GISELE MIOZZO FINK

**Estudo da distribuição diferencial das fibras do sistema
elástico no ventrículo esquerdo do coração de ratos normais**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Fisiopatologia
Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Elia Garcia Caldini

São Paulo
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Fink, Gisele Miozzo

Estudo da distribuição diferencial das fibras do sistema elástico no ventrículo esquerdo do coração de ratos normais / Gisele Miozzo Fink. -- São Paulo, 2008.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Elia Garcia Caldini.

Descritores: 1.Coração 2.Fibras elásticas 3.Tecido conjuntivo 4.Microscopia eletrônica 5.Ratos

USP/FM/SBD-426/08

A Edith e Luiz Fernando

*À Profa. Dra. Elia Garcia Caldini
que me ensinou muito além da Biologia Celular,
pela amizade, confiança e infinita paciência.*

A Solange Campello

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva, Chefe do Laboratório de Poluição Atmosférica e Coordenador do Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo incentivo e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

À querida Dra. Elnara Márcia Negri, do Instituto de Laboratórios de Investigação Médica do HC-MUSP, pelo apoio, amizade, incentivo e alegria.

Ao Dr. Marcelo Alves Ferreira, do Laboratório de Biologia Celular da FMUSP, pela amizade, orientação e auxílio na análise e na redação dos dados obtidos.

A Profa. Dra. Olga Maria Toledo Correa e ao Prof. Dr. Osvaldo A. Mora (*in memoriam*), do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de São Paulo, por toda a atenção e ensinamentos de Histologia.

Ao Prof. Dr. Roger Chammas do Departamento de Radiologia da FMUSP, pelo incentivo.

À amiga Dra. Márcia Koike, do Laboratório de Emergências Clínicas do Departamento de Clínica Médica da FMUSP, pela confiança, auxílio e incentivo.

Às amigas do Laboratório de Biologia Celular da FMUSP, Mestre Nilsa R. Damaceno Rodrigues, Maria Íres Amorim Mendes, Dra. Mariana Matera Veras, Aline Borges dos Reis, Juliana Braga Furtado, pelo companheirismo, apoio e amizade, além do grande auxílio sem o qual este trabalho não poderia ter sido realizado.

Aos funcionários Adão Caetano Sobrinho, Hélio Correa, Maria Cecília dos Santos Lobo Marcondes, Maria Margarida Teixeira Monteiro, Miriam Regina Pelleschi Tabora Simone e Maria do Rosário Loureiro Aguiar do Centro Multiusuário de Microscopia Eletrônica do Laboratório de Biologia Celular da FMUSP, pela presteza na realização de preparados simplesmente perfeitos para o estudo ultra-estrutural.

À Secretária Valéria Veiga Sales, do Laboratório de Biologia Celular da FMUSP, pelo carinho e profissionalismo com que conduziu a diagramação digital da Dissertação.

A Loris Calzolari, pela paciência no tratamento digital das imagens apresentadas nesta Dissertação.

A todo pessoal do Laboratório de Biologia Celular da FMUSP, Ivone Silva Santos, Cristina Viveiros Cordeiro da Fonseca e Gildásio Vieira Rocha, pela colaboração em diferentes tarefas durante este trabalho.

A Leonora, pela jornada compartilhada na formação de Mestre. A Fernanda, Thiago, Leandro, Gabriel, Sérgio, Germano e Jane, pelo incentivo.

Aos amigos Silvana de Souza, Marta Souto, Ricardo Bordini, Sonia Alex, Rosângela Bastos, Evangelina Pinho, Liliana Jalfen, Tânia e Cláudia Silva, que sempre me incentivaram.

“A vida é muito curta para ser pequena”

(Benjamin Disraeli)

SUMÁRIO

Resumo	i
Summary	iii
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Aspectos gerais sobre o tecido conjuntivo	03
1.2. O sistema colagênico	04
1.3. O sistema elástico	08
1.4. Metaloproteinases	18
1.5. Compartimentos da parede cardíaca	19
1.6. A matriz extracelular no coração	22
2. MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1. Animais	37
2.2. Métodos	37
3. RESULTADOS	42
3.1. Hematoxilina-eosina	42
3.2. Resorcina-fucsina com oxidação prévia	42
3.3. Microscopia eletrônica	42
4. DISCUSSÃO	59
5. CONCLUSÕES	70
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

Resumo

A elasticidade do tecido conjuntivo desempenha uma função protetora agindo como uma mola tênsil durante o trabalho muscular. No entanto, existem poucos estudos sobre a distribuição das fibras do sistema elástico no coração. Considerando que: a) o estudo da distribuição destas fibras pode ajudar a compreender a mecânica cardíaca, e b) o rato tem sido usado como o melhor modelo animal para as disfunções cardiovasculares, o objetivo deste estudo é apresentar uma descrição sistemática da distribuição diferencial das fibras do sistema elástico do endocárdio, epicárdio e miocárdio ventricular. Cortes histológicos de ventrículo esquerdo obtido de ratos normais adultos foram estudados pela comparação do padrão ultra-estrutural de cada um dos tipos fibrilares com coloração pela técnica da resorcina-fucsina com prévia oxidação, para microscopia de luz. As observações ultra-estruturais foram feitas em tecidos fixados com ácido tânico - glutaraldeído, que permite a identificação mais precisa das fibras oxitalânicas, elaunínicas e elásticas. Foi aplicado um sistema semi-quantitativo de avaliação. A análise dos cortes histológicos corados pela Resorcina-fucsina com oxidação prévia mostrou um estrato de fibras elásticas em estreita associação ao endotélio no endocárdio e ao mesotélio no epicárdio. Quando observado ao microscópio eletrônico é possível identificar que nestas ambas localizações as fibras do sistema elástico estão arranjadas em dois estratos dispostos ortogonalmente. Ao nível ultra-estrutural, notou-se a distribuição diferencial das fibras do sistema elástico nos três compartimentos do tecido conjuntivo associado ao miocárdio propriamente dito: epimísio, perimísio e endomísio. O epimísio apresenta fibroblastos, fibras colágenas grossas, fibras elaunínicas e elásticas entremeadas à substância amorfa. No perimísio, a microscopia eletrônica mostrou uma grande quantidade de microfibrilas associadas a fibras elásticas, elaunínicas e mesmo fibras colagênicas. Frequentemente, neste compartimento, as microfibrilas estão compactadas formando feixes que correspondem ao padrão ultra-estrutural das fibras oxitalânicas. O endomísio é rico em fibras oxitalânicas associadas à lâmina basal dos cardiomiócitos.

Uma rede microfilamentar conecta os elementos do endomísio entre si. Ainda que as implicações funcionais sejam especulativas, a distribuição diferencial das fibras do sistema elástico nos compartimentos da parede ventricular sugere que diferenças na elasticidade conferem versatilidade biomecânica ao tecido como um todo. A análise ultra-estrutural mostra que as fibras oxitalânicas (menos elásticas) se co-localizam com fibras colagênicas finas no endomísio e perimísio, enquanto que a presença de fibrilas colágenas mais grossas coincide com fibras elásticas e elaunínicas (com mais elasticidade) no endo- e epicárdio. Estas observações sugerem que o sistema elástico, em co-evolução com o sistema colagênico, contribui para acomodar a diversidade funcional.

Descritores: 1.Coração 2.Fibras elásticas 3.Tecido conjuntivo 4.Microscopia eletrônica 5.Ratos

Summary

The connective tissue elasticity has a protective function acting as a tensile spring during muscular work. Nevertheless, few is known about the distribution of the elastic system fibers in the heart. Considering that a) the study of the distribution of these fibers may help understand the cardiac mechanics, and b) rat models are used to study cardiac dysfunctions, our aim is to study the distribution of elastic system fibers in the ventricular endocardium, epicardium and myocardium of normal rats. Histological tissue sections of left ventricle (obtained from adult rats) were studied by comparing the typical ultrastructural picture of each of the fiber types with Resorcin-fuchsin staining technique for light microscopy. The ultrastructural observation was made in tissues fixed with tannic acid-glutaraldehyde, which provided a reliable means to identify the elastic system fibers, as oxytalan, elaunin and elastic fibers. A semiquantitative evaluation was performed. The analysis of the histological sections stained by Resorcin-fuchsin technique after oxidation shows a stratum of elastic system fibers in close association to the endothelium in the endocardium and to the mesothelium in the epicardium. When observed at the transmission electron microscope, it was possible to see that in both locations the elastic system fibers are arranged in two orthogonally disposed layers. At the ultrastructural level, the epimysium presents fibroblasts, thick collagen, elaunin and elastic fibers interspersed in the amorphous substance. In the perimysium, the electron microscope disclosed a great amount of microfibrils, surrounding all fibrillar components: elastic fibers, elaunin fibers and even collagen fibers. Frequently, at this location, the microfibrils are closely packed, forming bundles devoid of elastin that correspond to the ultrastructural picture of the oxytalan fibers. The endomysium is rich in oxytalan fibers in a close association with the basal lamina of the myocytes. A microfibrillar network interconnects the endomysium elements each other. In spite of the functional implications being speculative, the differential distribution of the elastic system fibers in the compartments of the ventricular wall suggests that the differences in elasticity provide biomechanical versatility to the entire system. Ultrastructural

analysis shows that oxytalan fibres and thin collagen fibrils are co-localized in endomysium and perimysium, whereas, the presence of thicker collagen fibrils coincides with elastin and elastic fibers in endo- and epicardium. These specific co-localizations suggest that elastic system, in co-evolution with collagen, has contributed to accommodating functional diversity.

Key- words: 1.Heart 2.Elastic fibers 3.Connective tissue 4.Electron microscopy 5.Rat

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Apesar do fato de que há muito se sabe que a elasticidade presente no tecido conjuntivo exerce uma importante função protetora ao atuar como uma mola tênsil durante o trabalho muscular, pouca atenção foi dada até agora à distribuição dos componentes do sistema elástico no coração. O estudo da distribuição deste material elástico pode ser importante para o entendimento de todas as alterações nas propriedades mecânicas do coração.

O sistema elástico compreende fibras elásticas, elaunínicas e oxitalânicas (para uma revisão, ver MONTES, 1996, ARRIBAS et al., 2006). Do ponto de vista ultra-estrutural, fibras elásticas apresentam-se compostas por um cerne de elastina (que aparece como um material amorfo e homogêneo) rodeado por microfibrilas de 10 a 12nm de diâmetro. Durante o desenvolvimento de uma fibra elástica, um feixe contendo somente microfibrilas aparece primeiro e, em seguida, ocorre a deposição da elastina por entre as microfibrilas até que a fibra elástica atinja sua completa maturação.

No entanto, em certos compartimentos teciduais, é possível observar somente feixes de microfibrilas ricas em fibrilina e sem a elastina (conhecidos como fibras oxitalânicas) ou ainda encontram-se feixes de microfibrilas contendo áreas esparsas de elastina (conhecidos como fibras elaunínicas) em localizações que, mesmo no seu estado adulto, não apresentarão depósito de elastina. Estas observações mostram que nem

todos os feixes de microfibrilas estão destinados a servir como “guias” para a deposição de elastina, dando origem a uma fibra elástica, podendo ser entidades microfibrilares independentes no tecido conjuntivo.

A existência de fibras elásticas no coração foi relatada pela primeira vez por PERKINS e MILLER, em 1924. A partir de então, os livros didáticos são unânimes descrevendo sua presença no epicárdio, no endocárdio e no miocárdio dispostas paralelamente às fibras musculares (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004; WEISS e GREEP, 1977; FAWCETT, 1987). Porém, não existem trabalhos científicos que tenham se proposto estudar a distribuição dos diferentes tipos de fibras do sistema elástico à luz dos novos conhecimentos sobre a matriz extracelular e seu papel na fisiopatologia de diversas afecções patológicas.

FRANK e LANGER, em 1974, reconheceram, ultra-estruturalmente, a existência de pequenas fibras elásticas ricas em microfibrilas, porém não fazem qualquer menção ao seu papel funcional. Ainda que fibras elaunínicas e oxitalânicas não tenham sido descritas no coração, é possível identificá-las nas micrografias eletrônicas de alguns trabalhos publicados, como naqueles de ROBINSON et al. (1983) e MORITA et al. (1991).

As observações feitas anteriormente e o fato de que o rato tem sido utilizado como modelo experimental para doenças humanas que afetam direta ou indiretamente a função cardíaca (como contratatura isquêmica do miocárdio, hipertensão, diabetes, obesidade) nos levam a acreditar que é necessário realizar uma descrição sistemática da distribuição das fibras do sistema elástico (oxitalânicas, elaunínicas e elásticas propriamente ditas) no

epicárdio, miocárdio e endocárdio do ventrículo esquerdo, sob a luz do conhecimento atual sobre sua identificação ultra-estrutural.

1.1. Aspectos gerais sobre o tecido conjuntivo

Os tecidos conjuntivos funcionam principalmente através de seus componentes extracelulares, no que diferem dos demais tecidos. Os tecidos conjuntivos são estruturas biológicas complexas, formadas por uma variedade de componentes químicos distintos. Esses tecidos contêm células “nativas” (como fibroblastos, condrócitos, osteócitos), células relacionadas à atividade de patrulha imunológica (como leucócitos, macrófagos, mastócitos), vasos sangüíneos, nervos e toda a gama de componentes da matriz extracelular, como colágeno (na sua forma fibrilar e não fibrilar), proteoglicanos, ácido hialurônico, fibras do sistema elástico, glicoproteínas adesivas, além de água de solvatação e minerais. A quantidade relativa de cada um dos componentes varia significativamente em cada tecido conjuntivo em particular e também com a idade (PARRY e CRAIG, 1988).

A matriz extracelular foi considerada, por muito tempo, como uma rede fibrosa inerte. Porém, além de fornecer o suporte estrutural para os tecidos, a matriz se constitui em importante meio através do qual transitam informações entre as células, participando direta ou indiretamente de uma série de processos que incluem morfogênese, diferenciação e migração celulares. O tecido conjuntivo também participa ativamente nos processos de reparo e fibrose, quando ocorrem interações dinâmicas e complexas

entre os elementos matriciais. As diversas concentrações e associações dos componentes da matriz extracelular resultam em adaptações específicas às necessidades funcionais em cada órgão e cada componente participa na construção de uma matriz perfeitamente talhada para as necessidades individuais das células num determinado órgão, permitindo a manutenção da homeostase, a diferenciação em cada estágio do desenvolvimento e adaptações frente a novos estímulos (MONTES, 1996).

No intuito de fornecer as informações que subsidiam os dados discutidos nesta Dissertação, serão apresentados dados sobre as características dos dois sistemas fibrilares da matriz extracelular: o sistema colagênico será descrito de maneira mais resumida, enquanto que o sistema elástico merecerá mais atenção, por ser o foco principal deste trabalho.

1.2. O sistema colagênico

Os colágenos constituem uma família de proteínas fibrosas bem características, encontradas em todos os animais multicelulares, produzidas por diversos tipos de células, e que se distinguem em composição química, propriedades físicas, morfologia, distribuição nos tecidos e funções. São as proteínas mais abundantes nos mamíferos, constituindo cerca de 25% da sua massa protéica total.

A principal característica de uma molécula de colágeno típica, conhecida pelos histologistas como tropocolágeno, é a estrutura longa e

rígida de sua fita tripla helicoidal na qual três cadeias polipeptídicas de colágeno, chamadas cadeias α , estão enroladas umas nas outras. Existem vários tipos de cadeia α de colágeno e, portanto existem vários tipos de colágeno. Assim sendo, há os colágenos que formam fibrilas, os que formam fibras, os que se associam aos colágenos fibrilares e aqueles que formam estruturas em rede. Atualmente são conhecidos mais de 20 diferentes tipos de colágeno. Os principais tipos de colágeno encontrados nos tecidos conjuntivos são os tipos I, II, III, IV, V e VII. Dentre estes, com exceção do colágeno IV, todos os tipos formam fibrilas, cujas estriações transversais típicas, facilmente identificadas nas micrografias eletrônicas, são consequência do arranjo das moléculas de tropocolágeno (ALBERTS et al., 2002).

O colágeno tipo I constitui cerca de 90% do colágeno do organismo, forma fibras grossas, conhecidas como *fibras colágenas*, visíveis ao microscópio de luz. As *fibras colágenas* estão presentes no tecido conjuntivo propriamente dito, no osso, dentina, cemento, tendão, fâscias, cápsulas dos órgãos, ligamentos, região profunda da derme (MONTES, 1996). É constituído por duas cadeias alfa-1 e uma cadeia alfa-2. As cadeias protéicas se polimerizam formando fibrilas grossas (com média de 60 a 100nm de diâmetro) densamente empacotadas, com estriação característica bem evidente. As fibrilas se associam formando fibras grossas, de 2 a 10 μ m de diâmetro, resistentes a tensão, que correspondem às clássicas *fibras colágenas* da microscopia de luz. Estas fibras podem se associar entre si e formar feixes de fibras.

As *fibras colágenas* aparecem principalmente em localizações sujeitas a grandes forças de tensão. Observadas sob microscopia de luz, as *fibras colágenas* são acidófilas, corando-se de róseo pela técnica da hematoxila-eosina, de azul pelo tricrômico de Mallory e de verde pelo de Masson. As *fibras colágenas* são birrefringentes, pois são constituídas por moléculas alongadas e paralelas entre si. Desse modo, quando examinadas ao microscópio de polarização, entre filtros Polaroid cruzados, estas fibras aparecem brilhantes, contra um fundo escuro.

O colágeno tipo II é encontrado principalmente nas cartilagens, no humor vítreo e no estroma da córnea de embriões. Sua molécula é um homotrímero das cadeias alfa-1 que se associam formando fibrilas muito delgadas (de 20 a 30nm de diâmetro). Estas fibrilas não formam fibras e interagem intensamente com os proteoglicanos da matriz extracelular. Esta interação é responsável, nas cartilagens, por sua resistência a forças compressivas (MONTES, 1996).

O colágeno tipo III forma fibrilas de 35 a 60nm de diâmetro, que se associam frouxamente, com grande quantidade de substância amorfa entre si, formando fibras finas e flexíveis de 0,5 a 2,0 μ m de diâmetro. Estas fibras são conhecidas como *fibras reticulares*, pela sua característica de formar tramas de sustentação para células nos órgãos parenquimatosos. Nos preparados corados pela hematoxilina-eosina, as *fibras reticulares* não são visíveis, sendo identificadas, em geral, por meio da impregnação pela prata, aparecendo impregnadas na cor preta, enquanto as fibras colágenas tomam uma tonalidade castanha. O colágeno tipo III está presente em órgãos e

tecidos que necessitam de um arcabouço estrutural maleável, como a região superficial da pele, a camada média dos vasos sanguíneos, a mucosa dos órgãos do trato digestório, respiratório e reprodutor e órgãos parenquimatosos como baço, fígado, medula óssea, pulmões, etc.. Durante os processos de reparo e nas fibroses em geral, assim como no desenvolvimento fetal, o colágeno III é o primeiro a ser depositado, sendo mais tarde substituído pelo colágeno do tipo I, nas regiões sujeitas a grandes forças de tensão (MONTES, 1996).

O colágeno tipo IV não é um constituinte dos tecidos conjuntivos. Está presente nas lâminas basais das células, na interface entre a célula e a matriz extracelular. As moléculas do colágeno tipo IV não se polimerizam em fibrilas, mas se organizam formando uma espécie de malha frouxa e porosa, que interage com outras moléculas das lâminas basais, principalmente a laminina, a fibronectina e o heparam sulfato. É sintetizado pelas células epiteliais, células musculares e outras células que possuem lâmina basal, como a células de Schwann, miofibroblastos, etc.

O colágeno tipo V é fibrillar e tem papel ativo como controlador negativo na polimerização do colágeno tipo I. A síndrome de Ehlers-Danlos (que provoca hiper mobilidade articular e fragilidade cutânea) está associada a uma mutação no gene do colágeno V (WENSTRUP et al., 2004).

O colágeno tipo VII também é fibrilar e participa ativamente da integração entre as fibrilas de colágeno III e a lâmina basal, fixando a interação entre o tecido epitelial e o conjuntivo (ALBERTS et al., 2002).

1.3. O sistema elástico

1.3.1. Biossíntese e caracterização dos diferentes tipos de fibras do sistema elástico

O sistema elástico é composto por fibras elásticas, fibras elaunínicas e fibras oxitalânicas. As fibras elásticas propriamente ditas são conhecidas dos anatomistas há mais de um século por suas propriedades tintoriais características, que se devem à presença da elastina (seu principal componente - ao redor de 90%). Em 1958, FULLMER e LILLIE descreveram as fibras oxitalânicas e, em 1965, GAWLIK descreveu um outro tipo de fibra do tecido conjuntivo à qual denominou elaunínica.

Nos três tipos de fibras ocorrem feixes de microfibrilas (denominadas "microfibrilas da fibra elástica" por ROSS e BORNSTEIN, 1969) com quantidades crescentes de elastina associada, segundo a seqüência: oxitalânica, elaunínica e elástica, como mostra a ilustração.

Esquema gráfico da aparência ultra-estrutural dos três tipos de fibras do sistema elástico em corte transversal. A elastina aparece depositada por entre as microfibrilas como uma massa amorfa (em preto).

Outro ponto de interesse é que todas as observações ao microscópio eletrônico mostram que as microfibrilas constituintes das fibras oxitalânicas têm o mesmo diâmetro daquelas que circundam o cerne de elastina presente nas fibras elásticas maduras (STREETEN e LICARI, 1983; GIBSON e CLEARY, 1987); estudos imuno-histoquímicos também mostram pouca diferença entre elas, sendo todas constituídas principalmente pela proteína fibrilina (SAKAI et al.,1996).

Ao se discutir tecidos elásticos, deve-se diferenciar “elastina” e “fibras elásticas”. A fibra elástica é a estrutura complexa encontrada na matriz extracelular, que contém elastina, proteínas microfibrilares, lisil-oxidase e proteoglicanos. A elastina é a proteína predominante de uma fibra elástica madura, sendo responsável por sua propriedade mecânica característica de recolhimento elástico (ver esquema).

As moléculas de elastina (verdes) são unidas por ligações covalentes (vermelhas) que mantêm a malha supramolecular. Cada molécula pode se expandir e retornar ao seu formato inicial, de modo a esticar e encolher o conjunto como um todo.

A elastina é quimicamente inerte, extremamente hidrofóbica e sua resistência à dissolução é tão grande que, antes da descoberta de seu precursor solúvel (a tropoelastina), só era possível definir a elastina em

termos operacionais e qualitativos como o resíduo protéico insolúvel que restava após a solubilização de todos os componentes do tecido (PARTRIDGE, 1962). Além de suas propriedades físicas incomuns, a elastina é estável em condições fisiológicas permanecendo nos tecidos por todo o tempo de vida do organismo (SHAPIRO et al., 1991).

Diversos indícios apontam para o fato de que os três tipos diferentes de fibras do sistema elástico pertençam a uma série contínua, sendo a ordem cronológica durante a histogênese a de *fibras oxitalânicas*, *fibras elaunínicas* e *fibras elásticas* (ver esquema a seguir). Observações das fibras do sistema elástico em vários animais, particularmente invertebrados, sugerem que as fibras oxitalânicas e elaunínicas são precursoras não só ontogenéticas, mas também filogenéticas das fibras elásticas propriamente ditas dos mamíferos (BRADAMANTE e SVAJGER, 1977; SAGE e GRAY, 1979).

Esquema ilustrando a formação de uma fibra elástica: inicialmente ocorre a secreção da fibrilina e sua polimerização na região pericelular, originando os feixes de microfibrilas; posteriormente, a célula secreta a elastina (em vermelho) que se polimeriza sobre as microfibrilas.

Apesar dos avanços na compreensão da complexidade estrutural das microfibrilas, os mecanismos de sua participação na fibrillogênese

permanecem especulativos. O fato de que agregados de microfibrilas assumem a forma e a orientação das supostas fibras elásticas levou ROSS et al. (1977) e ROSENBLOOM et al. (1993) a sugerirem que as microfibrilas conseguem alinhar as moléculas de tropoelastina de uma maneira precisa, de modo a justapor os locais das ligações cruzadas nas moléculas, antes que eles possam ser oxidados pela lisil-oxidase.

Em certas regiões anatômicas específicas, há feixes de microfibrilas que não tem elastina associada (fibras oxitalânicas), mesmo quando o tecido está totalmente maduro. Outras localizações teciduais, mesmo em animais adultos, sempre exibem grumos de material amorfo entremeados às microfibrilas (padrão ultra-estrutural das fibras elaunínicas) e que não dão origem a fibras elásticas típicas. Estas observações mostraram que nem todos os feixes de microfibrilas estão destinados a servir como molde para a deposição de elastina, ou seja, nem todo feixe de microfibrilas do tecido se desenvolverá como fibra elástica (ver esquema).

Esquema mostrando a polimerização da fibrilina, levando à formação dos feixes de microfibrilas ricas em fibrilina e da fibra elástica (adaptado de RAMIREZ e DIETZ, 2007).

Com base nestes achados, COTTA-PEREIRA et al. (1976) propuseram que as fibras oxitalânicas e fibras elaunínicas representam interrupções fisiológicas em estágios sucessivos do desenvolvimento das fibras elásticas. Assim, um feixe de microfibrilas pode tanto ser o precursor de uma fibra elaunínica ou elástica (tenha ele recebido moderadas ou grandes quantidades de elastina) quanto permanecer como uma entidade independente, própria do tecido conjuntivo (as assim chamadas fibras oxitalânicas).

Esta foi a razão pela qual FULLMER (1960) propôs que fosse usado o termo *fibras oxitalânicas* para designar as fibras que jamais dão origem a fibras elásticas, mesmo em tecidos adultos, e que o termo *fibras pré-elásticas* fosse usado no caso de tecidos em desenvolvimento, para designar fibras do sistema elástico ainda em processo de maturação.

A natureza química das microfibrilas permaneceu desconhecida até 1996, quando SAKAI et al. descreveram a presença de uma grande glicoproteína (350 kDa) em cultura de fibroblasto, denominando-a fibrilina. Em 1999, a fibrilina-2, outra isoforma, foi descrita por LEE et al.. Os estudos bioquímicos e imunohistoquímicos demonstram que as fibrilinas são os principais componentes destas microfibrilas do tecido conjuntivo, estejam estas associadas ou não a elastina. O seu papel estrutural foi reforçado com a descoberta que a síndrome de Marfan (uma afecção hereditária do tecido conjuntivo com graves complicações cardiovasculares e esqueléticas) está diretamente relacionada a mutações no gene da fibrilina-1 (WRIGHT et al. 1999; SHERRATT et al., 2001).

As microfibrilas têm uma organização supramolecular bastante complexa e, além das fibrilinas, possuem várias proteínas: glicoproteínas associadas à microfibrila (MAGP 1 a 4), fibulinas 1 e 2, emilina, proteoglicanos, e até mesmo proteínas que se ligam ao TGF-beta latente, seqüestrando-o na matriz extracelular para ser liberado quando necessário. Além disso, as fibrilinas possuem domínios que se ligam às integrinas da membrana celular, sendo portanto consideradas um dos agentes na transdução de sinal célula-matriz extracelular (RAMIREZ e DIETZ, 2007).

Ao microscópio eletrônico, a microfibrila cortada longitudinalmente apresenta estriação transversal característica (com periodicidade de 56 nm, no estado relaxado) à semelhança de um “fio de contas” (GLAB e WESS, 2008); quando cortada transversalmente mostra-se com um contorno circular de aparência oca, como mostra a ilustração a seguir:

Micrografia eletrônica mostrando uma fibra oxitalânica, constituída por feixes de microfibrilas. A seta aponta para uma destas microfibrilas em corte transversal mostrando sua aparência oca. Observar a estriação transversal (reproduzido de Montes, 1996).

1.3.2. Distribuição diferencial e características funcionais das fibras do sistema elástico

As fibras do sistema elástico não estão distribuídas homogeneamente nos tecidos, sendo que em compartimentos distintos dos vários órgãos sua presença difere tanto qualitativa quanto quantitativamente. Com o emprego de diversos métodos de investigação, demonstrou-se que as fibras do sistema elástico distribuem-se diferencialmente nos diversos compartimentos de vários órgãos, a saber: pele (COTTA-PEREIRA et al., 1976; JUNQUEIRA et al., 1983), cartilagem hialina (COTTA-PEREIRA et al., 1984), vias aéreas (BÖCK e STOCKINGER, 1984), nervos (FERREIRA et al., 1987) e tendões (CALDINI et al., 1990).

Uma vez que é a elastina quem confere elasticidade às fibras (ROSS e BORNSTEIN, 1969), as fibras elásticas (por apresentarem a maior quantidade de elastina) têm as propriedades elastoméricas mais evidentes, enquanto que as fibras oxitalânicas (que não têm elastina) foram consideradas praticamente inextensíveis, sendo relativamente mais resistentes à tensão (ROSS, 1973), impedindo o estiramento das estruturas presentes nas regiões onde elas ocorrem; já as fibras elaunínicas teriam um grau intermediário de elasticidade (COTTA-PEREIRA et al., 1984). A existência de uma distribuição diferencial destas fibras nos tecidos é sugestiva de que o grau variável de elasticidade, de cada um dos tipos de fibra do sistema elástico, imprime versatilidade ao sistema.

Assim sendo, as fibras elásticas propriamente ditas aparecem como um dos principais constituintes de tecidos conjuntivos que possuem

propriedades elastoméricas, tais como os alvéolos pulmonares, os ligamentos elásticos e as paredes das artérias; apresentam-se em três arranjos morfológicamente distintos (ver esquema): **A**) fibras alongadas de comprimento variável, como por exemplo nos ligamentos elásticos, nos pulmões e na pele; **B**) anastomosadas, como nas cartilagens elásticas em um arranjo tridimensional em favo de mel, **C**) lâminas elásticas, como na aorta. Essas estruturas complexas e distintas parecem surgir em consequência da intensidade e da direção das forças aplicadas ao tecido. (MECHAM e HEUSER, 1991).

Esquema gráfico mostrando a organização estrutural de fibras elásticas no tecido conjuntivo (adaptado de USHIKI, 2002).

Por sua vez, as fibras elastínicas têm sido localizadas na interface entre a derme papilar e reticular (COTTA-PEREIRA et al., 1976), na região intermediária do "tendão elástico" do músculo eretor do pelo em humanos (RODRIGO et al., 1975), nos anéis paralelos que rodeiam a porção secretora das glândulas sudoríparas écrinas, na camada condrogênica do pericôndrio das cartilagens hialinas (COTTA-PEREIRA et al., 1984), no epineuro (FERREIRA et al., 1987), na camada subepitelial da traquéia e do brônquio em humanos (BÖCK e STOCKINGER, 1984) e na região

intermediária do ligamento anular da articulação entre o estribo e a janela oval (SOUZA et al., 1991).

Já as fibras oxitalânicas têm sido encontradas em regiões onde o tecido conjuntivo está sujeito a tensões mecânicas localizadas tais como: o periodonto humano (FULLMER e LILLIE, 1958), na junção dermo-epidérmica (COTTA-PEREIRA et al., 1976), na zônula ciliar (STREETEN e LICARI, 1983), no endoneuro (FERREIRA et al., 1987), na membrana basal espessa da traquéia e dos brônquios humanos (BÖCK e STOCKINGER, 1984), na matriz da cartilagem hialina (COTTA-PEREIRA et al., 1984), nos filamentos de ancoragem dos capilares linfáticos (GERLI et al., 1990) e na lâmina própria dos túbulos seminíferos (BÖCK, 1978).

A presença de fibras oxitalânicas na zônula ciliar e no ligamento periodontal foi interpretada como uma evidência de que estes feixes de microfibrilas podem desempenhar um papel estrutural independente de sua função na elastogênese. As microfibrilas parecem ter uma função de ancoragem, ligando o cristalino ao corpo ciliar no olho, conectando o osso e o cimento do dente no ligamento periodontal e ligando a epiderme à derme subjacente, na pele. O componente microfibrilar pode ter uma função similar nas fibras elásticas, ancorando a elastina amorfa à matriz circundante (GIBSON e CLEARY, 1987).

Nos últimos anos, estudos voltados para a organização supra-molecular das microfibrilas levaram à suposição de que elas possuem uma capacidade de “recolhimento elástico”, mesmo sem conter elastina. Esta idéia está baseada em estudos biomecânicos, nos quais a periodicidade

axial normal de 56 nm entre as “contas” da microfibrila relaxada pode chegar até 165 nm, (ver ilustrações) quando o tecido é submetido à tração e retornar aos padrões de relaxamento quando a força cessa (KIELTY et al., 2002).

À esquerda: micrografias eletrônicas mostrando em (1) a aparência de uma microfibrila em estado relaxado em (2) sua aparência quando estirada (adaptado de SHERRATT et al., 2001).

À direita: esquema mostrando um modelo simplificado desdobramento da fibrilina em resposta a forças de tração. No estado de repouso (a), as microfibrilas apresentam cada monômero de fibrilina bastante dobrado, o que é compatível com a aparência ultra-estrutural das microfibrilas (como um “fio de contas”). As forças de tração externas provocariam o desdobramento progressivo da molécula de fibrilina e uma diminuição no seu diâmetro (b, c, d); assim sendo, as fibrilas se alongariam, afinariam e se tornariam mais próximas entre si. Este modelo é derivado de estudos por difração de raios-X da zônula ciliar (fibras oxitalânicas que sustentam o cristalino) submetida à tração mecânica (adaptado de GLAB E WESS, 2008).

Ainda que as bases moleculares deste recolhimento elástico ainda devam ser elucidadas, este fenômeno deve ser considerado na análise do micro-ambiente extracelular.

Além desta função mecânica, há evidências que a as microfibrilas participam da interação célula-matriz, uma vez que duas de suas glicoproteínas associadas, a MAGP-1 e MAGP-2, interagem ativamente com

o colágeno IV das lâminas basais e com integrinas da membrana celular, respectivamente (FINNIS e GIBSON, 1997; GIBSON et al., 1998).

1.4. Metaloproteinases

As metaloproteinases da matriz extracelular são uma grande família de proteinases que degradam a matriz e podem ser secretadas por células mesenquimais (como fibroblastos, osteoblastos, condrócitos, células musculares, epiteliais, etc.), por macrófagos e leucócitos.

Estão incluídas nesta família as collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13), as estromelisinases (MMP-3, MMP-10), as gelatinases 72 kDa e 92 kDa (MMP-2, MMP-9), matrilisina (MMP-7), as metaloproteinases de macrófagos (MMP-12) e as MMP de membrana (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17). Estas enzimas são zinco-dependentes e são reguladas por uma outra classe de proteínas conhecidas como TIMPs, inibidores teciduais de metaloproteinases (ASHWORTH et al., 1999).

Colagenases quebram o colágeno em fragmentos que são substratos para outras proteases menos específicas, como as gelatinases, responsáveis pela digestão do colágeno IV e da fibronectina.

Algumas metaloproteinases, como MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-12 e MMP-13 têm atividade elastolítica (REYNOLDS e MEIKLE, 1997), e, com exceção da MMP-9, degradam também as microfibrilas ricas em fibrilina (ASHWORTH et al., 1999).

1.5. Compartimentos da parede cardíaca

A parede do coração pode ser dividida em três compartimentos: pericárdio, miocárdio e endocárdio.

1.5.1. Pericárdio

O pericárdio é um saco de parede dupla que envolve o coração e as raízes dos grandes vasos. As duas paredes são:

a) pericárdio parietal (ou fibroso) formado por conjuntivo denso, rico em fibras colágenas e elásticas, revestido por epitélio simples pavimentoso (mesotélio); tem sido muito estudado pelo seu emprego nas biopróteses para o sistema cardiovascular (BRAGA-VILELA e CAMPOS VIDAL, 2006).

b) pericárdio visceral (ou seroso), denomina-se **epicárdio**; é constituído por um epitélio simples pavimentoso (mesotélio) que reveste a superfície externa do coração em associação a uma camada de tecido conjuntivo fibroso. Mais profundamente, este se continua com o conjuntivo que reveste o miocárdio propriamente dito, denominado epimísio.

A cavidade pericárdica humana, delimitada entre o pericárdio visceral e o parietal, contém cerca de 50 ml de líquido pericárdico, secretado pelas células mesoteliais, como um filtrado do plasma.

Alguns estudos têm apontado a capacidade das células epiteliais do epicárdio para se diferenciar em células musculares lisas e endoteliais, o que confere ao epicárdio o potencial de participar como fonte primária de vasos coronários mesmo na idade adulta como já o faz durante o desenvolvimento embrionário (WILLS et al., 2008).

1.5.2. Miocárdio

O miocárdio corresponde à porção muscular propriamente dita do coração. O tecido conjuntivo do miocárdio pode ser subdividido em três compartimentos, contínuos entre si e contínuos com o tecido conjuntivo das válvulas cardíacas e das cordas tendíneas: **epimísio, perimísio e endomísio**. O epimísio se localiza ao longo da superfície epicárdica e endocárdica do miocárdio. O perimísio envolve grupos de miócitos, formando feixes de fibras musculares e continua-se com o epimísio e com o endomísio. Por sua vez, o endomísio corresponde ao tecido conjuntivo que envolve cada cardiomiócito individualmente e os conecta entre si (ROBINSON et al., 1983; BURLEW e WEBER, 2000). O esquema ilustra esta distribuição:

Organização do tecido conjuntivo no miocárdio. Cada miócito (**M**) está envolvido por uma camada de tecido conjuntivo delicado denominado como endomísio (**E, em rosa**); por sua vez, a denominação perimísio (**P, em azul**) se refere ao tecido conjuntivo que envolve grupos de miócitos; já o termo epimísio (**EP, em amarelo**) reveste o músculo como um todo (adaptado de SOUZA, 2001).

1.5.3. Endocárdio

O endocárdio corresponde ao revestimento interno das cavidades cardíacas. Pode ser dividido em três estratos: (a) o endotélio, que corresponde ao epitélio simples pavimentoso com propriedades especiais mecânicas e sintéticas, em contato com as cavidades atriais e ventriculares; (b) conjuntivo sub-endotelial, que constitui uma delicada faixa de tecido conjuntivo; (c) mais profundamente, em direção ao miocárdio, encontra-se um tecido conjuntivo mais rico em células adiposas, vasos, nervos, células musculares lisas e, nas paredes ventriculares, contém as fibras de Purkinje (células musculares especiais com função na transmissão do impulso elétrico). Esta região, é denominada **sub-endocárdio** e se confunde com o

epimísio do miocárdio. Esta região limite possui grande importância por estar envolvida nos estágios iniciais dos episódios de isquemia miocárdica.

1.6. A matriz extracelular no coração

A eficiência mecânica do miocárdio depende das propriedades contráteis dos cardiomiócitos associados a uma matriz extracelular que possui características próprias de resistência mecânica e resiliência (WILSON e SPINALE, 2001).

A matriz extracelular cardíaca é definida como uma trama glicoprotéica que envolve e suporta as células constitutivas do coração. Os principais componentes são: 1) proteínas estruturais, como colágeno tipo I, colágeno tipo III (que predominam), elastina, fibrilina; 2) proteínas adesivas, como colágeno IV e VI, laminina, fibronectina, e 3) proteoglicanos.

A habilidade de sintetizar os componentes da matriz extracelular difere entre as células do coração: cardiomiócitos e as células endoteliais produzem colágenos tipos IV e VI, laminina, enquanto que fibroblastos produzem colágenos tipos I e III, fibronectina, proteoglicanos, assim como as metaloproteinases e seus inibidores (JANICKI e BROWER, 2002). Embora os cardiomiócitos sejam responsáveis pelo aspecto funcional mais importante do coração (a contração muscular), estes representam apenas um terço das células. Os fibroblastos, responsáveis pela síntese e

manutenção da matriz extracelular são as células mais prevalentes e sua população é dinamicamente regulada (FEDAK et al., 2005).

Fibronectina

A fibronectina existe tanto na forma solúvel (sintetizada pelos hepatócitos e secretada para o sangue) como na forma insolúvel secretada localmente pelos fibroblastos; possui domínios de ligação a lâmina basal, a superfície celular e aos componentes da matriz extracelular (fibras e proteoglicanos), desempenhando um importante papel na adesão célula-matriz (MAMUYA e BRECHER, 1992).

Existem várias isoformas de fibronectina formadas por *splicing* do RNA mensageiro de um único gene. As isoformas geralmente se expressam durante o desenvolvimento embrionário, porém a sua re-expressão, em adultos, tem sido observada em diferentes modelos de hipertrofia secundária à hipertensão e em áreas de necrose e fibrose do miocárdio no rato. A expressão de fibronectina precede a deposição de colágeno I e III nas áreas fibróticas, regulada por fatores de crescimento locais, por angiotensina II e por estímulos puramente mecânicos (JANE-LISE et al., 2000).

Laminina

A laminina é uma glicoproteína presente nas lâminas basais das células musculares, mesoteliais e endoteliais do coração. Estas proteínas possuem domínios que se ligam ao colágeno IV, nidogênio, proteoglicanos e proteínas de membrana, como as integrinas. Assim sendo, a laminina é um

componente estrutural da lamina basal responsável por uma das conexões entre a matriz e o citoesqueleto/miofibrilas.

No músculo estriado predomina a laminina 2 (conhecida como merosina) e sua deficiência causa um tipo de distrofia muscular acompanhada de cardiomiopatia dilatada, caracterizada pela perda da conexão entre o citoesqueleto e a matriz extracelular (CAMPBELL, 1995).

Metaloproteinases e aspectos fisiopatológicos do desequilíbrio entre síntese e degradação da matriz extracelular no coração

A matriz extracelular do miocárdio, responsável pela preservação de sua geometria e integridade, é uma estrutura dinâmica cujos componentes protéicos são mantidos por um delicado controle homeostático.

Diferentes metaloproteinases (MMPs) que estimulam ou inibem a degradação da matriz desempenham um importante papel no remodelamento cardíaco em condições normais e patológicas (CHAKRABORTY e EGHBALI, 1989).

O desenvolvimento de fibrose cardíaca, juntamente a outras alterações de matriz, está associado a mudanças na concentração e estado de ativação de MMPs. As mudanças no equilíbrio entre MMPs e TIMPs na insuficiência cardíaca favorecem a degradação do colágeno estável e contribuem para a perda de tônus e dilatação da parede ventricular. Além disso, o estímulo para a degradação da matriz desestabiliza as vias de sinalização pela integrina, comprometendo a função dos cardiomiócitos.

Há diversos mecanismos teciduais desencadeantes da atividade das MMPs e TIMPs no coração: efetores do sistema renina-angiotensina-aldosterona, assim como os fatores de crescimento como IGF, TGF β e FGF-2 e citocinas (como TNF- α) estão envolvidos na regulação do remodelamento da matriz extracelular do miocárdio (FEDAK et al., 2005, SPINALE, 2007).

A fibrose associada ao desenvolvimento da hipertrofia cardíaca resulta de um desequilíbrio entre síntese e degradação de colágeno. O acúmulo desproporcional dos colágenos fibrilares (dos tipos I e III), que ocorre na cardiopatia hipertensiva, leva à fibrose ventricular que provoca rigidez do miocárdio, disfunção diastólica e potencialmente participa da disfunção sistólica (WEBER et al., 1994; BISHOP, 1998).

Em resposta à injúria ou esforço, estabelece-se o processo de remodelamento cardíaco, que inclui a hipertrofia do miócito, no sentido de compensar o aumento de estresse nas paredes do coração. A persistência do estresse leva a ruptura da homeostase da matriz extracelular resultando no remodelamento irreversível, dilatação ventricular e, finalmente, insuficiência cardíaca (GRAHAM et al., 2008).

Os fibroblastos desempenham um papel importante no remodelamento estrutural que ocorre na doença cardíaca. Por exemplo, após um infarto do miocárdio, os fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos com fenótipo proliferativo e migratório. Estas células secretam e ativam as metaloproteinases, destruindo a matriz extracelular no

local da injúria ao mesmo tempo em que sintetizam e organizam o tecido cicatricial (CREEMERS et al., 2001).

O aumento de colágeno recém-sintetizado resultante do remodelamento promove um aumento da rigidez do miocárdio. Levando-se em consideração a relação estreita e a interação entre o colágeno e as fibras musculares cardíacas, o acúmulo de colágeno aumenta a carga destas células. Quando em excesso, o colágeno impede que as forças de tração alcancem os miocárdios envolvidos por tecido fibrótico, o que promove a atrofia celular. Este pode ser um dos mecanismos que explicam a insuficiência cardíaca relacionada à fibrose miocárdica (JALIL et al., 1989).

O aumento de colágeno do tipo I também contribui para a diminuição da capacidade elástica do coração, uma vez que o colágeno III (que normalmente prevalece ao redor dos cardiomiócitos no endomísio) é mais flexível, formando fibrilas mais finas que, por sua vez, foram fibras mais finas com maior interação com os proteoglicanos, o que contribui para a elasticidade do coração normal (SOUZA, 2001).

Este trabalho de pesquisa refere-se especificamente às fibras do sistema elástico no coração e, considerando que a eficiência mecânica neste órgão depende da sinergia entre os sistemas colagênico e elástico, segue-se uma revisão mais aprofundada destes dois sistemas fibrilares e seu desempenho funcional no coração.

1.6.1. Distribuição e aspectos funcionais do colágeno fibrilar na parede ventricular

A rede de fibras da matriz extracelular forma uma estrutura contínua com o esqueleto fibroso do coração como um todo, incluindo epicárdio, endocárdio, miocárdio, válvulas cardíacas, cordas tendíneas e matriz perivascular (FEDAK et al., 2005).

No coração humano adulto, foram identificados cinco tipos de colágenos: I, III, IV, V, VI (SPEISER et al., 1991). Os colágenos tipos I e III, que representam mais de 90% do colágeno total, transmitem forças mecânicas por todo o miocárdio e mantêm a estrutura tecidual durante o ciclo cardíaco e contribuem para as propriedades visco-elásticas do órgão. O colágeno IV está presente nas lâminas basais e participa dos processos de adesão entre células e matriz extracelular. O colágeno V contribui para a regulação da espessura das fibrilas de colágeno, enquanto que o colágeno VI participa ativamente dos processos de diferenciação celular dos mioblastos no miocárdio, merecendo atenção, atualmente, nas pesquisas com células-tronco para reconstituição miocárdica (NAUGLE et al., 2006).

Colágeno no epicárdio e endocárdio

Embora os livros didáticos descrevam a presença de fibras colágenas no epicárdio, são raras as publicações sobre este assunto. Recentemente, JÖBSIS et al. (2007) perceberam que o estudo da constituição e do impacto mecânico do epicárdio e endocárdio está sendo negligenciado e propuseram

um estudo baseado em técnicas de identificação de fibras elásticas por sua fluorescência espontânea, microscopia eletrônica de varredura, e testes biomecânicos; concluíram que: no epicárdio, as fibras colágenas e elásticas se alinham paralelas entre si, na região mais superficial do epicárdio e nas regiões próximas ao miocárdio, sendo que na região intermediária do epicárdio as fibras colágenas e elásticas não apresentam uma orientação preferencial; já no endocárdio, tanto as fibras de colágeno como as elásticas são mais difusas por toda a extensão do conjuntivo endocárdico; além disso, os autores encontram um estrato de fibras elásticas na endocárdio próximo aos miócitos. Os autores relatam ainda que o pericárdio participa ativamente na manutenção das forças residuais, pois uma vez retirado ocorre uma mudança na conformação na estrutura ventricular; além disso, os testes mecânicos mostram que o pericárdio desempenha um papel nas propriedades mecânicas passivas, principalmente durante o enchimento ventricular na fase de inicial da diástole.

Devido ao arranjo sinuoso das fibras colágenas, o epicárdio possui capacidade de recolhimento elástico, uma vez que as fibras colágenas estiradas durante a sístole retornam à sua configuração de repouso antes de serem distendidas na diástole.

Colágeno no miocárdio

O epimísio possui fibras colágenas relativamente mais grossas (colágeno tipo I) que o restante do miocárdio, dispostas em uma trama biaxial que se alinha ao maior eixo dos miócitos em condições de

estiramento. Supõe-se que esta malha colagênica protege os sarcômeros do estiramento além daquele eficiente para a produção da força máxima (CAULFIELD e BORG, 1979; ROBINSON et al, 1983; MORITA et al. 1991).

As fibras de colágeno do perimísio envolvem grupos de miócitos. Nesta localização, as fibras de colágeno estão dispostas paralelamente às miofibrilas e apresentam um padrão ondulado, o que sugere que estas fibras não sofrem um forte estiramento durante o enchimento ventricular na diástole. De fato, à medida que a pressão do ventrículo esquerdo aumenta, o comprimento dos sarcômeros também aumenta, as fibras colagênicas perimisiais vão perdendo sua ondulação, ficando menos tortuosas, enquanto a parede ventricular se distende. Além disso, seu retorno à posição ondulada colabora no recolhimento elástico da parede ventricular que se segue à diástole. O esquema a seguir ilustra esta descrição (MACKENNA et al. 1976; 1977; ROBINSON et al., 1983).

O esquema ilustra, em verde, as fibras de colágeno do perimísio dispostas paralelamente aos miócitos; a disposição ondulada destas fibras previne o estiramento e ajuda no recolhimento elástico que se segue à diástole (adaptado de JANICKI e BROWER, 2002).

A estrutura do endomísio tem sido estudada principalmente com microscopia de varredura. Existem pelo menos 4 componentes para o endomísio: (1) segmentos fibrilares de colágeno (de 120 a 150 nm de diâmetro), denominados “struts”, (cuja tradução leva à idéia de barra, escoras, trava, reforço) dispostos desde a lamina basal de um miócito até a lamina basal dos miócitos adjacentes, com inserção na lâmina basal próximo à linha Z do sarcômero (ver ilustrações abaixo); (2) “struts” de colágeno que conectam as lâminas basais dos capilares e dos miócitos entre si; (3) um complexo de fibras de colágeno isoladas; (4) uma densa trama grânulo-filamentosa que se espalha entre os elementos, preenchendo os espaços, contendo glicoproteínas e proteoglicanos, de natureza e ainda não elucidada (BORG e CAULFIELD, 1981; BORG et al., 1982; ROBINSON et al., 1987).

A: Micrografia eletrônica de varredura do endomísio. Para estudo da rede fibrilar endomisial, os miócitos foram retirados por tratamento químico; **ml**: lacuna deixada pelo miócito; **cl**: lacuna deixada pelo capilar. Barra: 10 μ m. Reproduzido de MACCHIARELLI et al., 2001.

B: Esquema de duas células musculares (**M**) vizinhas, mostrando “struts”, inseridos na periferia da célula, ao nível da linha Z e uma trama colagênica, envolvendo a célula (adaptado de SOUZA, 2001).

As observações de DOLBER e SPACH (1993), utilizando microscopia confocal, confirmam muitas destas observações.

Neste modelo proposto, existe a conexão mecânica entre miócitos contíguos e entre miócitos e capilares contíguos. Os “struts” de um miócito a outro poderiam ser responsáveis pelo alinhamento sarcomérico observado entre as células, pela distribuição de forças entre células vizinhas e por impedir o deslizamento entre as células adjacentes, fazendo com que grupos de células funcionem em um modo sincronizado. Além disso, os “struts” entre miócitos e capilares podem ser responsáveis pela patência do capilar durante a sístole. Desta forma, a própria rede fibrilar em si poderia ser responsável por muitas das propriedades viscoelásticas do coração (CAULFIELD e BORG, 1979).

De acordo com as análises “in vitro”, o comportamento celular varia de acordo com as interações celulares com a matriz, mediadas por receptores transmembrana, como as integrinas, e por elementos do citoesqueleto. Quando ativadas, as integrinas agrupam-se a proteínas do citoesqueleto associadas à membrana plasmática, tais como vinculina, talina, paxilina e enzimas sinalizadoras (como proteino-quinases e GTPases), formando placas de adesão focal (HSUEH et al., 1998).

Estes complexos são responsáveis pela transdução das modificações do ambiente extracelular para as células, através de vias de sinalização que inclui: fosforilação de tirosina de proteínas como paxilina; ativação de quinases do complexo de adesão focal, como FAK, Pyk2, Src, serino- e treonina-quinases; proteino-quinase C (CPK), e outras. A possibilidade de

envolvimento destas vias de sinalização no remodelamento cardíaco associado à hipertrofia e insuficiência cardíacas se reforça nos seguintes fatos descobertos *in vitro*: 1) a ativação da integrina induz à formação de placas de adesão, 2) a sinalização pelas integrinas se contrapõe ou tem ação sinérgica com os fatores de crescimento, com a angiotensina, com a angiotensina II, 3) as vias de sinalização podem ser diretamente responsivas a forças mecânicas (JANE-LISE et al., 2000).

Alguns autores têm desenvolvido o conceito de que a transmissão da força contrátil no músculo esquelético não se dá somente na junção músculo-tendínea, mas também por transmissão lateral entre fascículos vizinhos e até mesmo entre células vizinhas, através do tecido conjuntivo intra-muscular. Há dados bioquímicos de estrutura tecidual que demonstram que rede de proteínas do citoesqueleto na região da membrana celular pode transmitir forças a partir dos elementos contráteis para o tecido conjuntivo do endomísio (HUIJING, 1999; MAASA et al., 2001). Pelo menos dois complexos protéicos, um contendo vinculina e outro contendo distrofina, tem o potencial para transmitir forças desde os filamentos de actina até os componentes do endomísio. No entanto, ainda deve ser esclarecido o papel relativo de cada um dos complexos protéicos associados à maquinaria contrátil e à matriz extracelular o papel desempenhado pelos integrantes (MONTI et al., 1999).

1.6.2. Distribuição e aspectos funcionais do sistema elástico na parede ventricular

PERKINS e MILLER, em 1924, relataram pela primeira vez a existência de fibras elásticas no coração. Não tendo nenhuma evidência anatômica clara, os elementos elásticos no coração ficaram esquecidos até o advento do microscópio eletrônico.

Há cerca de 40 anos já se considerou que os elementos elásticos do coração, posicionados tanto em paralelo como em série em relação aos elementos contráteis, seriam determinantes seja para a rigidez passiva ou seja para a velocidade de encurtamento, respectivamente (HEFNER e BOWEN, 1967).

FENOGLIO et al. (1967) publicaram excelentes micrografias eletrônicas de transmissão nas quais é possível observar fibras oxitalânicas. Os autores se referem a estas estruturas apenas como “acúmulo de material fibrilar”, sem fazer nenhuma menção a esta classificação que havia sido já proposta 10 anos antes.

FRANK e LANGER, em 1974, reconheceram, ultra-estruturalmente, a existência de pequenas fibras elásticas ricas em microfibrilas, porém não fazem qualquer menção ao seu papel funcional e nem mesmo as relacionam com o sistema elástico.

Utilizando a microscopia de varredura, uma rede complexa de colágeno fibrilar foi descrita como sendo o elemento elástico mais importante do miocárdio (CAULFIELD e BORG, 1979; & Bittner, 1988; BORG et al, 1982; BORG e CAULFIELD, 1981; ROBINSON et al., 1983, 1985, 1987).

Ainda que ROBINSON et al. (1983, 1985) se refiram à existência de fibras elásticas no epimísio e endomísio, juntamente com as fibras colágenas, os autores são bastante resumidos ao comentarem o seu possível papel funcional em cada um destes compartimentos, colocando o arranjo sinuoso das fibras de colágeno como o principal responsável pelo recolhimento elástico.

Em um estudo utilizando vários órgãos, GOLDFISCHER et al. (1985) reconhece e denomina corretamente “fibras oxitalânicas” no músculo papilar cardíaco em humanos, além de apontá-las como participantes de fenômeno de ancoragem dos elementos teciduais.

Em 1996, pesquisadores brasileiros (CARVALHO FILHO et al.) publicam um estudo morfométrico sobre a diminuição do componente fibrilar do sistema elástico no coração devido ao processo de envelhecimento em humanos, identificando adequadamente as estruturas fibrilares relacionadas ao sistema elástico. O mesmo grupo (FERRAZ-DE-CARVALHO e LIBERTI, 1998), publicou também a descrição atualizada da distribuição da matriz extracelular no septo intraventricular, definindo a existência de uma malha contínua de fibras elásticas, elaunínicas e oxitalânicas imiscuídas entre as fibras de colágeno.

Ainda que os autores não se refiram às microfibrilas como relacionadas ao sistema elástico, e não tenham estudado a elastina, GIBSON et al., em 1998, mostraram que os anticorpos contra MAGP- 1 e MAGP-2 (as glicoproteínas associadas às microfibrilas) reagem fortemente

na região do perímísio e do endomísio no miocárdio, sugerindo uma distribuição diferencial das microfibrilas no músculo cardíaco.

Levando-se em consideração que:

a) de maneira geral, uma rede de fibras elásticas confere aos tecidos a propriedade elástica e mantém a arquitetura dos órgãos protegendo o tecido mesmo quando submetido a expansão repetida (como acontece nos pulmões),

b) o rato tem sido utilizado como modelo experimental para afecções cardiovasculares que implicam remodelamento da matriz extracelular cardíaca, como hipertrofia ventricular, infarto do miocárdio,

c) não existem dados objetivos sobre a distribuição de fibras do sistema elástico nos diferentes compartimentos da parede ventricular, embora existem evidências de que esta distribuição não seja homogênea,

o propósito desta Dissertação foi realizar um estudo sistemático, em microscopia de luz e eletrônica de transmissão, da distribuição diferencial das fibras do sistema elástico (oxitalânicas, elaunínicas e elásticas) no epicárdio, miocárdio e endocárdio do ventrículo esquerdo de ratos normais.

MATERIAL E MÉTODOS

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais

Dez ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar) machos, de aproximadamente 3 meses de idade, mantidos em temperatura constante de 20°C, sob luz controlada, com água e ração *ad libitum*, foram obtidos no Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

2.2. Métodos

2.2.1. Obtenção dos corações

Os animais foram anestesiados com Pentobarbital e eutanasiados por exangüinação. Os pelos da região torácica foram raspados e a pele foi umedecida com álcool.

Com os animais em decúbito dorsal, fez-se uma incisão ao longo do esterno. A caixa torácica foi aberta e, uma vez inspecionados os órgãos da cavidade abdominal, o coração foi retirado. Imediatamente após a retirada, os órgãos foram imersos em soluções fixadoras apropriadas ao processamento para microscopia de luz ou eletrônica.

2.2.2. Microscopia de luz

Os corações foram dissecados de modo a representarem aspectos longitudinais e transversais das paredes ventriculares.

Os fragmentos de tecido foram fixados em solução de paraformaldeído 4% em PBS, por 6 horas, desidratados em gradiente de concentração crescente de álcool etílico e emblocados em parafina. Cortes ventrículo esquerdo, de 6 μ m de espessura, foram submetidos às colorações por Hematoxilina-eosina (para identificação histopatológica) e por Resorcina-fucsina de Weigert (WEIGERT, 1898) com oxidação prévia pela Oxona (FULLMER et al., 1974). Este é um bom método de coloração demonstrando fibras elásticas, elásticas e oxitalânicas, conferindo-lhes uma cor púrpura.

Preparação do corante:

Adicionar 1g de fucsina básica e 2g de resorcina a 100ml de água destilada aquecida. Deixar ferver até a dissolução completa. Adicionar 25ml de solução de cloreto férrico 30% preparada recentemente.

Continuar a fervura por 4 minutos. Resfriar e filtrar, descartando o filtrado. Secar o precipitado em estufa a 56°C. Retirar o precipitado das laterais e do fundo do recipiente original assim como do papel de filtro, dissolvendo o total do precipitado em 100ml de etanol 95% aquecido. Resfriar e adicionar 1ml de HCl concentrado. Guardar em geladeira e filtrar cada vez que for usar.

Método de coloração:

Desparafinar os cortes em xilol e hidratá-los em gradiente alcoólico decrescente até a água. Tratar com solução de Oxona 10% (Du Pont, Wilmington, Delaware, USA) por 40 minutos. Lavar em água corrente por 5 minutos e, a seguir, lavar em uma série crescente de etanol (70 a 95%).

Colocar na solução corante filtrada por uma hora, à temperatura ambiente. Lavar em água corrente por 5 minutos. Se necessário, remover a coloração de fundo por meio de uma solução de álcool ácido 1% (1ml de HCl concentrado e 99ml de etanol 70%) por alguns segundos. Este procedimento deve ser constantemente controlado ao microscópio, tomando-se cuidado para evitar a descoloração das fibras mais finas. Ao final, lavar em água corrente. Desidratar em álcool, diafanizar em xilol e montar.

2.2.3. Microscopia Eletrônica

O material utilizado na obtenção de preparações para microscopia eletrônica constituiu-se de pequenos fragmentos de tecido cardíaco e foi processado seguindo rotina do Laboratório de Biologia Celular (LIM 59) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, resumida nas seguintes etapas:

Pequenos fragmentos representativos das diferentes regiões de interesse foram fixados em solução de ácido tânico 1% dissolvido em glutaraldeído 2,0% em tampão fosfato 0,15M, pH 7,2, por 2 horas. A seguir, procedeu-se à pós-fixação em solução de tetróxido de ósmio 1% em salina. O material fixado foi contrastado em solução de acetato de uranila 0,5% em salina, por 12 horas e incluído em resina Araldite. Os cortes ultra-finos (de 70nm) foram obtidos em ultra-micrótomo Reichert, submetidos a contração dupla por acetato de uranila 2% e por citrato de chumbo 0,5%.

Finalmente, os cortes foram estudados em microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1010.

A adição de ácido tânico ao fixador com intuito de aumentar o contraste de vários componentes do tecido conjuntivo, a nível ultra-estrutural, inclusive das fibras do sistema elástico, foi preconizada por FUTAESAKU et al. (1972). Utilizou-se a concentração 0,1% de ácido tânico, segundo MONTES (1996), por ser suficiente para um contraste regular das fibras do sistema elástico sem prejuízo na preservação dos demais componentes celulares. De fato, a adição de 0,1% de ácido tânico ao glutaraldeído, seguida pelos métodos usuais de processamento e contraste dos tecidos, confere uma forte eletrondensidade à elastina e às microfibrilas associadas.

2.2.4. Avaliação semi-quantitativa

As quantidades relativas de fibras do sistema elástico foram estimadas através de um sistema semi-quantitativo, de acordo com as seguintes classes, de acordo com FERREIRA et al. (1987) e CALDINI et al. (1990):

- (-): ausentes;
- (+): encontradas raramente;
- (++): encontradas com frequência;
- (+++): encontradas em abundância.

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. Hematoxilina-eosina

O coração dos todos os animais mostrou aspecto de normalidade do ponto de vista histopatológico, como arranjo regular dos cardiomiócitos e pequena quantidade de tecido; os vasos sangüíneos e linfáticos se mostraram intactos.

3.2. Resorcina-fucsina com oxidação prévia

A coloração se mostrou adequada para a identificação das fibras do sistema elástico. Como controle positivo em todos os preparados histológicos usou-se a coloração da lâmina limitante interna do sistema arteriolar coronariano. A análise ao microscópio de luz permitiu identificar com facilidade os elementos do sistema elástico no epicárdio e endocárdio; no entanto, raríssimos elementos foram identificados no endo- e perimísio.

3.3. Microscopia eletrônica

Na matriz extracelular do coração, todos os três tipos de fibras do sistema elástico puderam ser identificados no coração, através da microscopia eletrônica, devido a seu alto poder de resolução. Além destas, foi possível identificar populações fibrilas de colágeno de diferentes diâmetros; chama a atenção o fato de que parte considerável do espaço

extracelular está preenchida por substância de aspecto granular e filamentosos, caracterizada como a “substância fundamental amorfa” descrita na Histologia Clássica. Esta substância está em estreita associação com as células, com as fibras de colágeno e com as fibras do sistema elástico em todos os compartimentos da parede ventricular.

3.3.1. Endocárdio

O endocárdio é a camada interna do coração. É constituído por células endoteliais (que revestem a luz das câmaras cardíacas) apoiadas a uma delgada camada de tecido conjuntivo. No rato, este conjuntivo sub-endotelial é dificilmente percebido nos cortes histológicos de rotina corados por HE (Fig.1). Neste compartimento, observa-se uma trama de fibras do sistema elástico localizada imediatamente abaixo das células endoteliais (Fig.2). A microscopia eletrônica revelou a presença de raras fibras elaunínicas e abundantes fibras elásticas propriamente ditas no tecido conjuntivo sub-endotelial (Figs. 3 a 6).

3.3.2. Epicárdio

O epicárdio corresponde ao folheto visceral do pericardio, constituindo o revestimento externo do coração. É composto por epitélio simples pavimentoso (mesotélio) e uma delicada camada de tecido conjuntivo frouxo. No rato, aparece como uma lâmina muito fina, também de difícil reconhecimento ao microscópio de luz e, ao contrário de humanos, não apresenta células adiposas (Fig. 7). Nesta região, a coloração pela

Resorcina-fucsina com oxidação prévia mostra fibras do sistema elástico em toda sua extensão (Fig. 8). O estudo ultra-estrutural revelou que o tecido conjuntivo sub-mesotelial apresenta raras fibras elaunínicas e abundantes fibras elásticas propriamente ditas distribuídas em dois estratos ortogonais entre si: um mais próximo à lâmina basal mesotelial e outro mais próximo ao miocárdio, formando uma trama biaxial (Figs. 9 e 10).

3.3.3. Miocárdio

O tecido muscular encontra-se todo envolvido por tecido conjuntivo: o epimísio envelope o músculo cardíaco como um todo, separando-o do tecido conjuntivo frouxo epicárdico e endocárdico; o perimísio é o tecido conjuntivo que envolve pequenos grupos de cardiomiócitos, dispondo-se como extensões do epimísio contendo vasos e nervos que se infiltram na intimidade do tecido muscular; por sua vez o endomísio envolve cada célula muscular individualmente e constitui uma delicada trama de finas fibras de colágeno e microfibrilas pericelulares (Fig. 11). Exceto pelas regiões onde se localizam os vasos, as fibras do sistema elástico são de difícil visualização no miocárdio (Fig. 12).

Epimísio

A matriz extracelular do epimísio caracteriza-se, ultra-estruturalmente, pela presença de fibras colágenas grossas, formadas por fibrilas grossas, e pela presença de fibras elásticas e elaunínicas (Figs. 13 e 14).

Perimísio

Já no perimísio é possível observar grande quantidade de fibras elaunínicas e oxitalânicas (feixes de microfibrilas aparentemente sem elastina), sendo que as fibras elásticas propriamente ditas são raras (Figs. 15 a 18).

Endomísio

No endomísio do rato, a matriz extracelular apresenta-se rica em delicados feixes de microfibrilas correspondentes às fibras oxitalânicas, ao lado de fibras de colágeno finas, formadas por poucas fibrilas finas. É possível observar também poucas fibras elaunínicas e elásticas, presentes principalmente nas regiões mais espessas do endomísio, onde se encontram vasos capilares (Figs. 19 a 24).

Estes achados, consistentemente observados em todos os corações estudados, estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1. Distribuição diferencial das fibras do sistema elástico no coração de rato. (-): ausentes; (+): raras; (++) : freqüentes; (+++) : abundantes.

	Endocárdio	Epicárdio	Miocárdio		
			epimísio	perimísio	endomísio
Fibras oxitalânicas	-	-	-	+++	+++
Fibras elaunínicas	+	+	+	++	+
Fibras elásticas	+++	+++	++	+	+

Figura 1 – Corte histológico de ventrículo esquerdo de rata corado com HE. As células musculares ocupam a maior parte da imagem. O endocárdio aparece revestindo a luz ventricular. As setas apontam para núcleos de células endoteliais enquanto que o asterisco assinala a delgada camada de tecido conjuntivo subjacente.

Figura 2 – Corte histológico adjacente ao anterior e corado com Resorcina-fucsina após oxidação (ORF). As fibras do sistema elástico sub-endoteliais aparecem coradas em roxo (setas verdes). No canto inferior esquerdo da Figura, o endocárdio foi cortado tangencialmente, expondo a disposição organizada das fibras elásticas. Notar que é possível identificar fibras do sistema elástico entre musculares no miocárdio (seta preta).

Figura 3 - Micrografia eletrônica obtida de um fragmento de ventrículo direito contendo o endocárdio. A célula endotelial (En) reveste uma delgada camada de tecido conjuntivo rica em fibrilas colágenas grossas (C) e densamente empacotadas. Entre a célula endotelial e a fibra colágena nota-se uma fibra do sistema elástico (seta). Trata-se de um feixe de microfibrilas contendo agregados de elastina amorfa. Esta é a característica ultra-estrutural de fibras elastínicas. Notar que a elastina aparece eletrodensa, devido à adição de ácido tânico no fixador. N: núcleo da célula endotelial. M: célula muscular cardíaca.

Figura 4 – Micrografia eletrônica mostrando a presença das fibras elásticas propriamente ditas (setas) no endocárdio. Nesta imagem, as fibrilas de colágeno (C) sub-endocárdico aparecem cortadas transversalmente. Os asteriscos assinalam a substância fundamental que está presente em abundância em toda matriz extracelular cardíaca, inclusive por entre as fibrilas de colágeno. En: célula endotelial de revestimento; M: célula muscular cardíaca.

Figura 5 – O endocárdio representado nesta micrografia eletrônica aparece espessado, devido à presença de um fibroblasto (F) no tecido conjuntivo sub-endotelial. Duas fibras elásticas estão apontadas pelas setas. Notar que a fibra elástica vizinha ao fibroblasto aparece cortada longitudinalmente, permitindo observar a disposição de suas microfibrilas ao redor de um cerne de elastina amorfa. O asterisco marca a substância amorfa característica da matriz extracelular cardíaca. C: fibrilas colágenas. N: núcleo do fibroblasto.

Figura 6 – Micrografia eletrônica mostrando a grande densidade de fibras elásticas presentes no endocárdio. A elastina (El) aparece como material amorfo eletrondenso. Notar a grande quantidade de microfibrilas (seta), que aparecem cortadas transversal e longitudinalmente, associadas ao material elástico. C: fibrilas de colágeno em corte ligeiramente oblíquo; M: célula muscular cardíaca.

Figura 7- Micrografia obtida a partir de uma preparação histológica de ventrículo direito corada com HE. Observar o epicárdio (seta) constituído por uma camada de células planas mesoteliais apoiadas sobre uma delgada lâmina de tecido conjuntivo.

Figura 8 - Corte histológico adjacente ao anterior e corado com Resorcina-fucsina após oxidação (ORF). As fibras do sistema elástico aparecem coradas em roxo (setas verdes) no tecido conjuntivo sub-mesotelial (seta verde). A região do epicárdio é rica em mastócitos, que se coram seletivamente pela Resorcina-fucsina (dois deles podem ser observados logo acima da seta verde). A seta fina aponta para uma das fibras do sistema elástico.

Figura 9 – Micrografia eletrônica de aumento médio obtida de uma região do epicárdio. Notar que o conjuntivo sub-mesotelial corresponde a uma estreita faixa entre a célula mesotelial revestimento (Me) e as células musculares (M). Nesta localização a matriz também é rica em substância amorfa (asterisco). A imagem mostra a presença de várias fibras elásticas (setas verdes).

Figura 10 – A imagem corresponde a uma região do epicárdio na qual pode-se observar a presença de fibras elásticas (setas). Aquelas próximas à célula mesotelial (Me) aparecem cortadas transversalmente. Observa-se ainda a presença de uma fibra elástica cortada longitudinalmente mais próxima às células musculares (M), de modo que as fibras destes dois estratos estão dispostas ortogonalmente entre si.

Figura 11- Micrografia obtida a partir de uma preparação histológica de ventrículo esquerdo corada com HE, mostrando a compartimentalização do tecido muscular. O perimísio (seta verde) corresponde a trabéculas de tecido conjuntivo que penetram no miocárdio, envolvendo grupos de células musculares. Nesta região é possível encontrar arteríolas, vênulas e pequenos feixes de axônios. Por sua vez, cada célula muscular é envolvida por uma delicada trama de tecido conjuntivo denominada endomísio (seta azul). Nessa região podem ser encontrados capilares e terminações nervosas.

Figura 12 – Esta micrografia de um corte de miocárdio corado com ORF. A retração tecidual do miocárdio faz com que grupos de miócitos se separem nas regiões de perimísio (seta verde) durante o processamento do material. A seta azul marca uma região de endomísio. No centro da imagem, observa-se a intensa coloração da lâmina elástica limitante interna e as fibras elásticas (seta preta) da adventícia de uma arteríola.

Figura 13- Micrografia eletrônica de aumento médio do epimísio da parede do ventrículo esquerdo. O epimísio corresponde a uma região de intersecção entre o miocárdio e as regiões sub-epicárdicas ou sub-endocárdicas. Se caracteriza pela presença de fibroblastos e muitas fibras colágenas (C), entre as quais se observam perfis de fibras elásticas e elaunínicas (setas). O asterisco assinala uma região a substância amorfa dispersa por toda a matriz extracelular. N: núcleo de um fibroblasto.

Figura 14 – Micrografia eletrônica de grande aumento, mostrando uma fibra elástica (seta) entre duas fibras colágenas (C) na região do epimísio. M: célula muscular cardíaca.

Figura 15 – Micrografia eletrônica de pequeno aumento de uma região de perimísio, delimitando dois blocos de células musculares (M). Também nesta região, a substância amorfa se dispersa por toda matriz extracelular. Em (C) nota-se uma fibra colagênica com suas fibrilas cortadas longitudinalmente, ladeada por outras duas fibras cortadas transversalmente. Além dos fibroblastos, o tecido conjuntivo cardíaco também é rico em macrófagos (Ma).

Figura 16 – Micrografia eletrônica de médio aumento mostrando uma região de perimísio, tipicamente rica em fibras colágenas, dispostas de maneira ondulada (a mesma fibra apresenta perfis de fibrilas cortadas transversalmente e obliquamente ao longo de seu comprimento (C) e rica em elementos do sistema elástico, principalmente fibras oxitalânicas, caracterizadas como feixes de microfibrilas sem elastina (setas verdes). A seta azul assinala uma fibra elástica rica em microfibrilas. F: fibroblasto.

Figura 17 - Micrografia eletrônica de uma região de perimísio no miocárdio. O asterisco assinala a substância amorfa da matriz extracelular cardíaca. É interessante observar a riqueza de microfibrilas nesta imagem. Elas aparecem não somente ao redor da elastina, formando fibras elásticas (seta azul), fibras elauínicas (seta verde) , mas também envolvendo as fibrilas colagênicas (C).

Figura 18 – Micrografia eletrônica de grande aumento de uma região de perimísio próxima ao lado de uma célula muscular (M). A região de tecido conjuntivo imediatamente vizinha à célula corresponde ao endomísio, que contém a lâmina basal lâmina basal (cabeça-de-seta) da célula muscular e uma trama de fibrilas finas de colágeno. Já na região do perimísio observa-se uma fibra colagênica (C), formada por fibrilas mais grossas. Reparar que, na região de interface entre o perimísio e o endomísio , aparece uma fibra do sistema elástico constituída praticamente apenas por microfibrilas (seta verde).

Figura 19- Micrografia eletrônica mostrando a região do endomísio do músculo cardíaco. O endomísio (cuja espessura está marcada pela seta vermelha) corresponde a uma estreita faixa de tecido conjuntivo que envolve cada célula muscular (M). Neste pequeno aumento é possível observar a substância amorfa (asterisco) e uma fibra colagênica (C).

Figura 20 – Micrografia eletrônica de grande aumento mostrando a região do endomísio. Pode-se observar as lâminas basais de células musculares adjacentes (cabeças-de-seta), uma fina fibra de colágeno (C) e uma fibra oxitalânica (seta verde). Observar que tanto as fibrilas de colágeno como as microfibrilas interagem com elementos das lâminas basais, o que corresponde à base morfológica do fenômeno de transdução dos estímulos mecânicos da matriz para as células. M: célula muscular cardíaca.

Figura 21- Micrografia eletrônica de uma região do endomísio, mostrando partes de duas células musculares adjacentes (M), separadas pelo endomísio, onde encontra-se uma fibra oxitalânica cortada transversalmente (seta verde). Notar a trama microscópica que conecta os elementos da fibra oxitalânica às lâminas basais (marcadas com cabeças-de-seta).

Figura 22 – Nesta micrografia eletrônica é possível observar todo o conjunto de elementos característicos do endomísio, como finas fibras de colágeno (C), fibras elaunínicas ricas principalmente de microfibrilas (seta verde) e fibras oxitalânicas (seta azul) formadas exclusivamente por microfibrilas. Observar ainda que as microfibrilas formam também uma rede frouxa que interliga todos estes elementos entre si, de modo que as fibrilas de colágeno se conectam com as fibras elaunínicas e com as fibras oxitalânicas, que por sua vez se conectam com a lâmina basal (cabeça-de-seta) da célula muscular (M). Assim, pode-se perceber a importância dos elementos do sistema elástico na manutenção da integridade tecidual que possibilita a função biomecânica do miocárdio.

Figura 23- Micrografia eletrônica de uma região do endomísio que mostra de maneira inequívoca que os sistemas colágeno (C) e elástico (seta verde) se interligam molecularmente através do componente microfibrilar do sistema elástico. Observar que as fibrilas do colágeno também interagem diretamente com a lâmina basal (cabeça-de-seta) das células musculares (M).

Figura 24 – Micrografia eletrônica de uma região do endomísio que revela a exuberância de elementos correspondentes às microfibrilas constituintes das fibras do sistema elástico, interagindo com a lâmina basal (cabeça-de-seta) das células musculares (M). Por serem inelásticas, desempenham função de ancoragem, garantindo a manutenção da integridade estrutural durante as mudanças de forma do tecido típicas do ciclo cardíaco.

DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

A caracterização dos diferentes tipos de fibras do sistema elástico no coração foi realizada facilmente devido à existência de critérios morfológicos e histoquímicos específicos.

A matriz extracelular é composta por alguns grupos de macromoléculas incluindo diferentes tipos de colágeno, elastina, proteoglicanos e outros glicoproteínas estruturais. Em todos os vertebrados, o colágeno (em todas as suas diferentes formas) atua como fonte de resistência às forças tenses enquanto que a elastina e os proteoglicanos são essenciais para a resiliência da matriz.

Ainda que, para nesse caso, não existam provas diretas da correlação entre a morfologia e resultados experimentais e que, as implicações funcionais sejam especulativas, o fato de que exista uma distribuição diferencial das fibras oxitalânicas, elaunínicas e elásticas nos tecidos, sugere que a diferença de elasticidade de uma fibra oxitalânica comparada àquela de uma fibra elástica madura proporciona versatilidade ao sistema elástico (MONTES, 1996).

Sabe-se que as propriedades das fibras elásticas dependem do seu componente amorfo, a elastina. Acreditava-se que as fibras oxitalânicas, sendo compostas somente por microfibrilas sem elastina, não se alongariam sob stress mecânico (ROSS, 1973), sendo inelásticas. No entanto, GLAB E WESS (2008), baseados na conformação molecular das microfibrilas, propuseram um modelo que prediz certa capacidade elástica para as fibras

oxitalânicas, ainda que reduzida. Já as fibras elaunínicas, que contêm feixes de microfibrilas e pouco material amorfo, apresentariam propriedades elásticas intermediárias entre aquelas das fibras elásticas e das fibras oxitalânicas (COTTA-PEREIRA, 1984).

Ainda que diversos relatos tenham apontado para a existência de fibras elásticas no miocárdio, epicárdio e endocárdio, até há pouco tempo, as propriedades elásticas do coração foram atribuídas exclusivamente à organização do colágeno (ROBINSON et al., 1985; WEBER et al., 1993), tendo por base o trabalho de CAULFIELD e BORG (1979). Estes autores propuseram um modelo de organização da matriz do endomísio que contempla a existência estruturas colagênicas espiraladas dispostas perpendicularmente às células e conectando células vizinhas, a partir de suas observações do endomísio ao microscópio eletrônico de varredura. Desde então, a maioria dos autores tem interpretado as propriedades mecânicas do miocárdio a partir desse modelo.

As nossas observações da região do endomísio mostram que existe uma grande concentração pericelular de fibras oxitalânicas e/ou de suas microfibrilas arranjadas frouxamente, de modo a formar uma rede delicada que se estende por toda a matriz extracelular, ocupando um espaço proporcionalmente muito maior do que aquele ocupado pelas fibrilas de colágeno nessa mesma localização. Embora não tenha sido relacionada às fibras do sistema elástico, esta rede foi descrita, como um dos constituintes da trama filamentosa da matriz extracelular cardíaca por ROBINSON et al. (1983).

As fibras oxitalânicas ocorrem em regiões nas quais os tecidos estão submetidos a stress mecânico, como o periodonto, a junção dermo-epidérmica e a zônula ciliar. Assim sendo postulou-se que estas fibras atuam prevenindo o estiramento dos tecidos dessas áreas. As microfibrilas das fibras oxitalânicas supostamente têm função de ancoragem, ligando o cristalino ao corpo ciliar no olho, conectando o osso ao cimento do dente no ligamento periodontal, e unindo a epiderme à derme subjacente. Assim sendo, tanto a quantidade como a localização das fibras oxitalânicas e de suas microfibrilas associadas descritas nesse trabalho levam à suposição de que estes componentes desempenham um papel fundamental na integração da contração individual de cada cardiomiócito às mudanças conformacionais do tecido cardíaco como um todo.

As características mecânicas das fibras elásticas indicam que elas são responsáveis pela distensão reversível do tecido conjuntivo. Assim sendo, é de supor-se que, durante os movimentos de contração do miocárdio essas fibras são estiradas, armazenam energia potencial elástica para restaurar a sua configuração original quando o estímulo contrátil cessa momentaneamente durante a diástole.

Tanto o epicárdio como o endocárdio apresentaram-se ricos em fibras elásticas maduras com distribuição biaxial. Este achados concordam com os achados de ROBINSON et al. (1985) em relação às fibras colágenas.

Considerando o seu papel mecânico, é de se esperar que tanto o epicárdio como o endocárdio participem da reconformação elástica do coração assim como contribuam para limitar sua distensão. Suspeita-se que,

por causa de sua localização e sensibilidade à injúria, o epicárdio pode atuar como um sensor para identificar mudanças na pressão no espaço extra-cardíaco. Acredita-se que o líquido do saco pericárdico, um ultra-filtrado do plasma, tenha uma função restritiva durante a sístole (WILLS et al., 2008). De fato, o epicárdio e o endocárdio possuem maior concentração de fibras colágenas e elásticas, quando comparados ao miocárdio.

De acordo com os nossos resultados esta dupla função mecânica destes compartimentos (limitação de volume e reconformação elástica) é possível pela atuação sinérgica das fibras dos sistemas elástico e colagênico. Especificamente as fibras elásticas contribuiriam para a reconformação de toda a matriz à sua configuração inicial quando as forças contráteis desaparecem momentaneamente na diástole. Na sístole, ocorre o estiramento passivo do epicárdio e do endocárdio pela ação muscular, enquanto que, imediatamente antes da diástole, ocorre o seu retorno à configuração original devido às propriedades físicas das fibras elásticas, sem gasto de energia, o contrário do que ocorre na fibra muscular, cujo relaxamento é um processo ativo. Por outro lado, durante o enchimento ventricular rápido ocorre novamente o estiramento do epicárdio (JÖBSIS et al., 2007) e novamente as suas fibras elásticas seriam responsáveis pelo recolhimento elástico ventricular que precede a sístole.

Os nossos dados confirmam aqueles de JÖBSIS et al. (2007), que descreveram a presença de fibras elásticas no endocárdio e no epicárdio. No entanto, estes autores identificaram fibras elásticas através da auto-fluorescência da elastina. Assim sendo, não puderam identificar as fibras

elaunínicas (que tem pouca quantidade de elastina) e muito menos as fibras oxitalânicas que, por serem constituídas apenas por microfibrilas, não são fluorescentes.

Sabe-se que as propriedades mecânicas dos tecidos decorrem em grande parte dos componentes da matriz extracelular, principalmente da relação entre elastina e colágeno, que conferem respectivamente a elasticidade e a resistência.

MUJUMDAR e TYAGI (1999) verificaram, através de dosagens bioquímicas, que ocorre um aumento de elastase e da degradação da elastina no coração de ratos espontaneamente hipertensos, paralelamente ao aumento de colágeno durante o processo de hipertrofia ventricular, havendo uma diminuição drástica da relação elastina/colágeno. As alterações do metabolismo da elastina se correlacionam com o aparecimento da fase de insuficiência cardíaca nestes animais.

Outra evidência sobre a importância do sistema elástico vem da observação que níveis elevados de elastase sérica após o infarto do miocárdio contribuem para o remodelamento cardíaco associado a dilatação e disfunção ventricular (OHTA et al., 2004). Dado que as propriedades mecânicas dos tecidos são a base para a atividade fisiológica dos órgãos e que, no coração, essas propriedades derivam da relação entre força e deformação do miocárdio, o componente elástico da matriz extracelular deve estar potencialmente envolvido no processo cicatricial, que se caracteriza pela substituição deste arcabouço delicado e frouxamente organizado que

sustenta as fibras musculares por um tecido colagênico fibroso compacto, alterando a função biomecânica com prejuízo da contração muscular.

É interessante observar que o nosso achado de localização de fibras elásticas propriamente ditas no epicárdio e no endocárdio ao lado de fibras colágenas grossas (com o aspecto ultra-estrutural de fibras de colágeno tipo I) é semelhante àquele para o epitendineum, para o epineuro, e para a derme mais profunda (CALDINI et al., 1990; FERREIRA Jr. et al., 1987 e COTTA-PEREIRA et al., 1976, respectivamente). Por outro lado, a co-localização de existência de fibras oxitalânicas e fibras finas de colágeno (com padrão estrutural de fibras de colágeno tipo III) no endomísio e perimísio do músculo cardíaco é semelhante àquela encontrada no peritendineum, no endoneuro e na derme papilar (CALDINI et al., 1990; FERREIRA Jr. et al., 1987 e COTTA-PEREIRA et al., 1976, respectivamente). Nossos achados são, portanto, compatíveis com a hipótese de que os sistemas colagênico e elástico co-evoluíram de modo a acomodar a diversidade funcional (MONTES, 1996).

De modo geral, uma série de funções tem sido atribuída à trama colagênica do coração, a saber: 1) suporte e alinhamento de miócitos, de vasos e de nervos, preservando a espessura e arquitetura do miocárdio; 2) controle do deslizamento dos miócitos entre si; 3) transdução da força gerada pela contração dos miócitos para a câmara ventricular; 4) proteção contra o estiramento excessivo dos miócitos na diástole; 5) base anatômica da consistência rígida do miocárdio e do epicárdio, e 6) prevenção de ruptura tecidual devida à sua grande força tênsil. No entanto, estas funções

foram atribuídas estudando-se a matriz extracelular como um todo, sem a exclusão dos elementos do sistema elástico que, conforme demonstramos, são ubíquos no tecido ventricular. Assim sendo, daqui para frente, teremos a tarefa de separar a quais elementos pertence esta ou aquela função e como se dá a sua interação.

Um modo elegante de se abordar este problema seria a utilização de modelos animais com deleção do gene para elastina ou para as proteínas das microfibrilas ou ainda estudar doenças derivadas de defeitos moleculares na expressão destas proteínas. Os defeitos moleculares dos genes da fibrilina resultam em fenótipos que são essencialmente diferentes dos fenótipos causados por mutação no gene da elastina, ainda que ambas proteínas sejam constituintes da fibra elástica (respectivamente síndrome de Marfan e síndrome de William, por exemplo). Existem dois mecanismos, pelo menos, que explicam estas diferenças. Primeiramente, as microfibrilas estão presentes em certas localizações anatômicas sem associação de elastina (formando as fibras oxitalânicas, como na zônula ciliar, na junção dermo-epidérmica, no endomísio, por exemplo). As anormalidades nestas localizações resultam em fenótipos não relacionados à disfunção de fibras elásticas. Em segundo lugar, tratando-se da fibra elástica, na qual coexistem a elastina e as microfibrilas, cada uma destas proteínas deve ser responsável por diferentes funções, incluindo interação célula-matriz, propriedades mecânicas de recolhimento elástico e força de tensão. Assim sendo, as diferenças fenotípicas entre as doenças por defeitos na fibrilina ou elastina podem ser causadas pela perda de uma função específica de uma

destas proteínas. Ainda são necessários estudos em modelos animais e “*in vitro*” para que a arquitetura funcional das fibras do sistema elástico seja totalmente elucidada (MILEWICZA et al., 2000).

Nosso trabalho demonstra que o coração não é uma estrutura homogênea do ponto de vista da distribuição da elastina e das microfibrilas (ricas em fibrilina), uma vez que a elastina está presente em maior concentração nos tecidos de revestimento interno e externo do coração (endocárdio e epicárdio). Assim sendo, as afecções que lesam o endocárdio e epicárdio (lesando por consequência fibras elásticas) provavelmente levariam a um fenótipo de disfunção elástica.

Uma vez que a fibrose cardíaca contribui para a disfunção cardíaca e arritmia associada à morte súbita, a prevenção da deposição excessiva de colágeno tem sido um importante alvo terapêutico. O papel de outros componentes da matriz extracelular que promovem elasticidade e resiliência da matriz (como os proteoglicanos e as fibras elásticas) não tem sido estudado. Sabe-se já que o tratamento com inibidores de serino proteinases (como a elastase-2), após o infarto do miocárdio, diminui o infiltrado inflamatório e o dano na função cardíaca. Isto provavelmente se deve à conservação das fibras elásticas existentes no coração. (BIDOUARD et al., 2003; OHTA et al., 2004) Recentemente demonstrou-se que é possível modificar a constituição da cicatriz cardíaca, aumentar a elasticidade e melhorar a função cardíaca através do transplante de células que super-expressam elastina (MIZUNO et al., 2005) Assim sendo, aumentar a

elastogênese no período pós-infarto introduziu um novo conceito terapêutico que precisa ainda de uma avaliação mais detalhada.

Outra informação valiosa que pode ser depreendida da análise das micrografias eletrônicas apresentadas nesta Dissertação é dada por uma série de imagens mostrando a interação entre as células e a matriz extracelular, tanto na sua porção amorfa, como fibrilar. Estas imagens revelam o aspecto morfológico da integração célula-matriz e dos elementos da matriz entre si. É através destas interações que ocorre a transdução dos sinais que regulam finamente os mecanismos de proliferação, migração e diferenciação e secreção das células envolvidas. Claro está que não é possível através destas imagens deduzir quais são os mecanismos internos desta regulação (KIELTY, 2006), mas a possibilidade de “ver”, no tecido íntegro, a interação macromolecular reforça as hipóteses levantadas em estudos mais limitados do ponto de vista morfológico, como os cultivos celulares ou bioquímicos.

Também vale a pena observar que o material granuloso-filamentar ubíquo em toda a matriz extracelular continua sem definição de sua natureza bioquímica e já foi notado por alguns autores anteriormente não somente no coração, mas também na porção inicial da aorta (GUYTON et al., 1983; ROBINSON et al., 1983; EGHBALI, 1992; VASILJEVIĆ et al., 2001).

Os maiores desafios propostos para o entendimento da biologia do sistema elástico são conhecer precisamente como as microfibrilas e a elastina se polimerizam e como este enorme repertório de moléculas associadas contribui para formar uma fibra elástica funcional. Deste modo,

será possível compreender as bases fisiopatológicas das doenças hereditárias ou adquiridas que apresentam descontrolo na formação ou no papel funcional dos elementos que compõem a fibra elástica. Outro tema importante é: como as fibras do sistema elástico regulam o comportamento celular, através de adesão celular ou pelo TGF-beta? Como repetir os passos ontogenéticos que levam à formação destas fibras para “guiar” um processo de regeneração miocárdica eficiente? Responder a estas questões irá ajudar a compreender melhor a biologia das fibras do sistema elástico na saúde e nas afecções patológicas (KIELTY, 2006).

Como proposto por HUNTER e BORG (2003), vivemos em uma época de progresso substancial no entendimento da estrutura e função miocárdica, do ponto de vista da genética e da biologia molecular. O rápido acúmulo de conhecimento impõe uma mudança urgente de paradigma, sendo necessária a integração nos múltiplos níveis de organização biológica:

- das proteínas para as células, tecidos, órgãos e sistemas – para que possamos entender a complexidade da interação entre forma e função que gera um comportamento específico (normal ou anormal) nos sistemas biológicos. Assim sendo, na nossa pequena escala, fazendo a descrição precisa da distribuição diferencial das fibras do sistema elástico acreditamos ter contribuído de modo eficiente para se compreender a interação entre forma e função no coração.

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

5.1. A parede ventricular não é uma estrutura homogênea do ponto de vista da distribuição das fibras do sistema elástico.

5.2. As fibras elásticas e elaunínicas predominam nas estruturas conjuntivas periféricas ao músculo cardíaco, ou seja, no endocárdio e no pericárdio.

5.3. As fibras oxitalânicas predominam no perimísio e no endomísio, na intimidade do tecido muscular cardíaco.

5.4. Existe uma grande interação entre os elementos da matriz extracelular e as células, através das lâminas basais.

5.5. As fibras oxitalânicas se co-localizam preferencialmente com as fibras de colágeno tipo III enquanto que as fibras elásticas se co-localizam preferencialmente com as fibras de colágeno tipo I.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD.. *The extracellular matrix of animals*. Molecular biology of the cell. 4° ed. Ed New York & London, Garland, 2002, p. 971-84.
- Arribas SM, Hinek A, González MC. Elastic fibres and vascular structure in hypertension. *Pharmacology & Therapeutics* 11: 771–791, 2006.
- Ashworth JL, Murphy G, Rock MJ, Sherratt MJ, Shapiro SD, Shuttleworth CA, Kielty CM. Fibrillin degradation by matrix metalloproteinases: implications for connective tissue remodelling. *Biochem J.*, 15:171-81, 1999.
- Bidouard JP, Duval N, Kapui Z, Herbert JM, O'Connor SE, Janiak P. SSR69071, an elastase inhibitor, reduces myocardial infarct size following ischemia-reperfusion injury. *Eur J Pharmacol* 461: 49–52, 2003.
- Bishop JE. Regulation of cardiovascular collagen deposition by mechanical forces. *Mol Med Today*, 4: 69-75, 1998.
- Böck P, Stockinger L. Light and electron microscopic identification of elastic, elaunin and oxytalan fibers in human tracheal and bronchial mucosa. *Anat Embryol.*, 170: 145-53, 1984.
- Böck P. Histochemical demonstration of disulphidic-groups in the lamina propria of human seminiferous tubules. *Anat Embryol.*, 153: 157-66, 1978.
- Borg TK, Caulfield JB. The collagen matrix of the heart.. *Fed Proc.*, 40: 2037-41, 1981.
- Borg TK, Sullivan T, Ivy J. Functional arrangement of connective tissue in striated muscle with emphasis on cardiac muscle. *Scan Electron Microsc. Pt 4*:1775-84, 1982.
- Bradamante Z, Svajger A. Pre- elastic (oxytalan) fibres in the developing elastic cartilage of the external ear of the rat. *J. Anat.*, 123: 735-43, 1977.
- Braga-Vilela AS, de Campos Vidal B. Identification of elastic fibers and lamellae in porcine pericardium and aorta by confocal, fluorescence and polarized light microscopy. *Acta Histochem*, 108:125-32, 2006.
- Brilla CG, Maisch B, Weber KT. Renin-angiotensin system and myocardial collagen matrix remodeling in hypertensive heart disease: in vivo and in vitro studies on collagen matrix regulation. *Clin Investig.*, 71(5 S): S35-41, 1993.
-

- Burlew B, Weber KT. Connective tissue and the heart. Functional significance and regulatory mechanisms, *Cardiol. Clin.* 18: 435-442, 2000.
- Caldini EG, Caldini N, De-Pasquale V, Strocchi R, Guizzardi S, Ruggeri A, Montes GS. Distribution of elastic system fibres in the rat tail tendon and its associated sheaths. *Acta Anat.*, 139: 341-348, 1990.
- Campbell KP. Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* 80: 675-679, 1995.
- Carvalho Filho ET, Carvalho CA, Souza RR. Age-related changes in elastic fibers of human heart. *Gerontology*, 42: 211-7, 1996
- Caufield JB, Borg TK. The collagen network of the heart. *Laboratory Investigation*, 40: 364-372, 1979.
- Chakraborty A, Eghbali M. Collagenase activity in the normal rat myocardium: an immunohistochemical method. *Histochemistry* 92: 391-398, 1989.
- Cotta-Pereira G, Rodrigo FG, Bittencourt-Sampaio S. Oxytalan, elaunin and elastic fibers in the human skin. *J. Invest. Dermatol.*, 66: 143-148, 1976.
- Cotta-Pereira G, Del-Caro LM, Montes GS. Distribution of elastic system fibers in hyaline and fibrous cartilages of the rat. *Acta Anat.*, 119: 80-85, 1984.
- Creemers EE, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen MJ Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ Res.*, 89: 201-10, 2001.
- Dolber PC, Spach S. Conventional and Confocal Fluorescence Microscopy of Collagen Fibers in the Heart. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 41: 461-469, 1993.
- Eghbali M. Cardiac fibroblasts: function, regulation of gene expression, and phenotypic modulation. *Basic Res Cardiol.*, 87:183-9, 1992.
- Fawcett, DW. Tratado de histologia Bloom-Fawcett. Madrid:Interamericana-McGraw-Hill. p.369-403, 1987.
- Fedak PW, Verma S, Weisel RD, Skrtic M, Li RK. Cardiac remodeling and failure: from molecules to man (Part III). *Cardiovasc Pathol.*, 14: 109-19, 2005.
- Fenoglio JJ Jr, Wagner BM. Studies in rheumatic fever. VI. Ultrastructure of chronic rheumatic heart disease. *Am J Pathol.* 73 :623-40, 1973.
-

- Ferraz-de-Carvalho CA, Liberti EA. The membranous part of the human interventricular cardiac septum. *Surg Radiol Anat.*, 20:13- 21, 1998.
- Ferreira JMC, Caldini EG, Montes GS. Distribution of elastic system fibers in the peripheral nerves of mammals. *Acta Anat.*, 130: 168-173, 1987.
- Finnis ML, Gibson MA. Microfibril-associated glycoprotein-1 (MAGP-1) binds to the pepsin-resistant domain of the alpha3(VI) chain of type VI collagen. *J Biol Chem.*, 272: 22817-23, 1997.
- Frank JS, Langer GA. The myocardial interstitium: its structure and its role in ionic exchange. *The Journal of Cell Biology*, 60: 586-601, 1974.
- Fullmer HM. A comparative histochemical study of elastic, pre-elastic and oxytalan connective tissue fibers. *J Histochem Cytochem*, 8: 290-295, 1960.
- Fullmer HM, Lillie RD. The oxytalan fiber: a previously undescribed connective tissue fiber. *J. Histochem. Cytochem.*, 6: 425-430, 1958.
- Fullmer HM, Sheetz JH, Narkates AJ. Oxytalan connective tissue fibers: a review. *J.Oral Pathol.*, 3: 291-316, 1974.
- Futaesaku Y, Mizuhira V, Nakamura H. A new fixation method using tannic acid for electron microscopy and some observations of biological specimens. *Proc. 4th International Congress Histochem.Cytochem Kyoto*: 155-156, 1972.
- Gawlik Z. Morphological and morphochemical properties of the elastic system in the motor organ of man. *Folia Histochem. Cytochem.* 3: 233-51, 1965.
- Gerli R, Ibba L, Fruschelli C. A fibrillar elastic apparatus around human lymph capillaries. *Anat Embryol.*, 181: 281-286, 1990.
- Gibson MA, Clearly EG. The immunohistochemical localization of microfibril-associated glycoprotein (MAGP) in elastic and non elastic tissues. *Immunol. Cell Biol.*, 6: 345-56, 1987.
- Gibson MA, Finnis ML, Kumaratilake JS, Cleary EG.. Microfibril-associated glycoprotein-2 (MAGP-2) is specifically associated with fibrillin-containing microfibrils but exhibits more restricted patterns of tissue localization and developmental expression than its structural relative MAGP-1. *J Histochem Cytochem.* 46: 871-86, 1998.
- Glab J, Wess T. Changes in the molecular packing of fibrillin microfibrils during extension indicate intrafibrillar and interfibrillar reorganization in elastic response. *J Mol Biol.*, 383:1171-80, 2008.
-

- Goldfischer S, Coltoff-Schiller B, Goldfischer M. Microfibrils, elastic anchoring components of the extracellular matrix, are associated with fibronectin in the zonule of Zinn and aorta. *Tissue Cell.*;17(4):441-50, 1985.
- Graham HK, Horn M, Trafford AW. Extracellular matrix profiles in the progression to heart failure. *Acta Physiol*, 194: 3-21, 2008.
- Guyton JR, Lindsay KL, Dao DT. Comparison of aortic intima and inner media in young adult versus aging rats. Stereology in a polarized system. *Am J Pathol.*, 111:234-46, 1983.
- Hefner LL, Bowen TE Jr. Elastic components of cat papillary muscle. *Am J Physiol.*, 212: 1221-7, 1967.
- Hsueh WA, Law RE, Do YS. Integrins, adhesion, and cardiac remodeling. *Hypertension*, 31: 176-180, 1998.
- Huijing PA Muscle as a collagen fiber reinforced composite: a review of force transmission in muscle and whole limb. *Biomech.*, 32: 329-45, 1999.
- Jalil JE, Doering CW, Janicki JS, Pick R, Shroff SG, Weber KT. Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle. *Circ Res.*, 64: 1041-50, 1989.
- Jane-Lise S, Corda S, Chassagne C, Rappaport L. The Extracellular Matrix and the Cytoskeleton in Heart Hypertrophy and Failure. *Heart Failure Reviews*, 5: 239-250, 2000.
- Janicki JS, Brower GL. The role of myocardial fibrillar collagen in ventricular remodeling and function. *J Card Fail.* (6 S): S319-25, 2002.
- Jöbsis PD, Ashikaga H, Wen H, Rothstein EC, Horvath KA, McVeigh ER, Balaban RS. The visceral pericardium: macromolecular structure and contribution to passive mechanical properties of the left ventricle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293: H3379-87, 2007
- Junqueira LCU, Montes GS, Martins JEC, Joazeiro PP. Dermal collagen distribution. A histochemical and ultrastructural study. *Histochemistry*, 79: 397-402, 1983.
- Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p. 206-226.
- Kielty CM.. Elastic fibres in health and disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 8, 1- 6, 2006.
- Kielty CM, Baldock C, Lee D, Rock MJ, Ashworth JL, Shuttleworth CA. Fibrillin: from microfibril assembly to biomechanical function. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 357:207-17, 2002.
-

- Lee BL, Godfrey M, Vitale E, Hori H, Mattei, M G, Sarfarazi M, Tsipouras P, Ramirez F, Hollister DW. Linkage of Marfan syndrome and a phenotypically related disease to two different genes. *Nature* 352: 330–334, 1991.
- Maasa H, Baana GC, Huijing PA. Intermuscular interaction via myofascial force transmission: effects of tibialis anterior and extensor hallucis longus length on force transmission from rat extensor digitorum longus muscle. *Journal of Biomechanics*, 34: 927-940, 2001.
- Macchiarelli G, Ohtani O. Endomysium in heart left ventricle as showed by SEM-NaOH maceration method. *Heart* 86: 416, 2001.
- MacKenna DA, Omens JH, Covell JW.. Left ventricular perimysial collagen fibers uncoil rather than stretch during diastolic filling. *Basic Res Cardiol.*, 91: 111-22, 1996.
- MacKenna DA, Vaplon S, McCulloch A. Microstructural model of perimysial collagen fibers for resting myocardial mechanics during ventricular filling. *Am. J. Physiol.* 273: H1576–H1586, 1997.
- Mamuya WS, Brecher P. Fibronectin expression in the normal and hypertrophic rat heart. *J Clin Invest*, 89:392-401,1992.
- Mecham RP, Heuser JE. The elastic fiber. In: Hay E. ed. *Cell Biology of Extracellular Matrix*. New York, Plenum Press. 1991. p.79-109.
- Milewicz DM, Zsolt Urbán U, Boydb C. Genetic disorders of the elastic fiber system. *Matrix Biology*, 19: 471-480, 2000.
- Mizuno T, Yau TM, Weisel RD, Kiani CG, Li RK: Elastin stabilizes an infarct and preserves ventricular function. *Circulation*, 112: 181–188, 2005.
- Montes GS. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol. Int.*,20: 15-27, 1996.
- Monti RJ, Roy RR, Hodgson JA, Edgerton VR Transmission of forces within mammalian skeletal muscles. *J Biomech.*, 32: 371-80, 1999.
- Morita T, Shimada T, Kitamura H, Nakamura M. *Archives of Histology and Cytology*, 54: 539-550, 1991.
- Mujumdar VS, Tyagi SC. Temporal regulation of extracellular matrix components in transition from compensatory hypertrophy to decompensatory heart failure. *Journal of Hypertension*, 17(2):261-270, 1999.
- Naugle JE, Olson ER, Zhang X, Mase SE, Pilati CF, Maron MB, Folkesson HG, Horne WI, Doane KJ, Meszaros JG. Type VI collagen induces
-

- cardiac myofibroblast differentiation: implications for postinfarction remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 290: H323-30, 2006.
- Ohta K, Nakajima T, Cheah AY, Zaidi SH, Kaviani N, Dawood F, You XM, Liu P, Husain M, Rabinovitch M. Elafin-overexpressing mice have improved cardiac function after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287(1):H286-92, 2004.
- Parry DAD, Craig AS. Collagen fibrils during development and maturation and their contribution to the mechanical attributes of connective tissue. In: Nimni ME (ed.) *Collagen*. Vol II. Boca-Raton, CRC Press, 1988. p.1-23.
- Partridge SM. Elastin. *Adv. Prot. Chem.*, 17: 227-302, 1962.
- Perkins OC, Miller AM. Some observations on the elastic tissue of the heart. *Anat Rec.*, 27, 1924.
- Ramirez F, Dietz HC. Fibrillin-Rich Microfibrils: Structural Determinants of Morphogenetic and Homeostatic Events *J. Cell. Physiol.*, 213: 326–330, 2007.
- Reynolds JJ, Meikle MC. Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis. *Periodontol*, 2000:144-57, 1997.
- Robinson TF, Cohen-Gould L, Factor SM. The skeletal framework on mammalian heart muscle: arrangement of inter- and peri-cellular connective tissue structures. *Lab Invest*, 49: 482-497, 1983.
- Robinson TF, Cohen-Gould L, Remily RM, Capasso JM, Factor SM. Extracellular structures in heart muscle *Adv. Myocardiol*, 5:243–255, 1985.
- Robinson TF, Factor SM, Capasso JM, Wittenberg BA, Blumenfeld OO, Seifter S. Morphology, composition, and function of struts between cardiac myocytes of rat and hamster. *Cell Tissue Res.*, 49: 247-55, 1987.
- Rodrigo FG, Cotta-Pereira G, David-Ferreira JF. The fine strutral of the elastic tendons in the human arrector pili muscle. *Br J Dermatol.*, 93: 631-7, 1975.
- Rosenbloom J, Abrams WR, Mecham R. The elastic fiber. *FASEB J.*, 7: 1208-18, 1993.
- Ross R. The elastic fiber. A review. *J. Histochem. Cytochem.*, 21: 199-208, 1973.
-

- Ross R, Bornstein P. The elastic fiber. I. The separation and partial characterization of macromolecular components. *J Cell Biol.*, 40: 366-81, 1969.
- Ross R, Fialkow PJ, Altman K. The morphogenesis of elastic fibers. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 79: 7-17, 1977.
- Sage H, Gray WR. Studies on the evolution of elastin. I. Philogenetic distribution. *Comp. Biochem. Physiol.* 64: 313-27, 1979.
- Sakai LY, Keene DR, Engvall E. Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. *J. Cell Biol.* 103: 2499-2509, 1986.
- Schaper J, Hein S. The structural correlate of reduced cardiac function in human dilated cardiomyopathy. *Heart Failure*, 9: 95-111, 1993.
- Shapiro SD, Endicott SK, Province MA, Pierce JA, Campbell EJ. Marked longevity of human lung parenchymal elastic fibers deduced from prevalence of D-aspartate and nuclear weapons-related radiocarbon. *J. Clin. Invest.*, 87: 1828-34, 1991.
- Sherratt MJ, Wess TJ, Baldock C, Ashworth J, Purslow PP, Shuttleworth CA, Kielty CM. Fibrillin-rich microfibrils of the extracellular matrix: ultrastructure and assembly. *Micron*, 32: 185-200, 2001.
- Souza AD, Montes GS, Vilela BTX, Cruz AC, Cotta-Pereira G. Elastic-related fibers in the annular ligament of the stapes-oval window articulation. An electron microscopic and histochemical study in the rat and the rabbit. *Rev Laryngol.*: 112: 7-10, 1991.
- Souza RR. Aging of myocardial collagen. *Biogerontology*, 3: 325-335, 2002.
- Speiser B, Riess CF, Schaper J. The extracellular matrix in human myocardium: Part I: Collagens I, III, IV, and VI. *Cardioscience*, 2: 225-232, 1991.
- Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev.* 87: 1285-342, 2007.
- Streeten BW, Licari PA. The zonules and the elastic microfibrillar system in ciliary body. *Invest. Ophthalmol.*, 24: 667-81, 1983.
- Ushiki T. Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. *Arch Histol Cytol.*, 65:109-26, 2002.
- Vasiljević JD, Popović ZB, Otaević P, Popović ZV, Vidaković R, Mirić M, Neković AN. Myocardial fibrosis assessment by semiquantitative, point-
-

counting and computer-based methods in patients with heart muscle disease: a comparative study. *Histopathology*, 38: 338-343, 2001.

Weber KT, Brilla CG, Janicki JS Myocardial fibrosis: functional significance and regulatory factors. *Cardiovasc Res.*,27(3):341-348, 1993.

Weber KT, Sun Y, Tyagi SC, Cleutjens JP. Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms. *J Mol Cell Cardiol*, 26: 279-292, 1994.

Weigert, C. Ueber eine Methode zur Färbung elastischer. *Fasern. Zentbl. allg. Path. path. Anat.*, 9: 289-92, 1898.

Weiss L, Greep RO. Histology. New York: McGraw-Hill. p. 373-433, 1977.

Wenstrup RJ, Florer JB, Brunskill EW, Bell SM, Chervoneva I, Birk DE. Type V collagen controls the initiation of collagen fibril assembly. *J Biol Chem* 279 ; 53331–53337, 2004.

Wills AA, Holdway JE, Major RJ, Poss KD.. Regulated addition of new myocardial and epicardial cells fosters homeostatic cardiac growth and maintenance in adult zebrafish. *Development.*, 135:183-92, 2008.

Wilson EM, Spinale FG. Myocardial remodeling and matrix metalloproteinases in heart failure: turmoil within the interstitium. *Ann Med*, 33: 623–634, 2001.

Wright DM, Duance VC, Wess TJ, Kielty CM, Purslow PP. The supramolecular organisation of fibrillin-rich microfibrils determines the mechanical properties of bovine zonular filaments. *The Journal of Experimental Biology*, 202: 3011–3020, 1999.