%
13-03	F4 5,5%	F1 55%	F1 55%	F1 55%	F1 55%	F1 55%	F1 55%	F1 55%	F1 55%	F1 55%
136-08	F3 11,8%	F3 11,8%	F1 52%	F1 52%	F1 52%	F1 52%	F1 52%	F1 52%	F1 52%	F1 52%
142-4	F1 77%	F1 77%	F1 77%	F1 77%	F1 77%	F1 77%	F1 77%	F1 77%	F1 77%	F1 77%
149-4	F1 67%	F1 67%	F1 67%	F1 67%	F1 67%	F1 67%	F1 67%	F1 67%	F1 67%	F1 67%
154-3	F4 7,5%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%
17-05	F1 67%	F1 67%	F1 67%	F1 67%	F1 67%	F1 67%	F1 67%	F1 67%	F1 67%	F1 67%
18-10	F2 11,6%	F1 65%	F1 65%	F1 65%	F1 65%	F1 65%	F1 65%	F1 65%	F1 65%	F1 65%
24-04		F2 17%	F1 57%	F1 57%	F1 57%	F1 57%	F1 57%	F1 57%	F1 57%	F1 57%
27-05	F3 3,8%		F2 18,4 %		F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%
38-5	F1 63%	F1 63%	F1 63%	F1 63%	F1 63%	F1 63%	F1 63%	F1 63%	F1 63%	F1 63%
40-7	F1 72%	F1 72%	F1 72%	F1 72%	F1 72%	F1 72%	F1 72%	F1 72%	F1 72%	F1 72%
43-5		F2 44%	F2 44%	F2 44%	F2 44%	F2 44%	F2 44%	F2 44%		F1 45,5%
67-5	F2 12%	F2 12%		F1 63 %	F1 63 %	F1 63 %	F1 63 %	F1 63 %	F1 63 %	F1 63 %
72-7	F1 66,7%	F1 66,7%	F1 66,7%	F1 66,7%	F1 66,7%	F1 66,7%	F1 66,7%	F1 66,7%	F1 66,7%	F1 66,7%
74-9	F2 16%	F2 16%	F1 52%	F1 52%	F1 52%	F1 52%	F1 52%	F1 52%	F1 52%	F1 52%
81-7	F3 8,3%				F1 58,5%	F1 58,5%	F1 58,5%	F1 58,5%	F1 58,5%	F1 58,5%
90-4	F1 70 %	F1 70 %	F1 70 %	F1 70 %	F1 70 %	F1 70 %	F1 70 %	F1 70 %	F1 70 %	F1 70 %

Tabela 7: **Variáveis extraídas do espectro de Fourier na análise de fibras elásticas, por anel.**

CASO	Ring11	Ring12	Ring13	Ring14	Ring15	Ring16	Ring17	Ring18
103-5	F1 75%	F1 75%	F1 75%	F1 75%	F1 75%	F1 75%	F1 75%	F1 75%
106-08	F1 82%	F1 82%	F1 82%	F1 82%	F1 82%	F1 82%	F1 82%	F1 82%
113-5	F1 71,5%	F1 71,5%	F1 71,5%	F1 71,5%	F1 71,5%	F1 71,5%	F1 71,5%	F1 71,5%
13-03	F1 55%	F1 55%	F1 55%	F1 55%	F1 55%	F1 55%	F1 55%	F1 55%
136-08	F1 52%	F1 52%	F1 52%	F1 52%	F1 52%	F1 52%	F1 52%	F1 52%
142-4	F1 77%	F1 77%	F1 77%	F1 77%	F1 77%	F1 77%	F1 77%	F1 77%
149-4	F1 67%	F1 67%	F1 67%	F1 67%	F1 67%	F1 67%	F1 67%	F1 67%
154-3	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%	F1 62%
17-05	F1 67%	F1 67%	F1 67%	F1 67%	F1 67%	F1 67%	F1 67%	F1 67%
18-10	F1 65%	F1 65%	F1 65%	F1 65%	F1 65%	F1 65%	F1 65%	F1 65%
24-04	F1 57%	F1 57%	F1 57%	F1 57%	F1 57%	F1 57%	F1 57%	F1 57%
27-05	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%	F1 60%
38-5	F1 63%	F1 63%	F1 63%	F1 63%	F1 63%	F1 63%	F1 63%	F1 63%
40-7	F1 72%	F1 72%	F1 72%	F1 72%	F1 72%	F1 72%	F1 72%	F1 72%
43-5	F1 45,5%	F1 45,5%		F1 45,5%	F1 45,5%	F1 45,5%	F1 45,5%	F1 45,5%
67-5	F1 63 %	F1 63 %	F1 63 %	F1 63 %	F1 63 %	F1 63 %	F1 63 %	F1 63 %
72-7	F1 66,7%	F1 66,7%	F1 66,7%	F1 66,7%	F1 66,7%	F1 66,7%	F1 66,7%	F1 66,7%
74-9	F1 52%	F1 52%	F1 52%	F1 52%	F1 52%	F1 52%	F1 52%	F1 52%
81-7	F1 58,5%	F1 58,5%	F1 58,5%	F1 58,5%	F1 58,5%	F1 58,5%	F1 58,5%	F1 58,5%
90-4	F1 70 %	F1 70 %	F1 70 %	F1 70 %	F1 70 %	F1 70 %	F1 70 %	F1 70 %

Tabela 8: **Variáveis extraídas do espectro de Fourier na análise de fibras elásticas, quociente entre anéis.**

CASO	Ring1/Ring18	Ring2/Ring18	Ring3/Ring18	Ring4/Ring18	Ring5/Ring18
103-5	F3 6%	F2 9%	F2 9%	F2 9%	F2 9%
106-08	F2 7,6%	F1 82%	F1 82%	F1 82%	F1 82%
113-5	F2 9,7%	F1 71,5%	F1 71,5%	F1 71,5%	F1 71,5%
13-03	F4 5,5%	F2 15%	F2 15%	F2 15%	F2 15%
136-08	F3 11,8%	F3 11,8%	F2 13%	F2 13%	F2 13%
142-4	F1 77%	F1 77%	F1 77%	F1 77%	
149-4	F1 67%	F1 67%	F2 14%	F2 14%	F2 14%
154-3	F4 7,5%		F2 11%	F2 11%	F2 11%
17-05		F2 13%	F2 13%	F2 13%	F2 13%
18-10	F2 11,6%	F2 11,6%	F2 11,6%	F3 6,7%	F3 6,7%
24-04	F2 17%	F2 17%	F2 17%	F2 17%	F2 17%
27-05	F3 3,8%	F2 18,4 %	F2 18,4 %	F2 18,4 %	F2 18,4 %
38-5		F2 11%	F2 11%	F2 11%	F2 11%
40-7	F4 4%		F2 9%	F2 9%	F2 9%
43-5	F2 44%	F2 44%	F2 44%	F2 44%	F2 44%
67-5	F2 12%	F2 12%	F2 12%		
72-7	F1 66,7%	F1 66,7%	F1 66,7%	F1 66,7%	F1 66,7%
74-9	F2 16%	F2 16%	F2 16%	F3 8,6%	F3 8,6%
81-7			F2 12,5%	F2 12,5%	F2 12,5%
90-4	F4 7,1%	F4 7,1%		F3 7,4%	F3 7,4%

Tabela 9: **Caracterização do grupo de normotensos.**

CASO	IDADE	SEXO
A-106-08	35	2
A-13-03	17	2
A-136-08	44	1
A103-04	44	2
A113-05	32	1
A142-04	36	2
A149-04	50	2
A154-03	24	1
A17-05	30	1
A18-10	45	1
A24-04	48	2
A27-04	42	2
A38-05	43	2
A40-07	59	2
A43-05	52	2
A67-05	37	1
A72-07	33	1
A74-09	22	1
A75-09	19	2
A8-5	17	1
A81-07	21	1
A90-04	28	2

SEXO: 1= Feminino; 2=Masculino.

Tabela 10: **Caracterização do grupo de HAS.**

CASO	IDADE	SEXO
A 137-07	36	1
A-106-07	34	2
A-11-05	19	2
A-122-07	70	2
A-125-07	27	1
A-125-08	20	2
A-126-07	57	1
A-130-07	29	1
A-131-07	55	2
A-136-07	52	1
A101-04	32	2
A108-07	25	1
A110-03	60	2
A114-04	18	1
A138-05	40	2
A139-03	24	1
A150-04	32	1
A25-04	29	2
A29-05	34	2
A32-04	18	1
A36-04	58	1
A38-04	18	2
A51-05	66	2
A52-04	29	2
A52-05	44	1
A56-04	31	2
A58-07	52	1
A63-07	56	1
A66-07	78	1
A67-04	67	1
A69-07	38	1
A7-07	67	2
A71-03	19	2
A75-08	33	1
A85-06	41	1
A88-04	41	2
A89-07	54	2
A94-09	47	1

SEXO: 1= Feminino; 2=Masculino.

Tabela 11: **Caracterização do grupo Dissecção**

CASO	IDADE	SEXO	TEMPO DE DISSECÇÃO
10760-2	58	2	5 dias
8590-4	43	2	1 dia
8987-7	45	2	3 dias
1553-7	69	1	2 dias
12418-2	41	2	3 dias
7435-1	46	2	4 dias
3772-3	50	2	3 dias
8274-4	66	2	6 dias
5264-3	36	1	0 dia
97-7	33	2	0 dia
9668-6	62	2	2 dias
2551-04	39	2	3 dias

SEXO: 1= Feminino; 2=Masculino.