MILER RODRIGO PEREIRA

**Avaliação estrutural e quantificação de colágeno na
porção atrial do coração de cães saudáveis e diabéticos**

São Paulo

2009

MILER RODRIGO PEREIRA

**Avaliação estrutural e quantificação de colágeno
na porção atrial do coração de cães saudáveis e
diabéticos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Pedro Primo Bombonato

São Paulo

2009

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2205
FMVZ

Pereira, Miler Rodrigo

Avaliação estrutural e quantificação de colágeno na porção atrial do
coração de cães saudáveis e diabéticos / Miler Rodrigo Pereira. – 2009.
69 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São
Paulo, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e
Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e
Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Primo Bombonato.

1. Tecido conjuntivo. 2. Colágeno. 3. Átrio. 4. Diabetes. 5. Cão.
Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado: "Quantificação e análise estrutural de colágeno na porção atrial do coração de cães normais e diabéticos", protocolado sob o nº1544/2008, utilizando 10 (dez) cães, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Pedro Primo Bombonato, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 11/02/09.

(We certify that the Research "Quantification and structural arrangement of collagen fibers of the heart in atrium portion of dogs normal and diabetics", protocol number 1544/2008, utilizing 10 (ten) dogs, under the responsibility Prof. Dr. Pedro Primo Bombonato, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 02/11/09).

São Paulo, 12 de fevereiro de 2009

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: PEREIRA, Miler Rodrigo

Título: Avaliação estrutural e quantificação do colágeno na porção atrial do coração de cães saudáveis e diabéticos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

A minha mãe Eliana, por sempre estar presente em minha vida por ter me apoiado nos momentos de indecisão, por sempre acreditar em mim mesmo quando eu mesmo não acreditava, por ter me inspirado na escolha da minha profissão e por garantir que nunca faltasse nada para eu conquistar meus objetivos.

Ao meu pai Osvaldo, por ter me ensinado a ser uma pessoa forte e determinado, por ter sido protetor nos momentos em que mais precisei e pelo amor incondicional.

As minhas segundas mães Valéria e Fabiana, por se preocuparem comigo, pelo carinho, dedicação, incentivo, apoio e abrigo.

A minha irmã Patrícia, pelo carinho e compreensão.

A minha filha Sarah, por encher minha vida de alegria e me achar um super pai.

A minha esposa Sílvia, por toda dedicação, amor, compreensão, companheirismo, pela confiança, por estar sempre ao meu lado me motivando nos momentos mais difíceis, e por ter muita paciência comigo.

A DEUS, pela minha vida e a de todos vocês.

Sem vocês eu nunca teria conseguido, obrigado por tudo, amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Titular Pedro Primo Bombonato, meu orientador, pelos ensinamentos fornecidos, pela confiança e dedicação.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em nome de seu diretor, Prof. Doutor Titular José Antônio Visintin pela oportunidade.

Ao curso de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, em nome de sua coordenadora Prof. Doutora Titular Maria Angélica Miglino e a cada um dos professores.

Aos colegas de pós-graduação: Paula, Fernanda, Caio, Marcelo, Yuri, Bruno, Camila e Tiago, pelo apoio.

Aos técnicos: Diogo, Ronaldo, Índio e Sandra pela colaboração e suporte.

Aos secretários da pós-graduação: Maycon e Jackie pela ajuda.

Aos animais e aos donos dos animais que permitiram a concretização deste estudo.

RESUMO

PEREIRA, M. R. **Avaliação estrutural e quantificação do colágeno na porção atrial do coração de cães saudáveis e diabéticos.** [Structural evaluation and quantification of collagen in the atrial portion of the heart healthy and diabetic dogs]. 2009. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O coração é formado por tecido muscular especializado e por um esqueleto de tecido conjuntivo que sustenta e dá inserção a musculatura. Este tecido conjuntivo é formado predominantemente por fibras colágenas tipo I, tipo III e fibras elásticas, as quais influenciam diretamente as propriedades estruturais e funcionais do miocárdio. Algumas doenças podem provocar alterações qualitativas e quantitativas no colágeno comprometendo a funcionalidade do órgão. Diante da inexistência de informações sobre os efeitos diretos do diabetes na estrutura atrial e a concentração de pesquisas em torno dos ventrículos, especialmente o esquerdo, que está ligado à circulação sistema, a proposta deste trabalho foi analisar as alterações morfológicas quantitativas e qualitativas do colágeno nas câmaras atriais comparando as diferenças entre os grupos de cães saudáveis e diabéticos. Além disto, esta pesquisa verificou a distribuição de outros constituintes do átrio como fibras elásticas e colágenas do tipo III. Foram utilizados corações de cães sem raça definida, machos e fêmeas, saudáveis e diabéticos. As estruturas foram examinadas por microscopia óptica, imunofluorescência e microscopia eletrônica de varredura. A taxa de colágeno nos átrios de cães diabéticos foi maior do que nos átrios de cães saudáveis. Isso indica que há uma mudança estrutural nos átrios de animais com doença metabólica, a partir da verificação de uma proteína estrutural importante como o colágeno.

Palavras-chave: Tecido conjuntivo. Colágeno. Átrio. Diabetes. Cão.

ABSTRACT

PEREIRA, M. R. **Structural evaluation and quantification of collagen in the atrial portion of the heart healthy and diabetic dogs.** [Avaliação estrutural e quantificação do colágeno na porção atrial do coração de cães saudáveis e diabéticos]. 2009. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The heart is composed of specialized muscle tissue and a skeleton of connective tissue that supports and gives muscle insertion. This tissue connective is formed predominantly of collagen type I, type III and elastic fibers, which directly influence the structural and functional properties of the myocardium. Some diseases can cause qualitative and quantitative changes in collagen compromising the functionality of the organ. Due to the lack of information on the direct effects of diabetes on atrial structure and the concentration of researches about the ventricles, especially the left, which is connected to the macro circulation system, the purpose of this study was to analyse the morphological quantitative and qualitative collagen in the chambers atrial comparing the differences between the groups of healthy and diabetic dogs. Moreover, this study found the distribution of other constituents like elastic and collagen type III fibers. We used hearts of mongrel dogs, males and females, healthy and diabetics. The structures were examined by light microscopy, immunofluorescence and scanning electron microscopy. The rate of collagen in the atria of diabetic dogs was greater than in the healthy dogs. This indicates that there is a structural change in the atria of animals with metabolic disease, from the finding of a major structural protein like collagen.

Keywords: Connective tissue. Collagen. Atria. Diabetes. Dog.

LISTA DE ABREVIACÕES

AGEs	- Produto final de glicosilação avançada
MEC	- Matriz Extracelular
TGF β 1	- Fator transformante do crescimento beta
ECA	- Enzima Conversora de Angiotensina
GLUT4	- Transportador de Glicose
PKC	- Proteína quinase C
RAGE	- Receptores de Produto final de glicosilação avançada
ATP	- Adenosina Trifosfato
DAG	- Diacilglicerol
TNF- α	- fator de necrose tumoral alfa
TGF- α	- fator transformante do crescimento alfa
GFAT	- Enzima Glutamina frutose-6-fosfato amidotransferase.
PAI-I	- Inibidor do Ativador do Plasminogênio-1.
SRD	- Sem Raça Definida
HE	- Hematoxilina e Eosina
PBS	- Tampão Fosfato Salino
BSA	- Albumina Soro Bovino
IgG	- Imunoglobulina G
FITC	- Isotioacianato de Fluoresceína
IC	- Insuficiência Cardíaca

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1- Fotomicrografias da morfologia dos átrios direito e esquerdo comparando cães sadios e diabéticos. (HE). Figura **A**: átrio direito animal sadio. Figura **B**: átrio direito animal diabético. Figura **C**: átrio esquerdo animal sadio. Figura **D**: átrio esquerdo animal diabético. Observar as regiões do endocárdio = **E**; subendocárdio = **SE**; miocárdio = **M**; tecido adiposo = **TA**; artérias = **A** e veias = **V**. Barra = 200 μ m..... 41
- Figura 2- Fotomicrografias da morfologia dos átrios direito e esquerdo comparando cães sadios e diabéticos. (HE). Figura **A**: átrio direito animal sadio. Figura **B**: átrio direito animal diabético. Figura **C**: átrio esquerdo animal sadio. Figura **D**: átrio esquerdo animal diabético. Notas: epicárdio = **EP**; miocárdio = **M**; tecido adiposo = **TA**; tecido conjuntivo = **TC**; discos intercalares (**seta**). Barra = 50 μ m..... 42
- Figura 3- Fotomicrografias da morfologia dos átrios comparando cães sadios e diabéticos. (Picrossírius). Figura **A**: átrio de animal sadio. Figura **B**: átrio de animal diabético. Figura **C**: átrio de animal sadio. Figura **D**: átrio de animal diabético. Notas: tecido conjuntivo = **TC**; Tecido muscular = **TM**; vasos = **VA**; colágeno intersticial (**seta**). Barra = 200 μ m para figura A e B. Barra = 50 μ m para C e D..... 43
- Figura 4- Fotomicrografias da morfologia dos átrios comparando cães sadios e diabéticos. (Picrossírius luz normal e luz polarizada). Figura **A**: átrio de animal sadio fotomicrografado com luz normal. Figura **B**: átrio de animal sadio fotomicrografado com luz polarizada. Figura **C**: átrio de animal diabético fotomicrografado com luz normal. Figura **D**: átrio de animal diabético fotomicrografado com luz polarizada. Notas: tecido conjuntivo = **TC**; Tecido muscular = **TM**; colágeno intersticial (**seta**). Barra = 200 μ m para figura A e B. Barra = 50 μ m para C e D..... 44
- Figura 5- Comparação das médias e desvio padrão da porcentagem de colágeno nos átrios direito e esquerdo de cães sadios e diabéticos. N = 5 animais. Nota: átrio direito sadio = **ADS**; átrio esquerdo sadio = **AES**; átrio direito diabético = **ADD**; átrio esquerdo diabético = **AED**..... 45
- Figura 6- Correlação de Pearson entre a porcentagem média de colágeno e a idade do animal dos átrios direito e esquerdo de cães sadios e diabéticos. Figura **A**: átrio direito de animal sadio – **r = 0,523**. Figura **B**: átrio esquerdo de animal sadio – **r = 0,452**. Figura **C**: átrio direito de animal diabético – **r = 0,713**. Figura **D**: átrio esquerdo de animal diabético – **r = 0,746**. (**P**<0,05). N = 5 animais..... 46

- Figura 7- Fotomicrografias da morfologia dos átrios direito e esquerdo comparando cães sadios e diabéticos. (Orceína). Figura **A**: átrio direito de animal sadio. Figura **B**: átrio direito de animal diabético. Figura **C**: átrio esquerdo de animal sadio. Figura **D**: átrio esquerdo de animal diabético. Notas: tecido conjuntivo = **TC**; Tecido muscular = **TM**; tecido adiposo = **TA**; miocárdio = **M**; fibras elásticas (**seta**). Barra = 50 μ m..... 47
- Figura 8- Fotomicrografias da morfologia dos átrios comparando cães sadios e diabéticos. (Picrossírius). Figura **A**: átrio de animal sadio. Figura **B**: átrio de animal diabético. Figura **C**: átrio de animal sadio. Figura **D**: átrio de animal diabético. Notas: tecido conjuntivo = **TC**; Tecido muscular = **TM**; endocárdio = **E**; miocárdio = **M**; epicárdio = **EP**; fibras reticulares (**seta**). Barra = 200 μ m para figura A e B. Barra = 50 μ m para C e D..... 48
- Figura 9- Fotomicrografias da imunofluorescência para colágeno tipo I e tipo III do átrio direito comparando cães sadios e diabéticos. O colágeno tipo I e tipo III fluorescem em verde por FITC e os núcleos em vermelho por iodeto de propídeo. Figura **A**: Colágeno tipo I do átrio direito de animal sadio. Figura **B**: Colágeno tipo III do átrio direito de animal sadio. Figura **C**: Colágeno tipo I do átrio direito de animal diabético. Figura **C**: Colágeno tipo III do átrio direito de animal diabético. Notas: tecido conjuntivo = **TC**; Tecido muscular = **TM**; miocárdio = **M**; evidenciação do colágeno imunomarcado (**seta**). Barra = 100 μ m para figura A. Barra = 50 μ m para figuras B, C e D..... 49
- Figura 10- Fotomicrografias da imunofluorescência para colágeno tipo I e tipo III do átrio esquerdo comparando cães sadios e diabéticos. O colágeno tipo I e tipo III fluorescem em verde por FITC e os núcleos em vermelho por iodeto de propídeo. Figura **A**: Colágeno tipo I do átrio esquerdo de animal sadio. Figura **B**: Colágeno tipo III do átrio esquerdo de animal sadio. Figura **C**: Colágeno tipo I do átrio esquerdo de animal diabético. Figura **C**: Colágeno tipo III do átrio esquerdo de animal diabético. Notas: tecido conjuntivo = **TC**; Tecido muscular = **TM**; miocárdio = **M**; evidenciação do colágeno imunomarcado (**seta**). Barra = 100 μ m para figura C. Barra=50 μ m para figuras A, B e D..... 50
- Figura 11- Fotoeletromicrografias de varredura dos átrios de cães sadios e diabéticos. Figura **A**: átrio de animal sadio. Observar fibrilas de colágeno (**setas**) na parede endomisial do átrio. Figura **B**: átrio de animal diabético. Observar rompimento das fibras de colágeno (setas) na parede endomisial do átrio. Barra=10 μ m..... 52

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1	MORFOLOGIA DO CORAÇÃO	20
3.2	TECIDO CONJUNTIVO DO CORAÇÃO	23
3.3	RELAÇÃO ENTRE DIABETES E CARDIOMIOPATIAS	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	OBTENÇÃO DOS ANIMAIS E COLHEITA DAS AMOSTRAS	34
4.2	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	35
4.3	COLORAÇÕES HISTOLÓGICAS	35
4.4	IMUNOFLUORESCÊNCIA	36
4.5	ANÁLISE ESTRUTURAL	37
4.6	DOCUMENTAÇÃO E FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS	38
5	RESULTADOS	40
5.1	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA	40
5.2	AVALIAÇÃO ESTRUTURAL E QUANTIFICAÇÃO DAS FIBRAS COLÁGENAS	42
5.3	FIBRAS ELÁSTICAS	46
5.4	FIBRAS RETICULARES	47
5.5	IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA COLÁGENO TIPO I E COLÁGENO TIPO III	48
5.6	ANÁLISE ESTRUTURAL POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA	51
6	DISCUSSÃO	54
7	CONCLUSÕES	61
	REFERÊNCIAS	63

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Diante da importância do órgão central do sistema cardiovascular, o coração, sua estrutura e funcionalidade são alvos de muitas pesquisas. Por atuar como uma bomba contrátil e propulsora, o coração mantém o movimento do sangue dentro de um sistema fechado composto por vasos sanguíneos. A parede do coração é constituída por três túnicas: a interna, o endocárdio; a média, o miocárdio; e a externa, o epicárdio. O miocárdio é o músculo cardíaco, propriamente dito, é o elemento principal e de maior proporção do coração. Outra estrutura importante do coração é a presença de um arcabouço formado por tecido conjuntivo que sustenta e dá inserção a musculatura (DIDIO, 2002).

Em algumas cardiomiopatias, as lesões do músculo cardíaco são reparadas por acúmulo de tecido conjuntivo, produzindo fibrose na área afetada, já que células musculares dificilmente são reparadas, pois não tem constante atividade mitótica. Dependendo da dimensão e localização da deposição de tecido conjuntivo, o funcionamento cardíaco pode ser afetado, o que leva o comprometimento da irrigação de diversos órgãos e tecidos (BURLEW; WEBER, 2000).

A rede de tecido conjuntivo é constituída principalmente por colágeno tipo I, colágeno tipo III e fibras elásticas (BURLEW; WEBER, 2000).

Burguess, Mccrea e Heather (2001) encontraram um aumento no conteúdo de colágeno cardíaco e um decréscimo significativo na razão entre colágeno tipo I e III correlacionado com a redução na taxa de relaxamento diastólico no coração de camundongos hipertensos.

Omens, Miller e Covell (1997) apresentaram dados em que no miocárdio de ratos saudáveis, as taxas de colágeno eram de 2% a 5%, já em animais pós-infartação essa quantidade aumentou em até 70%.

Gilbert et al. (2000) relataram que no coração de *Doberman pinchers* a remodelação da matriz de colágeno do miocárdio pode ser responsável pela patogênese da cardiomiopatia dilatada e a maior causa de falência cardíaca.

Embora vários trabalhos (AVENDANO et al., 1999; FALCÃO-PIRES et al., 2009; REGAN et al., 2009) mostrem a associação entre o Diabetes Mellitus e as doenças cardiovasculares, Kannel e McGee (1979) foram os primeiros a apontar o diabetes e a intolerância à glicose como fatores de risco cardiovascular.

O diabetes está relacionado com complicações cardíacas por meio de pelo menos três mecanismos conhecidos: associação com as comorbidades, entre elas dislipidemia, hipertensão, hipercoagulabilidade, obesidade e inflamação; desenvolvimento de aterosclerose; mecanismos específicos da cardiomiopatia diabética. O exato mecanismo pelo qual o diabetes pode induzir prejuízo da função cardíaca independente da doença cardíaca coronariana é desconhecido, mas há algumas hipóteses como: micro-angiopatias, fatores metabólicos e fibrose. Dados clínicos e experimentais apontaram o papel da fibrose miocárdica na cardiomiopatia diabética. O acúmulo intersticial de colágeno no miocárdio é uma das consequências do diabetes, além disso, o depósito de produtos finais de glicosilação avançada (AGEs – *Advanced Glycation Endproducts*) pode resultar em aumento do enrijecimento ventricular e conseqüentemente disfunção diastólica (BAUTERS et al., 2003).

Cães e gatos também podem desenvolver diabetes, a glicose não absorvida faz com que o “centro da fome” não fique saciado. Desse modo, a polifagia é um sinal característico no animal diabético. A glicose do sangue não absorvida, faz com que o organismo passe a requerer energia de outras fontes como músculos e gorduras, causando o emagrecimento progressivo do animal num estado mais avançado da doença (FELDMAN; NELSON, 1982).

Segundo Fein (1990), em estudos não invasivos com humanos e experimentais com cães e ratos, observa-se que em diabéticos há um aumento na pressão diastólica final em virtude de um aumento no volume diastólico quando comparados aos grupos não diabéticos. Esses dados conjuntamente com a bioquímica e histoquímica demonstraram um aumento de glicoproteínas e de colágeno no interstício miocardial. Portanto, uma das maiores anormalidades cardíacas em diabéticos é o aumento intersticial de tecido conjuntivo. Koltai et al. (1984) evidenciaram em estudos com cães induzidos ao diabetes, um aumento das fibras de colágeno, apontando isto como um dos responsáveis principais pela alteração funcional do miocárdio.

A maioria dos estudos envolvendo os efeitos dos diabetes sobre as atividades morfológicas e funcionais do coração utilizam modelos experimentais com base na função ventricular por causa do comprometimento direto das funções mecânicas do coração (NUNES et al., 2006; TOYRAN et al., 2006; FALCÃO-PIRES et al., 2009). Entretanto, é possível que ocorram alterações atriais que estejam colaborando com o prejuízo da função cardíaca. Em alguns modelos animais de insuficiência cardíaca foi observada fibrose atrial em concentrações até 20 vezes superiores a fibrose ventricular (BURSTEIN et al., 2008).

Diante da inexistência de informações sobre os efeitos diretos do diabetes no esqueleto conjuntivo atrial, a proposta deste trabalho é analisar as alterações morfológicas quantitativas

e qualitativas do colágeno, comparando-se os grupos de cães sadios e diabéticos, os quais eram independentes da doença cardíaca coronariana.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivos:

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliação estrutural e quantitativa do colágeno na porção atrial do coração de cães sadios e diabéticos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliação do arranjo estrutural das fibras de colágeno tipo I, fibras elásticas e fibras reticulares nos átrios direito e esquerdo entre os grupos de animais sadios e diabéticos.
- Quantificação de colágeno tipo I intersticial nos átrios direito e esquerdo de cães sadios e diabéticos;

REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

Neste capítulo serão apresentados os elementos básicos da estrutura e organização cardíaca, com ênfase nas câmaras atriais e nos constituintes do tecido conjuntivo e suas características no coração. Além disso, abordaremos a relação entre o diabetes e colágeno no tecido cardíaco.

3.1 MORFOLOGIA DO CORAÇÃO

Embriologicamente, o coração é um vaso modificado. O sistema vascular surge no meio da terceira semana embrionária, quando o embrião não consegue satisfazer seus requerimentos nutricionais apenas por difusão. Todo o sistema cardiovascular é formado a partir da mesoderme (SADLER, 2005).

O coração é um órgão muscular com finalidade contrátil para bombear sangue pelo sistema circulatório. A cavidade do coração é subdividida em quatro câmaras: dois átrios e dois ventrículos. As paredes do coração são constituídas por três túnicas, da mais interna a externa, são: o endocárdio, miocárdio e epicárdio (DANGELO; FATTINI, 2006).

O endocárdio é caracterizado por uma camada de células endoteliais que repousa sobre uma camada subendotelial composta por tecido conjuntivo frouxo, em que há fibras colágenas e elásticas e também musculatura lisa. Entre o miocárdio e a camada subendotelial, há outra camada denominada como camada subendocardial, nesta porção há veias, nervos, ramos de condução do impulso nervoso representado por células de Purkinje (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O miocárdio é a túnica mais espessa do coração, constituído por células musculares cardíacas, os miócitos, esta túnica é o músculo cardíaco propriamente dito. O miocárdio é composto por fibras musculares estriadas, que possuem um ou dois núcleos centrais, arrançadas em padrões espiraladas e dispostas em duas camadas: uma profunda, que dá sustentação às válvulas, e outra superficial, que envolve essa primeira. A orientação dessas fibras é variável, pode ter fibras em várias direções numa pequena área cardíaca. A descrição clássica da orientação das fibras musculares no coração é que há uma camada longitudinal externa, uma camada circular média e uma longitudinal interna. Uma característica das

células musculares cardíacas é a presença de junções intercelulares especializadas, denominadas como discos intercalares (DIDIO, 2002; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Já, o epicárdio, também conhecido como pericárdio visceral, é uma membrana serosa que envolve o coração. O tecido adiposo que geralmente envolve o coração se acumula nesta camada. No epicárdio há uma densa lâmina de tecido conjuntivo, constituído de fibras colágenas e elásticas. Sobre sua superfície externa tem uma monocamada de células mesoteliais, de formato pavimentoso. Na face mais profunda, o epicárdio tem continuação com o epimísio, que tem função de revestimento do músculo cardíaco (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Nos humanos o coração está localizado no mediastino entre os pulmões e posterior ao corpo do esterno. O coração tem forma piramidal, apresentando uma base, um ápice e três faces: diafragmática, esternocostal e pulmonar. Ambas as câmaras atrial direita e esquerda posicionam corretamente nas câmaras ventriculares respectivas, as quais se abrem. Cranialmente, a parede de ambos os átrios formam uma curva para acomodar o tronco aórtico elevado no meio do coração. A musculatura atrial é fina, enquanto que a musculatura ventricular é muito espessa e se dispõe em feixes superficiais e profundos (HO; SÁNCHEZ-QUINTANA, 2009).

As duas câmaras atriais diferem em forma e tem características que permitem distinção entre a morfologia do átrio direito e do átrio esquerdo, sem consideração de sua localização no tórax. Entretanto, ambos os átrios tem a mesma base anatômica: uma porção venosa, uma aurícula (apêndice) e um vestíbulo que orienta as valvas atrioventriculares. As câmaras atriais são separadas pelo septo interatrial. As paredes atriais são compostas de miocárdio atrial de diferentes espessuras (NUNES et al., 2006; HO; SÁNCHEZ-QUINTANA, 2009).

Uma das funções dos átrios é a produção de um hormônio envolvido na manutenção da pressão sanguínea. Quando a parede do átrio está estendida por aumento do volume sanguíneo ou pressão sanguínea, as células produzem o hormônio denominado como fator natriurético atrial, um antagonista do hormônio aldosterona, o qual aumenta o volume sanguíneo. O hormônio natriurético atrial diminui a reabsorção de íons de sódio pelo rim, isto gera um aumento da excreção deste íon pela urina, conseqüentemente aumenta a eliminação de água. Desta forma, o volume e pressão sanguínea são diminuídos (SCANLON; SANDERS, 2007).

Em uma visão cranial, o átrio direito tem forma triangular, a veia cava superior e inferior entram na parede deste átrio. A característica dominante do átrio direito é a sua larga

aurícula de formato triangular, o qual o projeta cranialmente e seu ápice aponta superiormente. Outra característica do átrio direito é a crista terminal visível na superfície do endocárdio. Da margem lateral das cristas chegam uma série de feixes musculares conhecidos como músculos pectíneos que se espalham da crista em direção a porção ventricular. Todas as cristas terminam no vestíbulo. A fossa oval domina a parede posterior atrial. No átrio direito abre-se o seio coronário, veia que drena a musculatura cardíaca. A passagem de sangue do átrio direito para o ventrículo direito é controlada pela valva atrioventricular “tricúspide” (HO; ANDERSEN; SÁNCHEZ-QUINTANA, 2002; HO; SÁNCHEZ-QUINTANA, 2009).

Nos humanos o átrio esquerdo é quadrilátero, a maior parte do átrio esquerdo localiza-se posteriormente à aorta ascendente e ao tronco pulmonar. A parede posterior do átrio esquerdo recebe as quatro veias pulmonares e seus constituintes venosos. A aurícula do átrio esquerdo é consideravelmente menor do que o do átrio direito, e tende a ter uma forma tubular que tem uma ou várias dobras lembrando um pequeno dedo. A morfologia da aurícula varia consideravelmente, mas em virtude de sua forma tubular possui uma junção distinta com o corpo do átrio esquerdo. A zona espessa do átrio esquerdo é confinada principalmente pela sua aurícula. O átrio esquerdo não tem a crista terminal. O corpo do átrio esquerdo une o vestíbulo, o septo e os componentes venosos que tem relativamente paredes lisas. A passagem de sangue do átrio esquerdo para o ventrículo esquerdo é controlada pela valva atrioventricular “bicúspide” ou também denominada como “mitral” (ANDERSON; COOK, 2007; HO; SÁNCHEZ-QUINTANA, 2009).

O ventrículo direito constitui a maior parte da superfície esternocostal do coração e encontra-se separado externamente do ventrículo esquerdo pelos sulcos interventriculares, que correspondem ao septo interventricular no interior do coração (EVANS, 1993; DIDIO, 2002).

Já, o ventrículo esquerdo constitui uma parte menor da face esternocostal e a maior parte da face diafragmática do coração. A parede do ventrículo esquerdo é mais espessa do que a parede do ventrículo direito, por estar diretamente envolvido na circulação sistêmica, a qual bombeia o sangue para o resto do corpo, isto faz que o ventrículo esquerdo tenha maior força de contração do que o ventrículo direito. Os músculos papilares se projetam para dentro da cavidade do ventrículo esquerdo e proporcionam pontos de fixação para as cordas tendíneas (SCANLON; SANDERS, 2007).

3.2 TECIDO CONJUNTIVO DO CORAÇÃO

O tecido conjuntivo é complexo e constituído por uma variedade de componentes. De forma geral, o tecido conjuntivo é formado por células, fibras e substância fundamental. Além de células “nativas” como fibroblastos, osteoblastos e condroblastos, há células que possuem atividade imunológica como os macrófagos, leucócitos e mastócitos, vasos sanguíneos, nervos e outros componentes da matriz extracelular (MEC), como colágeno (em sua forma fibrilar e não fibrilar), fibras do sistema elástico, proteoglicanas, glicoproteínas. O principal componente do tecido conjuntivo é a MEC. A distribuição relativa destes constituintes varia de tecido a tecido e também em relação à idade (PARRY; CRAIG, 1988).

A MEC consiste em variáveis combinações de proteínas fibrosas e substância fundamental. A substância fundamental tem arranjo semelhante a um gel, é um complexo viscoso e hidrofílico de macromoléculas aniônicas e glicoproteínas adesivas. Isto confere rigidez e força tênsil à matriz em associação com outros componentes da MEC (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). A MEC do coração tem por função a preservação da integridade deste órgão, é uma estrutura dinâmica cujos constituintes protéicos são mantidos por controle homeostático (FOMOVSKY; THOMOPOULOS; HOLMES, 2009).

A região constituída por tecido conjuntivo do coração é chamada de esqueleto fibroso que permite inserção da musculatura cardíaca. Fibras de tecido conjuntivo se inserem em torno das fibras musculares cardíacas que se organizam formando o endomísio, o perimísio e o epimísio. O endomísio envolve cada fibra muscular cardíaca, o perimísio envolve o conjunto de feixes de fibras musculares e o epimísio envolve o músculo inteiro (BURLEW; WEBER, 2000). Além da inserção aos feixes do miocárdio e indiretamente das cordas tendíneas, o esqueleto fibroso do coração também está relacionado com os óstios arteriais e atrioventriculares. Este arcabouço possui estruturas interligadas como o trígono fibroso direito e esquerdo, os ânulos fibrosos dos óstios atrioventriculares e dos óstios arteriais, o infundíbulo e a porção membranácea do septo interventricular (EVANS, 1993; DIDIO, 2002).

No interstício do miocárdio, também há tecido conjuntivo e além deste componente há outros como glicosaminoglicanas, glicoproteínas, vasos sanguíneos e nervos. O tecido conjuntivo é formado predominantemente por colágeno tipo I e III e em menor quantidade de fibronectina, laminina e fibras elásticas. No miocárdio, a matriz de colágeno intersticial envolve e dá suporte aos miócitos cardíacos e a microcirculação coronariana. O colágeno intersticial junto com outros componentes do interstício funcionam como um arcabouço em

que estão apoiados os miócitos, os componentes do sistema circulatório e linfático por meio dos quais macromoléculas, eletrólitos, oxigênio e restos de produtos metabólicos todos passarão pelo processo de difusão (ROBINSON et al., 1986; SOUZA, 2002).

O colágeno é uma macromolécula da MEC que possui conformação em tripla hélice. A unidade monomérica do colágeno é denominada tropocolágeno, estas unidades se polimerizam e formam fibrilas. As fibrilas se agregam e constituem as fibras de colágeno. Esta macromolécula, o colágeno, é reconhecida por possuir o aminoácido glicina repetida a cada terceira posição da sequência e também pela presença dos aminoácidos hidroxiprolina e hidroxilisina. O colágeno tem por principal função a resistência à tensão e integridade estrutural a diversos órgãos e tecidos (RICH; CRICK, 1955; REST; GARRONE, 1991).

Assim como o colágeno, a elastina é uma macromolécula da MEC. O precursor da elastina é uma molécula denominada tropoelastina. As fibras elásticas são constituídas tanto de componentes fibrilar como de constituinte amorfo. Estas fibras possuem um revestimento de microfibrilas ricas em fibrilina, estas formam o arcabouço necessário para a deposição de elastina. Há três tipos de fibras do grupo das elásticas: oxitalânicas, elaunínicas e elásticas, cada uma com propriedades químicas próprias (GREENLEE, JR.; ROSS; HARTMAN, 1966; KIELTY; SHERRATT; SHUTTLEWORTH, 2002; USHIKI, 2002).

Uma das propriedades das fibras elásticas é a sua estabilidade em diferentes condições fisiológicas permanecendo no tecido por todo o tempo da vida do organismo. As fibras elásticas possuem distribuição heterogênea nos tecidos, em virtude da intensidade e direcionamento das forças que são aplicadas (KIELTY; SHERRATT; SHUTTLEWORTH, 2002; USHIKI, 2002).

O colágeno do tipo III faz parte da constituição predominante das fibras reticulares. Esta fibra forma uma rede em alguns órgãos, por isso recebeu essa denominação (do latim *rete* – rede). Outra característica das fibras reticulares é a sua afinidade por sais de prata, desta forma, são também conhecidas como argirófilas. As fibras reticulares formam uma unidade estrutural no apoio dos componentes celulares, além desta função, estas fibras auxiliam na manutenção das estruturas (USHIKI, 2002).

A influência do colágeno nas propriedades mecânicas e comportamentais do miocárdio é complexa. Há uma variedade de fatores envolvidos como alinhamento, configuração e localização das fibras de colágeno relativas ao músculo cardíaco; a extensão da fibra de colágeno interligada; as proporções relativas dos tipos de colágeno; e a quantidade de colágeno presente (WEBER; BRILL; JANICKI, 1990). Medugorac e Jacob (1993) mostraram por análise em gel de eletroforese que o miocárdio de rato e de primata não

humano possui colágeno tipo I e III. Neste estudo verificou-se que a matriz de colágeno no miocárdio destes animais consiste principalmente de colágeno tipo I (aproximadamente 85%) e colágeno tipo III (aproximadamente 11%).

O colágeno tipo I apresenta uma estrutura mais rígida e é responsável pela força tensional de resistência no tecido, já o tipo III possui uma estrutura mais elástica e é responsável por manter a função estrutural dos órgãos expansíveis como útero, artérias e músculos (SOUZA, 2002).

Fibroblastos intersticiais são responsáveis pelo rearranjo de colágeno sob condições normais. Em caso de doença relacionada ao miocárdio, uma população fenotipicamente transformada de células que se assemelham aos fibroblastos surge. Estas células são denominadas de miofibroblastos, as quais provavelmente são derivadas dos fibroblastos intersticiais ou das células da camada adventícia da coronária. Os fibroblastos atuam na regulação normal de colágeno no miocárdio intersticial, enquanto os miofibroblastos comandam a fibrogênese, ou seja, a deposição de colágeno e resultante remodelamento da MEC durante o reparo mediante uma injúria tecidual (BURLEW; WEBER, 2000).

Como referido anteriormente, o tecido conjuntivo no músculo cardíaco atua como reparador mediante a algumas lesões neste tecido, por meio de acúmulo de constituintes do conjuntivo, especialmente, colágeno tipo I. Uma resposta patológica a injúrias no tecido cardíaco é o desenvolvimento da fibrose, o qual envolve predominantemente acumulação de constituintes da MEC no tecido e frequentemente ocorre mudança na qualidade da MEC. Desta forma, dependendo da dimensão e localização da deposição de colágeno, o funcionamento cardíaco pode ser afetado, provocando comprometimento da irrigação em diversos órgãos e menor contratilidade do músculo cardíaco (BAN; TWIGG, 2008).

O processo de remodelamento da MEC, geralmente, melhor estudado no ventrículo esquerdo, envolve alterações nos constituintes da MEC e nos miócitos, incluindo a ativação de enzimas proteolíticas e organização do colágeno miocardial (REGAN et al., 1981; NUNES et al., 2006). A fibrose atrial, comparada a fibrose ventricular é menos estudada, porém sua ocorrência afeta propriedades eletrofisiológicas do átrio produzindo um remodelamento elétrico e causando heterogeneidade na condução do impulso, esse mecanismo funciona como substrato para fibrilação atrial. O mecanismo preciso e as vias de sinalização que envolve o desenvolvimento da fibrose atrial são pouco entendidos, portanto, foi observado que o átrio é mais susceptível a fibrose do que os ventrículos. Fatores tanto hemodinâmicos ou não-hemodinâmicos possivelmente têm ligação na deposição de colágeno no miocárdio atrial.

Três vias são consideradas na fibrose atrial: o sistema renino-angiotensina, TGF β 1 (*transforming growth factor- β 1*) e vias de estresse oxidativo (EVERETT; OLGIN, 2007).

O mecanismo renino-angiotensina é ativado nos rins mediante a uma deficiência de sódio, perda de sangue ou desidratação que diminuem a pressão e o volume sanguíneo. A deficiência em sódio é um estímulo para a liberação de renina. Isto culmina com a formação de angiotensina II que causa vasoconstrição e estimula a secreção de aldosterona pelo córtex adrenal. Aldosterona eleva a concentração de sódio, pois inibe sua excreção e aumenta a retenção de água pelos rins para restaurar o volume e a pressão sanguínea normal (SCANLON; SANDERS, 2007; BROWN, 2009).

A angiotensina II é indicada como mediadora do crescimento da matriz de colágeno, capaz de induzir a proliferação de fibroblastos e ativar a síntese de colágeno por meio destas células. A angiotensina II regula a produção de miofibrilas pela via TGF β 1 de interação receptor-ligante. Esta citocina regula a transcrição do RNAm do colágeno tipo I e tipo III nos sítios de injúria no miocárdio. Bonfim e Madarin-Lacerda (2003) verificaram o que ocorreria mediante a inibição da Enzima Conversora de Angiotensina II (ECA) durante o período gestacional e se esta inibição alteraria a estrutura cardíaca pela diminuição do conteúdo de colágeno. As ratas deste estudo eram espontaneamente hipertensas. A observação da matriz colágena vista em microscopia de luz ressaltou diferenças do grupo não tratado com a droga inibidora da angiotensina II, o enalapril, em relação ao grupo controle. Foi visto maior espessura da fibra colágena em animais não tratados com enalapril, diante disto, observa-se a relação entre angiotensina II e a modulação de colágeno.

Alguns estudos (KUPFAHL et al., 2000; SEELAND et al., 2002; SCHNEIDER, 2002) mostram o papel importante de TGF β 1 na síntese de proteínas da MEC, como colágeno, proteoglicanas e fibronectina. Camundongos transgênicos com superexpressão de TGF β 1 mostraram fibrose no miocárdio, por maior concentração de colágeno tipo I e tipo III comparado com o grupo controle do estudo. Outra importante observação deste estudo foi que a super-expressão de TGF β 1 inibiu a atividade enzimática de degradação de colágeno indicando que este fator de crescimento pode atuar modulando as metaloproteinases (SEELAND et al., 2002). Metaloproteinases representam uma grande família de enzimas remodeladoras da MEC, pois atuam na sua degradação. Dentro deste grupo, há as collagenases, específicas na degradação do colágeno. As metaloproteinases são sintetizadas por células mesenquimais (ASHWORTH et al., 1999).

Estresse oxidativo também pode regular a síntese de colágeno e a atividade das metaloproteinases nos miofibroblastos. Estudo *in vitro* de fibroblastos cardíacos de ratos

adultos e neonatais foram expostos ao estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio. Isto acarretou em diminuição da expressão do RNAm de protocólágenos, mas aumentou a expressão do RNAm da fibronectina, sugerindo um efeito seletivo na biossíntese de proteínas da MEC. Outra observação deste estudo foi em relação às metaloproteinases que tiveram sua atividade aumentada. Em um processo patogênico, o estresse oxidativo mostra um papel relevante na remodelação da MEC (SIWIK; PAGANO; COLUCCI, 2001).

A rede de colágeno miocárdial é essencial aos mecanismos do coração. Na sístole, os miócitos suportam a maior parte do estresse na parede ventricular, mas a trama de colágeno ao redor apóia a força transmitida e ajuda a manter o alinhamento dos miócitos. Na diástole, fibras de colágeno do perimísio desenrolam com o relaxamento do ventrículo, uma vez que estas fibras alinham, elas resistem à expansão completa, representando a porção íngreme da curva de pressão e volume no final da diástole e protegendo os miócitos do estiramento demasiado (FOMOVSKY; THOMOPOULOS; HOLMES, 2009).

3.3 RELAÇÃO ENTRE DIABETES E CARDIOMIOPATIAS

Diabetes Mellitus é uma doença caracterizada pela anormalidade dos níveis de glicose (açúcar) no sangue. Quando há aumento nos níveis de glicose, por exemplo, após uma refeição, isto causa a liberação do hormônio insulina do pâncreas. Este hormônio estimula células adiposas, células musculares esqueléticas e cardíacas removerem glicose do sangue, além disso, estimula o fígado a metabolizar a glicose fazendo com que o nível de açúcar no sangue diminua até atingir o nível normal de concentração. Desta forma, quando há excesso de glicose, ocorre a retomada deste açúcar pelos miócitos do músculo esquelético e cardíaco que o estocam na forma de glicogênio, assim como, pelos adipócitos que converterão a glicose em triglicerídeos. A glicose captada pelos miócitos e adipócitos é mediada pelo transportador GLUT4. Insulina liberada do pâncreas em resposta ao aumento de glicose no sangue provoca o movimento de vesículas intracelulares contendo transportadores se fusionem com a membrana plasmática, expondo GLUT4 na superfície celular. Quando o nível de glicose retorna ao normal, lentamente ocorre a liberação de insulina e GLUT4 (LEHNINGER, 2004).

Em pacientes com diabetes, o nível de açúcar no sangue permanece alto. Isto pode ser causado pela deficiência de insulina ou em seu funcionamento anormal. A forma mais comum

de diabetes são as do tipo I também denominados de insulino-dependentes (5%) a qual é caracterizada por uma doença auto-imune; e o tipo II ou não insulino-dependentes (95%), a qual é associada com a obesidade. Há também outros tipos de diabetes, como a gestacional que ocorre durante a gravidez, e outra forma de diabetes que é muito rara ocorre pela mutação de um único gene (DEAN; MCENTYRE, 2004).

Todas as formas de diabetes são caracterizadas por hiperglicemia e desenvolvimento de patologias microvasculares e macrovasculares específicas. As complicações no quadro de diabetes que podem ser classificadas como microvasculares se referem à retinopatia, nefropatia, neuropatia e as macrovasculares afetam a vascularização periférica, cerebral e coronária. Geralmente, há uma tendência do diabetes tipo I estar mais associada com complicações microvasculares, ao passo que diabetes tipo II pode estar mais associada com complicações macrovasculares. Entretanto, estas complicações tanto macro e microvasculares afetam ambos os tipos de diabetes (BROWNLEE, 2001).

As complicações micro e macrovasculares estão associadas com a hiperglicemia, provavelmente por quatro vias: aumento do fluxo da atividade da via de poliol; aumento na formação de AGEs; ativação das isoformas da proteína C quinase (PKC – *protein kinase C*) e aumento do fluxo da via de hexosamina (KING et al., 1994; BROWNLEE, 2001).

A atividade da via poliol consiste na conversão da glicose em seu derivado, o álcool sorbitol, na presença da enzima aldose redutase. O sorbitol entra livremente nas células e metaboliza lentamente, acarretando em acúmulo desta substância intracelularmente. Sorbitol não difunde facilmente através das membranas celulares resultando em um dano osmótico para células. Nas células nervosas, pode ocorrer acúmulo de sorbitol na membrana das células de Schwann o que ocasiona alteração da função dos nervos (BROWNLEE, 2001; SHANN, 2003).

Proteínas glicosiladas não enzimaticamente formam complexos protéicos denominados de AGEs. Os AGEs se ligam aos seus receptores (RAGE) causando danos aos tecidos. No endotélio a ativação de AGEs causa ativação de macrófagos, liberação do TNF- α , citocinas, fatores de crescimento e diminuição de óxido nítrico (vasodilatador). AGEs podem agir por três mecanismos diferentes: primeiro, por modificação de proteínas intracelulares, as quais tem função alterada; segundo, por alterações nos componentes da MEC e receptores (integrinas) para matriz nas células, ou seja, a formação de AGEs é capaz de romper as interações entre matriz-matriz e matriz-células; terceiro, proteínas plasmáticas são modificadas por precursores de AGEs ligados aos receptores nas células endoteliais, células mesangiais glomerulares e macrófagos (BROWNLEE, 2001).

A família PKC compreende pelo menos onze isoformas. A PKC é uma quinase serina/treonina, responsável assim como outras quinases, por uma série de respostas celulares mediadas por receptores e vias metabólicas que podem ser ativadas e desativadas por estas proteínas. Sua atividade é catalisadora da transferência de um grupo fosfato (ATP) para várias proteínas substratos. A PKC também sofre fosforilação antes de entrar em ação, o que ocorre durante a sua translocação do citosol para a membrana plasmática em resposta ao aumento transitório de DAG (diacilglicerol). O DAG é o principal ativador fisiológico da PKC, ativa nove das onze isoformas de PKC. O aumento de DAG pela hiperglicemia ativa uma ou mais isoformas de PKC. A PKC regula uma série de funções vasculares como permeabilidade vascular, oclusão vascular, contratilidade, proliferação celular, síntese da MEC e transdução de sinais para várias citocinas e hormônios. Entretanto, a ativação de PKC pode alterar o fluxo sanguíneo em diversos tecidos (KING et al., 1994; SHANN, 2003).

A via da hexosamina converte a frutose-6-fosfato, que é transformada em N-acetilglicosamina-6-fosfato pela enzima GFAT. Outra conversão ocorre de N-acetilglicosamina em UDP-N-acetilglicosamina que modula a expressão de fatores de transcrição, como PAI-I e TGF- α e TGF- β . Desta forma, esta via pode provocar aumento na transcrição de genes que induzem a hiperglicemia.

Todas estas vias culminam com a formação de superprodução de radical superóxido (O_2^-) pela cadeia de transporte de elétron mitocondrial (BROWNLEE, 2001; CORRÊA-GIANNELLA; VIEIRA, 2008). O excesso de O_2^- contribui com a formação de vários metabólicos que são utilizados nas quatro vias responsáveis por causar danos mediante a hiperglicemia, o que leva este processo em um ciclo vicioso que aumenta ainda mais a geração de O_2^- (CORRÊA-GIANNELLA; VIEIRA, 2008).

Especificamente, os distúrbios no metabolismo da glicose podem levar a alguns problemas relacionados com doenças cardíacas como: hipertensão arterial sistêmica, doença arterial coronariana e insuficiência cardíaca. Há evidências que pessoas diabéticas também podem sofrer de doença miocárdica não relacionada à doença arterial coronariana ou hipertensão. Este tipo de patologia recebeu a denominação de cardiomiopatia diabética. Cerca de 30% de pacientes diabéticos tipo I apresentam este tipo de miocardiopatia. Fibrose perivascular e intersticial, assim como hipertrofia miocárdica também estão relacionadas em pessoas com diabetes (OKOSHI et al., 2007).

Cardiomiopatia diabética parece estar relacionada com hipertrofia cardíaca e aumento da rigidez miocárdica, ambos independentes de hipertensão. Este tipo de miocardiopatia ainda não é bem entendido. O miocárdio do diabético é suscetível aos processos de morte celular

tanto por apoptose como por necrose. Isto porque, a hiperglicemia está associada com a produção de espécies reativas de oxigênio, o estresse oxidativo contribui para aceleração da apoptose. Outra forma, da hiperglicemia contribuir com a morte celular ocorrem por meio da glicosilação e fosforilação de p53 e também excessiva síntese de angiotensina II (ANEJA et al., 2008).

Os três distúrbios característicos do diabetes são: hiperlipidemia (geralmente relacionado ao aumento de triglicerídeos e ácidos graxos), hiperinsulinemia nas fases mais precoces e após falência das células β pancreáticas e hiperglicemia já bem relatada nesta revisão. Todos estes distúrbios induzem alterações nos fatores de transcrição dos miócitos cardíacos e consequentemente resultam em modificações na expressão gênica. Além disso, podem ocorrer alterações na utilização miocárdica de substratos, crescimento e aumento da rigidez miocárdica e disfunção endotelial (OKOSHI et al., 2007). Disfunção cardíaca em diabetes é frequentemente caracterizada por um prévio aumento da rigidez diastólica que pode progredir para disfunção sistólica (AVENDANO et al., 1999).

Um importante desafio para o diagnóstico clínico da cardiomiopatia diabética é ausência de alterações histopatológicas ou imagens características associadas com este diagnóstico. A presença de fibrose não é um seguro indicador de cardiomiopatia diabética, já que pode estar associada a outras cardiomiopatias (ANEJA et al., 2008).

Em um estudo utilizando um grupo experimental de animais com diabetes, entretanto, com manutenção do peso corporal foi realizado para determinar se o fornecimento de reposição de insulina no início do curso da doença poderia influenciar na constituição do miocárdio. A insulina foi administrada na hora da refeição quando o seu requerimento é máximo e o potencial para hipoglicemia é reduzido. Após 12 meses de observação, a função do ventrículo esquerdo foi comparada no grupo com diabetes não tratados e tratados com níveis iniciais similares de intolerância à glicose. Em termos de composição do miocárdio, foi observado que a principal proteína do interstício, o colágeno, foi quantitativamente alterada nos animais com diabetes. Ocorreu um aumento na concentração de colágeno do grupo diabético não tratado na parede do ventrículo esquerdo. Isto não ocorreu no grupo tratado com insulina, em que as concentrações de colágeno permaneceram iguais. Desta forma, observou-se a relação entre diabetes e colágeno intersticial (REGAN et al., 1981).

Em pacientes diabéticos, altos níveis de AGEs estão correlacionado com a rigidez diastólica do ventrículo esquerdo, além disso, pode ocorrer a ligação cruzada de colágeno com AGEs que podem contribuir com a disfunção diastólica (FOMOVSKY; THOMOPOULOS; HOLMES, 2009). AGEs fazem parte de uma classe de moléculas heterogêneas formada por

meio de reações aminocarbonilo de natureza não-enzimática (BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2008). Agentes que previnem ou reduzem AGEs tem demonstrado promessa no mecanismo de normal função diastólica em modelos experimentais de diabetes. Os efeitos dos AGEs nos tecidos está relacionado com a capacidade destes compostos de alterar as propriedades químicas e funcionais de diversas estruturas celulares, por meio da geração de radicais livres; formação de ligações cruzadas com proteínas, por exemplo, colágeno; ou alterações com receptores celulares (FOMOVSKY; THOMOPOULOS; HOLMES, 2009).

Complicações cardiovasculares são principalmente responsáveis pela alta morbidade e mortalidade em pessoas com diabetes. Cardiomiopatias, doenças relacionadas ao músculo cardíaco segue três classificações: dilatada, hipertrófica e restritiva. O acometimento do miocárdio de origem desconhecida é denominado como idiopático. Alguns tipos de cardiomiopatias podem ocorrer por fatores genéticos, dano ao coração como, por exemplo, decorrente de ataque cardíaco, pressão alta, infecção viral. Entretanto, também pode ocorrer sem causa específica (MADY; FERNANDES, 1997; THIENE; CORRADO; BASSO, 2007).

A cardiomiopatia dilatada afeta tanto os ventrículos como os átrios. Geralmente, esta patologia começa no ventrículo esquerdo, onde ocorre uma dilatação de sua parede, posteriormente atinge o ventrículo direito e por último as câmaras atriais. A dilatação impede que o coração bombeie sangue adequadamente, e subseqüentes dilatações ocorrem ainda mais, até o coração ficar muito fraco e ocorrer insuficiência cardíaca. Além disto, este tipo de cardiomiopatia pode ocasionar problemas nas valvas cardíacas, produzir arritmias e coágulos no coração (NUNES et al., 2006).

A cardiomiopatia hipertrófica ocorre quando há um engrossamento da parede do músculo cardíaco, geralmente isto ocorre no ventrículo esquerdo, que já normalmente é mais espesso do que o ventrículo direito. A cardiomiopatia hipertrófica pode ser obstrutiva ou não-obstrutiva. No tipo obstrutivo, o espessamento das paredes que separam o lado direito e esquerdo do coração formam uma saliência que verte para o ventrículo esquerdo. Isto bloqueia o fluxo de sangue para fora do ventrículo, forçando o ventrículo esquerdo a trabalhar mais para permitir que o sangue passe pelo bloqueio e vá para a circulação sistêmica. Pode ocorrer disfunção da valva mitral, fazendo que o sangue vaze novamente para esta valva. No tipo não-obstrutivo, não ocorre o bloqueio. Mas, ambos os tipos torna o interior dos ventrículos menor, desta forma, diminuindo a retenção de sangue (NUNES et al., 2006; THIENE; CORRADO; BASSO, 2007).

A cardiomiopatia restritiva, os ventrículos tendem a ficar tensos e rígidos, em virtude da substituição do músculo cardíaco por tecido cicatricial. Isto influencia na sístole e diástole,

causando alterações no fluxo sanguíneo, assim, pode ocorrer insuficiência cardíaca ou arritmias (NUNES et al., 2006).

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

O material e métodos utilizados nesta pesquisa estão descritos abaixo.

4.1 OBTENÇÃO DOS ANIMAIS E COLHEITA DAS AMOSTRAS

Para o desenvolvimento deste estudo foram utilizados 5 cães saudáveis e 5 cães com diabetes, sem raça definida (SRD), machos e fêmeas, com idade média para cães saudáveis de 5 anos e idade média para animais diabéticos de 9 anos. Os cães saudáveis foram selecionados pela ausência de histórico de alteração cardíaca, mediante comprovação eletrocardiográfica e/ou ecocardiográfica. Os cães diabéticos foram confirmados por meio de exames clínicos, os quais foram observados características típicas do diabetes como polifagia, polidipsia, poliúria e emagrecimento. A glicemia dos cães diabéticos era superior a 200 mg/dl quando não tratados, assim apresentando um quadro de glicemia aguda descompensada. Todos os animais diabéticos eram tratados com terapia insulínica regularmente.

Os exames foram realizados no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). Dessa forma, dos animais incluídos neste estudo foram coletados em fichas de protocolo dados complementares referentes à idade, sexo e causa da morte. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) sob o protocolo de número: 1544/2008.

Após a morte dos animais, os corações foram colhidos imediatamente, por meio da incisão das costelas e abertura lateral feita na cavidade torácica pelo lado esquerdo dos animais. Posteriormente, os corações retirados foram lavados. Os átrios direito e esquerdo foram separados por dissecação. Os fragmentos do terço médio das paredes atrial direita e esquerda foram retirados, excluindo regiões próximas a desembocadura dos vasos. Os fragmentos dos átrios direito e esquerdo dos corações deste estudo foram fixados em solução de formol 10%, em nitrogênio líquido com posterior armazenagem em freezer a -80°C e também em solução de Karnovsky's (2,0% paraformaldeído, 2,5% glutaraldeído e 0,1M tampão fosfato).

4.2 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Os fragmentos após fixação foram processados histologicamente. Estes fragmentos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol e incluído em blocos de Paraplast® (Leica, Germany). Cada bloco conteve apenas um segmento de cada átrio. Os blocos de paraplast foram incluídos transversalmente e seccionados com 5 µm de espessura em micrótomo. Para posterior confecção das lâminas, o material seccionado seguiu o protocolo de desparafinização em xilóis, hidratação em concentrações decrescentes em etanol e hidratação em água filtrada. Após a coloração, a desidratação ocorreu em concentrações crescentes de etanol, diafanização em xilóis e montagem em meio de resina Permunt® (Fisher Scientific, Fair Law, New Jersey, USA).

4.3 COLORAÇÕES HISTOLÓGICAS

Neste estudo foram utilizadas as seguintes colorações histológicas:

a) Para caracterização morfológica do tecido cardíaco foi utilizado Hematoxilina e Eosina (HE);

b) Para verificar a distribuição e a orientação das fibras colágenas tipo I, as lâminas foram imersas em solução de Ácido Fosfomolibdico 2 % por 1 minuto para diferenciação das fibras colágenas, posteriormente foram lavadas em água filtrada e coradas em solução de Picrossirius por 1 hora. O procedimento adotado foi preconizado em Junqueira, Bignolas e Brentani (1979) e Montes e Junqueira (1991). Esta preparação histológica foi examinada em microscopia de luz normal e de polarização.

Para quantificar a distribuição de colágeno na parede atrial dos cães saudáveis e diabéticos foram usados 20 campos não sequenciais para cada animal. As lâminas foram fotomicrografadas com a objetiva de 40x, foram usados 4 cortes seriados, fotomicrografados 5 campos por corte, totalizando 20 campos, utilizando microscopia de luz (sem polarização). A imagem digitalizada contrasta as fibras colágenas da coloração de fundo por limiar de cor, assim é possível obter sua porcentagem utilizando um programa de análise. A taxa média de colágeno por região foi obtida por meio da razão entre a medida da área preenchida por fibras colágenas pela superfície total das fotomicrografias ($148732669369172\mu\text{m}^2$). Esta contagem é

feita automaticamente pelo Programa de Imagens Axio Vision 4.7 da Zeiss®, o qual fornece o resultado em porcentagem.

c) A distribuição das fibras elásticas no interstício dos átrios foi examinada pela coloração de Orceína a 1% diluída em álcool 70% por 30 minutos. Após lavagens em água destilada e em álcool 70%, as lâminas foram diferenciadas em uma solução de álcool-ácido (1 ml de ácido clorídrico e 99 ml de álcool 70%) durante 30 segundos. Posteriormente, as lâminas foram contracoradas com HE, e seguiu-se o processo padrão de histologia até montagem das lâminas (BANCROFT; STEVENS, 1996).

d) As fibras reticulares que são constituídas pela proteína colágeno do tipo III foram demonstradas pelo método de impregnação por prata Gordon e Sweets. As lâminas foram oxidadas por uma solução de permanganato de potássio 1%, após foram clareadas por uma solução de ácido oxálico 1%. Em seguida, as lâminas foram embebidas em uma solução de sulfato de amônio férrico 2,5% que atua como sensibilizador, a impregnação pela prata foi realizada por uma solução de nitrato de prata amoniacal. Essa solução é reduzida na forma metálica visível pela solução de formalina a 10%. Foi ainda utilizada uma solução de cloreto de ouro 0,2% que dá tonalidade às secções. Para remover os resíduos da prata que não foram reduzidos, foi usada uma solução de tiosulfato de sódio a 5% (BANCROFT; STEVANS, 1996).

4.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA

A Imunofluorescência foi realizada a partir de amostras dos átrios armazenadas no freezer -80°C e cortadas no criostato para avaliação qualitativa do colágeno tipo I e tipo III, possibilitando a diferenciação entre estes tipos de colágeno. Para marcação específica do colágeno I, as lâminas foram imersas em solução de pepsina (Sigma, Aldrich, St. Louis, USA) 2 mg/500 µl em ácido acético 0,5 N, por 20 minutos na estufa a 37°C. A seguir, todas as lavagens foram feitas em PBS (*phosphate buffer saline*) por 3 vezes durante 5 minutos. Para bloqueio das proteínas não específicas, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários diluídos em PBS/BSA (*albumin serum bovine*) 1%. Os anticorpos primários específicos para colágeno tipo I e tipo III (Rockland, Philadelphia, Pennsylvania, USA) foram diluídos respectivamente a 1:50 e a 1:100, foram incubados previamente por 30 minutos a 37°C e posteriormente foram incubados a 4°C pernoite. A reatividade foi detectada por

incubação com anticorpo secundário IgG de cabra anti-coelho (Sigma, Aldrich, St. Louis, USA) conjugado com fluorescência FITC por 90 minutos, com diluição de 1:50 em PBS/BSA a 1%. Para visualização dos núcleos foi usado iodeto de propídeo (40 μ l/100 ml de PBS) por 10 minutos. As lâminas foram montadas com Vectashield® (Vector Laboratories) e esmalte. A armazenagem das lâminas foi realizada em geladeira a 4°C no escuro até a documentação fotomicrográfica.

4.5 ANÁLISE ESTRUTURAL

Para a avaliação do arranjo estrutural arquitetônico e tridimensional das fibras de colágeno, os fragmentos atriais dos corações perfundidos com solução de Karnovsky foi realizada a técnica de digestão controlada. Foi realizada a digestão da matriz extracelular, entretanto com a manutenção da arquitetura do colágeno, segundo a técnica preconizada por Ohtani (1987): maceração em solução aquosa de NaOH a 10% a temperatura ambiente por 8 a 10 dias até o material ficar com coloração marrom transparente; posterior maceração em água destilada por 5 a 10 dias a temperatura ambiente, até o material adquirir coloração branca transparente; lavagens foram feitas com PBS 0,1M 3 vezes de 10 minutos cada lavagem; foi realizada a impregnação com ácido tânico a 1% em PBS 0,1 M por 2 horas; novamente foi feita lavagem com PBS 0,1 M 3 vezes de 10 minutos; seguidamente foi realizado pós-fixação com tetróxido de ósmio a 1% em PBS 0,1 M por 3 horas; nova lavagem com PBS 0,1 M 3 vezes de 10 minutos; posteriormente foi feito o congelamento em água destilada, em seguida, fratura com auxílio de lâmina; desidratação em série crescente de álcool etílico (50, 70, 95, 100°GL) totalizando 2 horas; *critical point*; montagem em *stubs*; metalização em ouro.

Todas as observações foram feitas em microscópio eletrônico de varredura a 20 kV, marca LEO, modelo 435VP (Setor de Anatomia do Departamento de Cirurgia – FMVZ/USP).

4.6 DOCUMENTAÇÃO E FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

As lâminas foram avaliadas utilizando microscópio óptico Olympus BX 60 (Carl Zeiss, Germany), acoplado à câmera Axio CAM HRC, utilizando o programa de análise de imagem Axio Vision 4.7 da Zeiss®.

Os dados coletados e tabulados foram avaliados estatisticamente, mediante aplicação de testes que sinalizem a condição de diferenças entre valores médios de cada região. A distribuição das amostras foi normal e desta forma foram utilizados testes paramétricos. Nas análises em que apenas dois parâmetros foram avaliados foi utilizado o teste t de Student, com nível de significância de 5%. Para a comparação de todos os parâmetros quantificados foi utilizado à análise estatística de variância (ANOVA), com nível de significância de 5%, utilizando o pós-teste de Tukey para a identificação das possíveis diferenças. Para teste de correlação entre duas variáveis foi usado o teste de Correlação de Pearson, cujo nível de significância foi de 5%.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos encontram-se organizados em subseções relativas à caracterização morfológica, avaliação estrutural e quantificação de colágeno, caracterização de fibras elásticas e fibras reticulares, comparando estes constituintes nos átrios de cães saudáveis e diabéticos.

5.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

O grupo de animais saudáveis apresentou tais características morfológicas: no átrio direito, o endocárdio é constituído por uma fina camada de células endoteliais sustentadas por uma camada de tecido conjuntivo delgada; nos animais com diabetes, o átrio direito apresentou uma camada endocárdica semelhante aos animais saudáveis. A diferença observada do átrio direito do animal com diabetes comparado ao átrio de animais saudáveis foi no miocárdio. Os animais com diabetes mostraram maior deposição de feixes de tecido conjuntivo nesta túnica (Figura 1 A e B). O epicárdio apresentou tanto nos animais saudáveis quanto nos animais diabéticos uma camada de células mesoteliais apoiada em tecido conjuntivo que geralmente continha tecido adiposo ao redor. Nos animais diabéticos, a camada epicárdica mostrava uma espessura maior do que nos animais saudáveis.

Microscopicamente, o endocárdio do átrio esquerdo apresentou maior espessura do que a porção endocárdica do átrio direito. Entre os animais saudáveis e com diabetes, também foi observada maior espessura do endocárdio nos animais com diabetes. A região do miocárdio no átrio esquerdo dos animais saudáveis mostrou feixes musculares organizados. Já no átrio esquerdo dos animais com diabetes foi visto maior deposição de reentrâncias de feixes de conjuntivo no miocárdio comparado aos animais saudáveis (Figura 1 C e D). Assim, como citado anteriormente para o átrio direito, no átrio esquerdo o epicárdio não apresentou características morfológicas diferentes entre animais saudáveis e diabéticos, exceto em sua espessura que era maior nos animais com diabetes.

Figura 1 - Fotomicrografias da morfologia dos átrios direito e esquerdo comparando cães saudáveis e diabéticos. (HE). Figura A: átrio direito animal saudável. Figura B: átrio direito animal diabético. Figura C: átrio esquerdo animal saudável. Figura D: átrio esquerdo animal diabético. Observar as regiões do endocárdio = E; subendocárdio = SE; miocárdio = M; tecido adiposo = TA; artérias = A e veias = V. Barra = 200 μ m

Quando se comparou a organização tecidual entre os animais saudáveis e animais com diabetes, foi observado que nos animais saudáveis que o arranjo estrutural estava mais definido tanto na porção fibrosa quanto na porção muscular, isto foi visto tanto no átrio direito como no átrio esquerdo. Nos cães saudáveis, os discos intercalares estavam bem definidos, limitando uma célula a outra, já nos animais diabéticos os miócitos estavam desorganizados, e a visualização dos discos intercalares estava mal definida (Figura 2).

Figura 2 - Fotomicrografias da morfologia dos átrios direito e esquerdo comparando cães sadios e diabéticos. (HE). Figura **A**: átrio direito animal sadio. Figura **B**: átrio direito animal diabético. Figura **C**: átrio esquerdo animal sadio. Figura **D**: átrio esquerdo animal diabético. Notas: epicárdio = **EP**; miocárdio = **M**; tecido adiposo = **TA**; tecido conjuntivo = **TC**; discos intercalares (**seta**). Barra = 50 μ m

5.2 AVALIAÇÃO ESTRUTURAL E QUANTIFICAÇÃO DAS FIBRAS COLÁGENAS

No átrio, o colágeno faz parte da camada subendocárdica, no espaço subepicárdico e também no interstício. As maiores diferenças qualitativas observadas quanto ao colágeno subendocárdico e subepicárdico estava relacionado à espessura. Nos animais com diabetes, estas duas camadas apresentavam maior espessura do que nos animais sadios. Ainda na observação qualitativa, o colágeno intersticial apresentou maiores inserções de feixes de colágeno nos corações dos animais diabéticos do que nos animais sadios (Figura 3).

Figura 3 - Fotomicrografias da morfologia dos átrios comparando cães saudáveis e diabéticos. (Picrosirius). Figura A: átrio de animal saudável. Figura B: átrio de animal diabético. Figura C: átrio de animal saudável. Figura D: átrio de animal diabético. Notas: tecido conjuntivo = TC; Tecido muscular = TM; vasos = VA; colágeno intersticial (seta). Barra = 200 μ m para figura A e B. Barra = 50 μ m para C e D.

Quanto à observação da orientação das fibras de colágeno nos átrios, estas fibras mostraram-se unidirecionais no espaço subendocárdico e subepicárdico. Destas túnicas partiam os feixes de colágeno intersticial, no miocárdio que mostraram direções aleatórias. As fibras colágenas do endocárdio e do epicárdio direcionavam-se paralelamente para o interstício miocárdial, onde formavam um arcabouço que alinhava os miócitos cardíacos. Não foi vista diferença quanto à orientação das fibras colágenas entre animais saudáveis e animais com diabetes, como citado anteriormente, estas fibras apresentaram direções aleatórias (Figura 4).

Figura 4 - Fotomicrografias da morfologia dos átrios comparando cães saudáveis e diabéticos. (Picrosirius luz normal e luz polarizada). Figura A: átrio de animal saudável fotomicrografado com luz normal. Figura B: átrio de animal saudável fotomicrografado com luz polarizada. Figura C: átrio de animal diabético fotomicrografado com luz normal. Figura D: átrio de animal diabético fotomicrografado com luz polarizada. Notas: tecido conjuntivo = **TC**; Tecido muscular = **TM**; colágeno intersticial (*seta*). Barra = 200 μ m para figura A e B. Barra = 50 μ m para C e D.

A quantificação de colágeno intersticial mostrou maior taxa percentual de colágeno nos animais diabéticos comparados aos animais saudáveis quando se analisou esta relação entre átrio direito dos animais saudáveis (3,897%) e átrio direito dos animais diabéticos (4,118%), e da mesma forma com o átrio esquerdo comparando animais saudáveis (3,349%) e diabéticos (3,699%). Comparando todos os grupos, a maior taxa de colágeno ocorreu no átrio direito tanto de animais saudáveis como de diabéticos. Entretanto, a análise dos átrios direito e esquerdo entre animais saudáveis e diabéticos não apresentou diferença estatística significativa, tanto quando se analisou intergrupos, por exemplo, átrio direito de animais saudáveis com o átrio direito de animais diabéticos, quando se analisou estatisticamente possíveis diferenças entre todos os grupos (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores médios e desvios padrão (M±DP) da taxa de colágeno (%) nos átrios direito e esquerdo de cães sadios e diabéticos - São Paulo - 2009

Átrio Direito Sadio (M±DP)	Átrio Esquerdo Sadio (M±DP)	Átrio Direito Diabético (M±DP)	Átrio Esquerdo Diabético (M±DP)
3,897 ± 0,914 ^{ab}	3,349 ± 1,251 ^{ab}	4,118 ± 0,925 ^{ab}	3,699 ± 0,816 ^{ab}

Nota: Letras iguais (a) representam que as médias analisadas pelo teste t de Student são iguais (P<0,05). Letras iguais (b) indicam que as médias analisadas por ANOVA seguido pelo Teste de Tukey são iguais (P<0,05). N = 5 animais.

A média da porcentagem de colágeno e o desvio padrão das amostras podem ser vistos na figura 5.

Figura 5 - Comparação das médias e desvio padrão da porcentagem de colágeno nos átrios direito e esquerdo de cães sadios e diabéticos. N = 5 animais. Nota: átrio direito sadio = **ADS**; átrio esquerdo sadio = **AES**; átrio direito diabético = **ADD**; átrio esquerdo diabético = **AED**

Além da quantificação do colágeno, foi visto a relação do percentual de colágeno e sua correlação com a idade de cada animal estudado. Todos os animais avaliados, tanto os sadios quanto os diabéticos apresentaram uma correlação positiva em relação à idade, ou seja, quanto mais velho o animal maior era o percentual de colágeno intersticial no miocárdio atrial. Comparando os resultados entre animais sadios e diabéticos, foi visto que nos animais diabéticos esta correlação é maior do que nos animais sadios. No átrio direito representando

36% de diferença entre sádios e diabéticos e no átrio esquerdo esta diferença foi maior apresentando 65% de diferença. A correlação entre idade e percentual de colágeno está mostrada na figura 6.

Figura 6 - Correlação de Pearson (r assume valores entre -1 e +1) entre a porcentagem média de colágeno e a idade do animal dos átrios direito e esquerdo de cães sádios e diabéticos. Figura A: átrio direito de animal sadio – $r = 0,523$. Figura B: átrio esquerdo de animal sadio – $r = 0,452$. Figura C: átrio direito de animal diabético – $r = 0,713$. Figura D: átrio esquerdo de animal diabético – $r = 0,746$. ($P < 0,05$). $N = 5$ animais

5.3 FIBRAS ELÁSTICAS

Nos átrios direito e esquerdo tanto de animais sádios e animais com diabetes, na porção subendocárdica e subepicárdica foi visto junto com as fibras colágenas, uma extensa rede de fibras elásticas com orientação paralela entre estas fibras. No interstício miocárdial, as fibras elásticas acompanham o trajeto das fibras colágenas, ocupando na maioria das vezes, o mesmo espaço, entretanto, a quantidade de fibras elásticas é menor comparada à quantidade

de fibras colágenas. Não foi observado diferença na orientação e distribuição de fibras elásticas entre animais saudáveis e diabéticos (Figura 7).

Figura 7 - Fotomicrografias da morfologia dos átrios direito e esquerdo comparando cães saudáveis e diabéticos. (Orceína). Figura A: átrio direito de animal saudável. Figura B: átrio direito de animal diabético. Figura C: átrio esquerdo de animal saudável. Figura D: átrio esquerdo de animal diabético. Notas: tecido conjuntivo = **TC**; Tecido muscular = **TM**; tecido adiposo = **TA**; miocárdio = **M**; fibras elásticas (**seta**). Barra = 50 μ m

5.4 FIBRAS RETICULARES

Na túnica subendocárdica e subepicárdica dos átrios direito e esquerdo, as fibras reticulares apresentaram-se em menor quantidade quando comparadas às outras fibras presentes, como colágeno tipo I e fibras elásticas. No miocárdio, as fibras reticulares formam

junto com o colágeno tipo I, o arcabouço dos miócitos no endomísio e perimísio. Não se observou diferença quanto à estruturação e organização destas fibras entre animais saudios e diabéticos, tanto no átrio direito quanto no átrio esquerdo (Figura 8).

Figura 8 - Fotomicrografias da morfologia dos átrios comparando cães saudios e diabéticos. (Gordon e Sweets). Figura A: átrio de animal sadio. Figura B: átrio de animal diabético. Figura C: átrio de animal sadio. Figura D: átrio de animal diabético. Notas: tecido conjuntivo = TC; Tecido muscular = TM; endocárdio = E; miocárdio = M; epicárdio = EP; fibras reticulares (seta). Barra = 200 μ m para figura A e B. Barra = 50 μ m para C e D

5.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA COLÁGENO TIPO I E COLÁGENO TIPO III

A marcação para colágeno tipo I e tipo III nos átrios de cães saudios e diabéticos mostrou que o colágeno tipo I é o predominante estrutural comparado ao colágeno tipo III. No átrio direito de animais saudios como de diabéticos, o colágeno tipo I apresentou marcação nas camadas subendocárdica, subepicárdica e também nos arcabouço dos miócitos na túnica

miocárdica. Entre os animais sadios e com diabetes, o colágeno tipo III teve marcação nas camadas subendocárdica e epicárdica mais relevante do que no miocárdio. No miocárdio dos animais com diabetes, o colágeno tipo III obteve uma marcação maior do que nos animais sadios (Figura 9).

Figura 9 - Fotomicrografias da imunofluorescência para colágeno tipo I e tipo III do átrio direito comparando cães sadios e diabéticos. O colágeno tipo I e tipo III fluorescem em verde por FITC e os núcleos em vermelho por iodeto de propídeo. Figura A: Colágeno tipo I do átrio direito de animal sadio. Figura B: Colágeno tipo III do átrio direito de animal sadio. Figura C: Colágeno tipo I do átrio direito de animal diabético. Figura D: Colágeno tipo III do átrio direito de animal diabético. Notas: tecido conjuntivo = **TC**; Tecido muscular = **TM**; miocárdio = **M**; evidênciação do colágeno imunomarcado (**seta**). Barra = 100 μ m para figura A. Barra = 50 μ m para figuras B, C e D

No átrio esquerdo, assim como no átrio direito, tanto de animais sadios como de diabéticos, o colágeno tipo I apresentou marcação nas camadas subendocárdica, subepicárdica e também nos arcabouço dos miócitos na túnica miocárdica. Nos animais com diabetes, a

fibra colágena tipo I apresentou-se mais espessa do que nos animais saudáveis. Semelhantemente ao átrio direito, entre os animais saudáveis e com diabetes no átrio esquerdo, o colágeno tipo III obteve marcação nas camadas subendocárdica e epicárdica mais relevante do que no miocárdio. No miocárdio, o colágeno tipo III mostrou marcação no revestimento das fibras tanto no endomísio quanto no epimísio. No miocárdio dos animais com diabetes, também no átrio esquerdo foi observado que o colágeno tipo III obteve uma marcação maior do que nos animais saudáveis (Figura 10).

Figura 10 - Fotomicrografias da imunofluorescência para colágeno tipo I e tipo III do átrio esquerdo comparando cães saudáveis e diabéticos. O colágeno tipo I e tipo III fluorescem em verde por FITC e os núcleos em vermelho por iodeto de propídeo. Figura A: Colágeno tipo I do átrio esquerdo de animal saudável. Figura B: Colágeno tipo III do átrio esquerdo de animal saudável. Figura C: Colágeno tipo I do átrio esquerdo de animal diabético. Figura D: Colágeno tipo III do átrio esquerdo de animal diabético. Notas: tecido conjuntivo = **TC**; Tecido muscular = **TM**; miocárdio = **M**; evidência do colágeno imunomarcado (**seta**). Barra = 100 μ m para figura C. Barra = 50 μ m para figuras A, B e D.

5.6 ANÁLISE ESTRUTURAL POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA

A avaliação estrutural de colágeno nos átrios de animais sadios e diabéticos por microscopia eletrônica de varredura mostrou que o colágeno em animais sadios forma uma rede irregular que envolve cada fibra muscular. Pelo método de maceração por NaOH há a formação de lacunas, onde os miócitos estão localizados, e desta forma é possível visualizar o revestimento do colágeno formando pela parede do endomísio. Essa estrutura em visão transversal parece uma estrutura de um “favo de mel” e em cada fibra muscular, o colágeno que a reveste é formado por fibrilas delgadas.

Nos animais sadios, a estrutura em forma de rede irregular formada pelo colágeno está bem organizada, com as paredes endomisiais paralelas umas as outras, alinhando cada fibra muscular. Já nos animais diabéticos, ocorreu perda da estrutura organizada em forma de rede, em algumas paredes endomisiais as delgadas fibrilas que formavam a parede endomisial estavam rompidas e o lúmen de algumas lacunas estava colabado (Figura 11).

Figura 11- Fotoeletromicrografias de varredura dos átrios de cães saudáveis e diabéticos. Figura **A**: átrio de animal saudável. Observar fibrilas de colágeno (**setas**) na parede endomisial do átrio. Figura **B**: átrio de animal diabético. Observar rompimento das fibras de colágeno (**setas**) na parede endomisial do átrio. Barra = 10 µm

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A relação entre o aumento do colágeno intersticial no miocárdio e doenças metabólicas como o diabetes ainda não é muito bem compreendida. Entretanto, a existência desta correlação, associado a outros fatores como idade, sexo, herança genética, estilo de vida influenciam a taxa na qual aumenta o risco para doenças cardíacas. De fato, pessoas com diabetes têm cinco vezes mais risco de morte por doenças cardíacas coronarianas do que pessoas não diabéticas (STIRBAN; TSCHOEPE, 2008). Diante disto, há várias linhas de pesquisas que tentam entender estes fenômenos a fim de amenizar danos que prejudicam a função cardíaca que podem ser causados por estes fatores.

Grande parte dos estudos sobre a relação de fibrose miocárdial em diabéticos são voltados à porção ventricular cardíaca, especialmente, o ventrículo esquerdo, o qual é de grande importância para a circulação sistêmica. Geralmente, pacientes diabéticos apresentam elevação da pressão diastólica no ventrículo esquerdo e redução do débito cardíaco quando comparados a pessoas não diabéticas (OKOSHI et al., 2007). Portanto, poucos estudos são direcionados às câmaras atriais, as quais já foram citadas possuírem um aumento de colágeno intersticial maior do que as câmaras ventriculares (REGAN et al., 1981; NUNES et al., 2006).

Uma das funções dos átrios é a produção do hormônio fator natriurético atrial, envolvido na manutenção da pressão sanguínea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Diante desta importância dos átrios, além de outras funções, neste trabalho foi verificada a morfologia dos átrios, os constituintes de natureza fibrilar e dentre estes constituintes, foi visto especialmente a estrutura e a quantificação de colágeno nas câmaras atriais para observar a relevância de um processo de deposição de colágeno atrial e se ocorreriam diferenças entre cães diabéticos e sadios. Além disto, foi visto a correlação entre a taxa de colágeno e a idade dos animais.

Nossos resultados apontaram que características histomorfológicas entre cães sadios e diabéticos sem histórico de doença coronariana apresentaram maiores diferenças no miocárdio do que nas outras túnicas cardíacas. No miocárdio de animais diabéticos, podemos observar que havia mais feixes de tecido conjuntivo do que no miocárdio de animais sadios. Além disto, a organização celular do miocárdio nos animais sadios estava mais definida do que nos animais com diabetes, em que as células apresentavam desalinhadas e não havia discos intercalares definidos, estas estruturas são responsáveis de fazer o contato célula-célula (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). O quadro de hiperglicemia é responsável pela presença

de altos níveis de produção não enzimática AGEs em pacientes com diabetes. AGEs são capazes de estimular diretamente a produção da MEC. Glicosilação não enzimática de colágeno produz ligação cruzada e consequentemente pode produzir alterações físicas nas propriedades da MEC. AGEs é capaz de romper as interações entre matriz-matriz e matriz-células, contribuindo para a sua ação pró-fibrótica (BAN; TWIGG, 2008). Desta forma, podemos também deduzir que todas as alterações morfológicas na estrutura tanto do tecido conjuntivo como o desarranjo observado no tecido muscular podem estar relacionadas com a remodelação da MEC em animais diabéticos, em virtude do quadro de hiperglicemia.

Neste trabalho não foi feito um exame histopatológico apenas, foi visto qualitativamente as diferenças entre animais saudáveis e diabéticos. De modo geral, poucos são os estudos com caráter qualitativo sobre a morfologia do coração entre animais saudáveis e diabéticos, geralmente, os aspectos histomorfológicos abordados se referem ao colágeno (BENEDICTO, 2005; ALBUQUERQUE, 2006).

Em virtude de sua importância, o colágeno foi avaliado tanto qualitativamente como quantitativamente nesta pesquisa. Na avaliação qualitativa do colágeno nos átrios direito e esquerdo dos corações de cães saudáveis e diabéticos, podemos observar que há um aumento na espessura de colágeno no endocárdio e no epicárdio em animais diabéticos. Também foi visto aumento de colágeno intersticial em animais diabéticos. Em pacientes diabéticos insulino-dependentes, em que há um estado de hiperglicemia crônica sabe-se que isto pode causar injúria no tecido cardíaco. Uma resposta patológica a injúrias no tecido é o desenvolvimento da fibrose, o qual envolve predominantemente acumulação na MEC (BAN; TWIGG, 2008).

Quando verificamos o colágeno intersticial por meio de quantificação tanto no átrio direito como no átrio esquerdo de animais saudáveis e diabéticos, foi visto que ocorreu um aumento da porcentagem de colágenos nos átrios direito e esquerdo dos animais diabéticos comparados aos animais saudáveis. Entretanto, a diferença estatística não é relevante. Khan et al. (2004) verificaram o papel das alterações da MEC e miócitos no remodelamento da câmara atrial em um modelo experimental de cão com insuficiência cardíaca (IC). Foram divididos em quatro grupos experimentais: cães com uma rápida estimulação induzida no ventrículo direito para aumentar os batimentos cardíacos por uma semana e foram caracterizados como IC recente; cães com uma rápida estimulação induzida no ventrículo direito para aumentar os batimentos cardíacos por três semanas e foram caracterizados como IC severa; animais controle para o primeiro grupo; e animais controle para o segundo grupo. Os animais com severa IC apresentaram pelo menos três sinais clínicos: apatia, anorexia e acistose, além de edema pulmonar e cardiomegalia. A síntese de colágeno atrial foi maior no grupo com IC

severa do que no grupo controle. Embora, o conteúdo de colágeno em ambos os átrios não diferem dos controles. A partir destes dados, podemos verificar que em casos que há um prejuízo da função cardíaca as alterações no colágeno são mais bem evidenciadas. No nosso estudo, em que alterações cardíacas não estavam comprovadas nos animais com diabetes, não foi possível relatar um resultado significativo na taxa de colágeno, entretanto, foi possível medir que o conteúdo desta proteína realmente estava aumentado no coração dos cães diabéticos.

Nunes et al. (2006) avaliaram a correlação entre a quantidade de colágeno intersticial no miocárdio e a sobrevida dos pacientes com cardiomiopatia dilatada idiopática e chagásica. Foi visto um aumento de colágeno intersticial no miocárdio dos pacientes com cardiomiopatias em relação ao grupo controle, mas a diferença não foi significativa. Neste artigo, não foi confirmado que o aumento de colágeno intersticial tem relação com a sobrevida. Pacientes com cardiomiopatia dilatada, tanto idiopática como chagásica, com a quantidade menor de colágeno tinham sobrevida em cinco anos mais do que pacientes com maiores quantidades de colágeno intersticial no miocárdio.

Fibrose intersticial é gerada por meio de uma exagerada ativação da produção de colágeno da matriz extracelular por fibroblastos cardíacos (OLIVOTTO et al., 2009). Uma acumulação adversa de colágeno no coração ocorre quando a sua síntese sobrepõe a sua degradação (BURLEW; WEBER, 2000). Nossos estudos, apenas confirmaram maior deposição de colágeno no interstício atrial de animais diabéticos em relação aos animais saudáveis, entretanto, é interessante estudar o grau de degradação de colágeno por metaloproteinases e comparar a porcentagem de colágeno existente com a porcentagem de colágeno em degradação, e assim inferir o papel do colágeno no remodelamento da matriz.

O interessante resultado observado nesta pesquisa, é que a taxa de colágeno era maior nos átrios direitos do que nos átrios esquerdos, tanto de animais saudáveis como de diabéticos. Geralmente, quando se quantifica colágeno nos ventrículos, o lado esquerdo tem maior deposição do que no lado direito, em virtude de suas funções relacionadas à circulação sistêmica. Provavelmente, um estudo com uma amostragem maior poderia afirmar se esta taxa de colágeno nos átrios direito tanto de saudáveis e diabéticos é maior.

Como nossos resultados dependem de outros fatores como citado anteriormente, como por exemplo, a idade, um estudo de correlação foi realizado para verificar esta interação de colágeno e este fator. Foi visto que nos animais com diabetes, a correlação da idade com a taxa de colágeno foi maior do que nos animais com diabetes (36 % no átrio direito e 65% no átrio esquerdo). Isto é um indicativo que a idade associada aos animais diabéticos influencia

mais na porcentagem de colágeno no interstício do miocárdio. Em outro estudo, em que mensurações do colágeno no endomísio e no perimísio, tecido conjuntivo que formam feixes em torno das fibras musculares no miocárdio, sugerem que estes feixes endomísio e perimísio, ambos aumentam em número e espessura seu colágeno tipo I com a idade. O estudo de Debessa, Maifrino e Souza (2001) revelou que há diferenças entre a quantia e os tipos de fibras colágenas entre corações de jovens e velhos. O conteúdo de colágeno aumentou da idade adulta para a velhice. Esse resultados sugerem uma contínua formação de novas fibras de colágeno na parede ventricular, além da vida adulta. A perda de miócitos poderia ser uma das causas de acumulação de colágeno na parede do ventrículo esquerdo. Sugerindo um acúmulo de colágeno que ocorre com a idade que esta relacionada com a inibição da degradação desta proteína, corroborando com os dados encontrados neste estudo.

Há algumas propostas de usar o colágeno miocárdico intersticial como um marcador estrutural prognóstico nas cardiomiopatias (NUNES et al., 2006). Há alguns trabalhos que fazem esta associação entre colágeno e cardiomiopatias.

Avendano et al. (1999) associaram a disfunção diastólica com um aumento na concentração de colágeno no miocárdio na ausência de hipertrofia ventricular esquerda. Embora uma mudança no fenótipo de colágeno possa ocorrer durante o remodelamento cardíaco, um desproporcional aumento do colágeno tipo I pode aumentar a rigidez cardíaca comparado com o colágeno tipo III e V que não foram expressos em modelo experimental de tolerância à glicose. Outro estudo apontou que o conteúdo de colágeno miocárdial e rigidez ventricular, ambos aumentam durante a sobrecarga de pressão, a hipertrofia, sugerindo que o colágeno miocárdial poderia ser um importante determinante para a espessura da câmara (FOMOVSKY; THOMOPOULOS; HOLMES, 2009).

Há poucos trabalhos que denotam a importância da elastina para as propriedades mecânicas do coração. Em nossa pesquisa, podemos verificar que a elastina estava presente principalmente nas túnica endocárdica e epicárdica. No miocárdio, a elastina acompanhava o trajeto das fibras de colágeno no interstício. Fibras de elastina intersticial são rompidas por isquemia aguda e durante sobrecarga de pressão e subsequente insuficiência cardíaca. Estudos correlativos podem ser difíceis de interpretar se patologias que alteram a elastina no miocárdio também alterariam o conteúdo de colágeno, como é o caso de isquemia, falha cardíaca e sobrecarga de pressão. Camundongos *knockout* para elastina nasceram com artérias tortuosas, com marcada hipertrofia cardíaca e morreram dentro de 72 h em virtude de proliferação de células da musculatura lisa que ocluíram a aorta. Camundongos com um alelo deletado para elastina mostraram artérias mais espessas, elevada pressão sanguínea,

hipertrofia cardíaca média e um período curto de vida normal (FOMOVSKY; THOMOPOULOS; HOLMES, 2009). Essas pesquisas mostram a importância desta proteína, juntamente com o colágeno na MEC. Nos nossos estudos, em uma observação qualitativa não foi identificado diferenças morfológicas entre cães saudáveis e cães diabéticos na porção atrial. Estudos com técnicas mais avançadas, como *western blot*, possivelmente possam identificar diferenças na expressão desta proteína em animais saudáveis e diabéticos.

Em outra observação qualitativa dos nossos estudos, foi em relação às fibras reticulares, que possuem colágeno tipo III em sua constituição. Foi visto que não ocorreram diferenças na distribuição destas fibras entre animais saudáveis e diabéticos. As fibras foram relatadas nas túnica endocárdica e epicárdica, que junto às fibras elásticas e colágenas do tipo I formam o arcabouço conjuntivo destas túnica. No miocárdio, a marcação por prata das fibras reticulares, indicou que estas fibras formam junto com o colágeno tipo I, um importante empacotamento dos feixes de miócitos tanto no perimísio quanto no endomísio. Segundo Montes (1996) as fibras reticulares durante processos de reparo tecidual, são depositadas primeiramente e após são substituídas por colágeno tipo I.

Interessante é notar a interação entre as fibras do tecido conjuntivo no miocárdio. O aumento de colágeno tipo I pode influenciar na diminuição da elasticidade cardíaca (SOUZA, 2002). No epicárdio e no endocárdio, foi possível verificar que fibras colágenas, elásticas e reticulares apresentaram orientação paralela entre elas, intensificando a resistência do órgão cardíaco diante de forças aplicadas.

Avaliando a estrutura do colágeno por técnica de digestão controlada e observação por microscopia eletrônica de varredura, foi visto que as fibras de colágeno em cães saudáveis apresentaram uma organização em forma de rede em uma visão transversal. Na parede do endomísio delgadas fibrilas de colágeno faziam o contorno das lacunas, onde os miócito *in vivo* se dispõem. Nos animais com diabetes, a organização em rede estava desarranjada, com algumas fibrilas da parede endomisial rompidas e algumas lacunas colabadas, indicando que nos animais com diabetes a estrutura cardíaca estava prejudicada, com o desalinhamento dos miócitos em virtude do excesso de deposição colágena que provavelmente desorganizou os átrios em animais com diabetes.

Benedicto (2005), em estudo complexo sobre o arranjo estrutural e arquitetônico das fibras de colágenos presentes no músculo cardíaco, também comparou aspectos morfológicos entre cães saudáveis e diabéticos. Nesse trabalho, o qual foi utilizado a mesma técnica de digestão controlada em NaOH e as ultra-estruturas foram observadas por meio da microscopia eletrônica de varredura, os resultados apontados por este autor, mostraram que as fibras de

colágeno da parede endomisial têm arranjo estrutural arquitetônico em forma de rede irregular predominantemente em monocamada em cães saudáveis, ao passo que em cães idosos e diabéticos, foi observado um remodelamento da rede com maior quantidade de fibras e de camadas assemelhando-se a um tapete de fibras sugerindo modificações na relação de tensão /força do tecido.

Diante da soma de informações observadas nesta pesquisa, de fato, o colágeno é um importante componente estrutural que diante da alteração da morfologia cardíaca por um processo de doença metabólica como o diabetes, pode influenciar ainda mais no processo de disfunção cardíaca, ou seja, o processo de doença metabólica – remodelação do miocárdio – disfunção cardíaca é um mecanismo que associado a outros fatores tendem a levar as pessoas ou animais com diabetes a vários danos. É importante saber o que ocorre em processos normais e comparar com quadros de diabetes e entender quais as causas do prejuízo da função cardíaca em diabetes. Desta forma, quando se entende a morfologia em estados normais e patológico pode buscar soluções para melhorar o quadro da doença.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

- A morfologia tecidual na porção atrial de corações diabéticos apresentou diferença na organização tanto na parte fibrosa quanto na parte muscular, em relação aos animais saudáveis.
- Ocorre aumento de colágeno na porção atrial de coração de cães diabéticos comparados ao coração de cães saudáveis, entretanto, a diferença da taxa de colágeno não é significativa.
- A distribuição de fibras elásticas e reticulares não apresentou diferenças morfológicas entre animais saudáveis e diabéticos.
- O arranjo estrutural da fibra colágena no alinhamento dos miócitos na parede endomisial pode sofrer mudanças morfológicas no aspecto organizacional em cães diabéticos comparados aos cães saudáveis.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, I. M. B. **Análise comparativa dos elementos estruturais e ultra-estruturais do músculo cardíaco em cães saudáveis e diabéticos.** 2006. 72 f. Dissertação (Mestrado). – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- ANDERSON, R. H.; COOK, A. C. The structure and components of the atrial chambers. **Europace.** v. 9, p. 3-9, 2007.
- ANEJA, A.; TANG, A W. H. W.; BANSILAL, B, S.; GARCIA, A. M. J.; FARKOUH, A. M. E. Diabetic cardiomyopathy: insights into pathogenesis, diagnostic challenges, and therapeutic options. **The American Journal of Medicine.** v. 121, n. 9, p. 748-757, 2008.
- ASHWORTH, J. L.; MURPHY, G.; ROCK, M. J.; SHERRATT, M. J.; SHAPIRO, S. D.; SHUTTLEWORTH, C. A.; KIELTY, C. M. Fibrillin degradation by matrix metalloproteinases: implications for connective tissue remodeling. **Biochemistry Journal.** v. 15, p. 171-181, 1999.
- AVENDANO, G. F.; AGARWAL, R. K.; BASHEY, R. I.; LYONS, M. M.; SONI, B. J.; JYOTHIRMAYI, G. N.; REGAN, T. J. Effects of glucose intolerance on myocardial function and collagen-linked glycation. **Diabetes.** v. 48, p. 1443-1447, 1999.
- BAN, C. R.; TWIGG, S. M. Fibrosis in diabetes complications: Pathogenic mechanism and circulating and urinary markers. **Vascular Health and Risk Management.** v. 4, n. 3, p. 575-596, 2008.
- BANCROFT, J. D.; STEVENS, A. S. **Theory and practice of histological techniques.** 4. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1996. 235 p.
- BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. T. O papel dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. **Arquivos Brasileiros Endocrinologia Metabolismo.** v. 52, n. 6, p. 940-950, 2008.
- BAUTERS C.; LAMBLIN N.; MCFADDEN E. P.; VAN BELLE E.; MILLAIRE A.; DE GROOTE P. Influence of diabetes mellitus on heart failure risk and outcome. **Cardiovascular Diabetology.** v. 2, n. 1, p. 1-16, 2003.

BENEDICTO, H. G. **Arranjo estrutural das fibras de colágeno do coração de cães normais e diabéticos**. 2005. 79 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

BONFIM; A. S.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Enalapril altera a formação da matriz colágena do miocárdio de ratos espontaneamente hipertensos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v.81, n. 1, p. 64-78, 2003.

BROWN, M. J. Success and failure of vaccines against rennin-angiotensin system components. **Nature Reviews**. v. 6, p. 639-647, 2009.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**. v. 414, p. 813-820, 2001.

BURGUESS, M. L.; MCCREA, J. C.; HEATHER, L. H.; Age-associated changes in cardiac matrix and integrins. *Mechanisms of Aging and Development*. v. 122, n. 15, p. 1739-1756, 2001.

BURLEW, B. S.; WEBER, K. T. Connective tissue and the heart functional significance and regulatory mechanisms. **Cardiology Clinics**. v. 18, n. 3, p. 435-442, 2000.

BURSTEIN, B.; LIBBY, E.; CALDERONE, A.; NATTEL, S. Differential behaviors of atrial versus ventricular fibroblasts – a potential role for platelet-derived growth factor in atrial-ventricular remodeling. **Circulation**. v. 117, p. 1630-1641, 2008.

CORRÊA-GIANNELLA, M. L.; VIEIRA, S. M. A predisposição genética para o desenvolvimento da microangiopatia no DM1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia Metabolismo**. v. 52, n. 2, 375-386, 2008.

DANGELO, J. G.; FATTINI, C. A. **Anatomia humana básica**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2006. 184 p.

DEAN, L.; MCENTYRE, J. R. **The genetic landscape of diabetes**. NCBI, 2004.

DEBESSA, C. R. G.; MAIFRINO, L. B. M.; SOUZA, R. R. Age related changes of the collagen network of the human heart. **Mechanisms of Ageing and Development**. v. 122, p. 1049-1058, 2001.

DIDIO, L. J. A. **Tratado de anatomia aplicada**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. 948 p.

EVANS, H. E. **Miller's anatomy of the dog**. 3. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1993. 1113 p.

EVERETT, T. H.; OLGIN, J. E. Atrial fibrosis and the mechanisms of atrial fibrillation. **Heart Rhythm**. v. 4, n. 3, p. 24-27, 2007.

FALCÃO-PIRES, I.; GONÇALVES, N. MOURA, C. LAMEGO, I.; ELOY, C.; LOPES, J. M.; BEGIENEMAN, M. P. V.; NIESSEN, H. W. M.; AREIAS, J. C.; LEITE-MOREIRA, A. F. Effects of diabetes mellitus, pressure-overload and their association on myocardial structure and function. **American Journal of Hypertension**. v. 1, p. 1-9, 2009.

FEIN, F. S. Diabetic cardiomyopathy. **Diabetes Care**. v. 13, n. 11, p. 1169-1179, 1990.

FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. Insulin-induced hyperglycemia in diabetic dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 180, n. 12, p. 1432-1437, 1982.

FOMOVSKY, G. M.; THOMOPOULOS, S.; HOLMES, J. W. Contribution of extracellular matrix to the mechanical properties of the heart. **Journal of Molecular and Cellular**. v. 3, p. 1-7, 2009.

GILBERT, S. J.; WOTTON, P. R.; BAILEY, A. J.; SIMS, T. J.; DUANCE, V. C. Alterations in the organisation, ultrastructure and biochemistry of the myocardial collagen matrix in doberman pinschers with dilated cardiomyopathy. **Research in Veterinary Science**. v. 69, n. 3, p.267-274, 2000.

GREENLEE, JR., T. K.; ROSS, R.; HARTMAN, J. L. The fine structure of elastic fibers. **The Journal of Cell Biology**. v. 30, p. 59-71, 1966.

HO, S. Y.; ANDERSEN, SÁNCHEZ-QUINTANA, D., Atrial structure and fibers: morphologic bases of atrial conduction. **Cardiovascular Research**. v. 54, p. 325-336, 2002.

HO, S. Y.; SÁNCHEZ-QUINTANA, D. The importance of atrial structure and fibers. **Clinical Anatomy**. v. 22, p. 52-63, 2009.

JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochemical Journal**, v. 11, p. 447-455, 1979.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 488 p.

KANNEL, W. B.; MCGEE, D. L. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. **Journal of the American Medical Association**. v. 241, n. 19, p. 2035-2038, 1979.

KHAN, A.; MOE, G. W.; NILI, N.; REZAEI, E.; ESKANDARIAN, M.; BUTANY, J.; STRAUSS, B. H. The Cardiac Atria Are Chambers of Active Remodeling and Dynamic Collagen Turnover During Evolving Heart Failure. **Journal of the American College of Cardiology**. v. 43, n. 1, p. 68-76, 2004.

KIELTY, C. M.; SHERRATT, M. J.; SHUTTLEWORTH, C. A. Elastic fibres. **Journal of Cell Science**. v. 115, p. 2817-2828, 2002.

KING, G. L.; SHIBA, T.; OLIVER, J.; INOBUCHI, T.; BURSELL, S. E. Cellular and molecular abnormalities in the vascular endothelium of diabetes mellitus. **Annual Review of Medicine**. v. 45, p. 179-188, 1994.

KOLTAI, M. Z.; BALOGHI, I.; WAGNER, M.; POGATSA, G. Diabetic myocardial alterations in ultrastructure and function. **Experimental Pathology**. v. 25, n. 4, p. 215-221, 1984.

KUPFAHL, C.; PINK, D.; FRIEDRICH, K.; ZURBRU, H. R.; NEUSS, M.; WARNECK, C.; FIELITZ, J.; GRAF, K.; FLECK, E.; REGITZ-ZAGROSEK, V. Angiotensin II directly increases transforming growth factor β 1 and osteopontin and indirectly affects collagen mRNA expression in the human heart. **Cardiovascular Research**. v. 46, p. 463-475, 2000.

LEHNINGER, A. L. **Principles of Biochemistry**. 4. ed. Acesso online: www.whfreeman.com/lehninger4e, 2004.

MADY, C.; FERNANDES, F. Cardiomiopatias: uma visão crítica do conceito da classificação. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. V. 69, n. 5, p. 299-300, 1997.

MEDUGORAC, I.; JACOB, R. Characterization of left ventricular collagen in the rat. **Cardiovascular Research**. v. 17, p. 15-21, 1983.

MONTES, G. S.; JUNQUEIRA, L. C. U. The use of picrosirius-polarisarius method for the study of the biopathology of collagen. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 1-11, 1991.

NUNES, V. L.; RAMIRES, F. J. A.; PIMENTEL, W. S.; FERNANDES, F.; IANNI, B. M.; MADY, C. O papel do acúmulo de colágeno no interstício miocárdico na sobrevida dos pacientes com cardiomiopatia dilatada idiopática e chagásica. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 87, n. 6, p. 757-762, 2006.

OHTANI, O. Three-dimensional organization of the connective tissue fibers of the human pancreas: a scanning electron microscopy study of NaOH treated tissue. **Archives Histological Japanese**, v. 50, n. 3, p. 557-566, 1987.

OKOSHI, K.; GUIMARÃES, J. F. C.; DI MUZIO, B. P.; OKOSHI, M. P. Miocardiopatia diabética. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, p. 160-167, 2007.

OLIVOTTO, I.; CECCHI, F.; POGGESI, C.; YACoub, M. H. Developmental origins of hypertrophic cardiomyopathy phenotypes: a unifying hypothesis. **Nature Reviews Cardiology**, v. 6, p. 317-321, 2009.

OMENS, J. H.; MILLER, T. R.; COVELL, J. W. Relationship between passive tissue strain and collagen uncoiling during healing of infarcted myocardium. **Cardiovascular Research**, v. 33, n. 2, p. 351-358, 1997.

PARRY, D. A. D.; CRAIG, A. S. Collagen fibrils during development and maturation and their contribution to the mechanical attributes of connective tissue. In: Nimni, M. E. **Collagen**. Boca-Raton, CRC Press, 1988, v. 2, p. 1-23.

REGAN, T. J.; WU, C. F.; YEH, C. K.; OLDEWURTEL, H. A.; HAIDER, B. Myocardial composition and function in diabetes: the effects of chronic insulin use. **Circulation Research**, v. 49, p. 1268-1277, 1981.

REST, M. V. D.; GARRONE, R. Collagen family of proteins. **The FASEB Journal**, v. 5, p. 2814-2823, 1991.

RICH, A.; CRICK, F. H. C. The structure of collagen. **Nature**, v. 175, n. 4489, p. 915-916, 1955.

ROBINSON, T. F.; FACTOR, S. M.; SONNENBLICK, E. H. The heart as a suction pump. **Scientific American**, v. 254, p. 84-91, 1986.

SADLER, T. W. **Embriologia Médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 347 p.

SCANLON, V. C.; SANDERS, T. **Essentials of anatomy and physiology**. 5. ed. Philadelphia: F. A. Davis Company, 2007. 622 p.

SCHNEIDER, M. Serial killer: angiotensin drives cardiac hypertrophy via TGF- β . **The Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 6 715, p. 715-716, 2002.

SEELAND, U.; HAEUSELER, C.; HINRICHS, R.; ROSENKRANZ, S.; PFITZNER, T.; SCHARFFETTER-KOCHANKE, K.; BÖHM, M. Myocardial fibrosis in transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) transgenic mice is associated with inhibition of interstitial collagenase. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 32, p. 295-303, 2002.

SHANN, B. D. O papel da proteína quinase c no desenvolvimento das complicações vasculares do diabetes mellitus. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, n. 6, p. 654-662, 2003.

SIWIK, D. A.; PAGANO, P. J.; COLUCCI, W. S. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 280, p. 53-60, 2001.

SOUZA, R. R. Aging of myocardial collagen. **Biogerontology**, v. 3, p. 325-335, 2002.

STIRBAN, A. O.; TSCHOEPE, D. Cardiovascular complications in diabetes. **Diabetes Care**, v. 31, n. 2, p. 215-221, 2008.

THIENE, G.; CORRADO, D.; BASSO, C. Revisiting definition and classification of cardiomyopathies in the era of molecular medicine. **European Heart Journal**, v. 29, n. 2, p. 1-3, 2007.

TOYRAN, N.; LASCH, P.; NAUMANN, D.; TURAN, B.; SEVERCAN, F. Early alterations in myocardia and vessels of the diabetic rat heart: an FTIR microspectroscopic study. **Biochemical Journal**, v. 397, p. 427-436, 2006.

USHIKI, T. Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. **Archives of Histology and Cytology**, v. 65, n. 2, p. 109-126, 2002.

WEBER, K. T.; BRILL, C. G.; JANICKI, J. S. Structural remodeling of myocardial collagen in systemic hypertension: function consequences and potential therapy. **Heart Failure**, v. 6, p. 129-137, 1990.