MILENE SANCHES GALHARDO

**Distribuição diferencial e remodelamento dos elementos
fibrilares da matriz extracelular no coração de ratos
espontaneamente hipertensos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Elia Garcia Caldini

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011.
A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Galhardo, Milene Sanches

Distribuição diferencial e remodelamento dos elementos fibrilares da matriz extracelular no coração de ratos espontaneamente hipertensos / Milene Sanches Galhardo. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientadora: Elia Tamaso Espin Garcia Caldini.

Descritores: 1.Coração 2.Hipertensão 3.Colágenos fibrilares 4.Fibras elásticas 5.Rato espontaneamente hipertensivos 6.Microscopia eletrônica de transmissão

USP/FM/DBD-244/12

Dedico mais esta conquista a:

*Meus amados pais, **Eurípedes** e **Aparecida**, que são os meus maiores tesouros. É sempre uma grande alegria ver o brilho orgulhoso de seus olhos!*

*Minha irmã, **Joice**, que esteve sempre ao meu lado e, com seu bom humor, realçou a alegria de cada momento.*

Agradecimentos

À querida orientadora **Profa. Dra. Elia Garcia Caldini** grande incentivadora e idealizadora deste trabalho. Obrigada pelas horas agradáveis que passamos juntas, quando, com muita paciência, conduziu esse trabalho.

À **Dra. Maria Claudia Irigoyen**, que disponibilizou o Laboratório de Hipertensão Experimental do InCor e sua equipe para as medidas de hemodinâmica, pelos valiosos conselhos.

À **Dra. Ivana Cinthya de Moraes da Silva**, do Laboratório de Hipertensão Experimental do InCor, pelas explicações precisas sobre hemodinâmica e auxílio nas perfusões.

À **Profa Dra. Olga Maria de Toledo Correa**, da Faculdade de Medicina do ABC, que sempre me iniciou na carreira acadêmica, por abrir seu laboratório para a realização das técnicas de microscopia de luz.

À **Mestre Juliana Mora Veridiano**, técnica do Laboratório de Histologia da Faculdade de Medicina do ABC, minha querida amiga, pelo auxílio no processamento do material.

À **Dr. Cristiano Mostarda, Edson Dias Moreira, Dr. Kaleizu Rosa, Dra. Karin Flues, Leandro de Souza, Maikon Silva, Roberto Nascimento**, do Laboratório de Hipertensão Experimental do InCor, pelo auxílio inestimável nos testes de hemodinâmica.

Ao **Dr. Marcelo Alves Ferreira**, do Laboratório de Biologia Celular da FMUSP, pelo auxílio na análise estatística e no exame ao microscópio eletrônico.

À **Dra. Mariana Matera Veras**, do Laboratório de Poluição Experimental da FMUSP, pelos ensinamentos de estereologia.

À **Adão Caetano Sobrinho, Hélio Corrêa, Maria Cecília Lobo Marcondes Maria Margarida Teixeira Monteiro e Mirian Regina Taborda Simoni**, técnicos do Centro Multiusuário de Microscopia Eletrônica da FMUSP, que pacientemente me ajudaram a alcançar os resultados desta Tese. Sem o seu trabalho minucioso esta tarefa teria sido impossível.

À **Dra. Claudia Naves Battlehner, Cristina Fonseca (in memoriam), Felipe Garcia Storace, Gildásio Vieira Rocha, Maria Ires Amorim, Ms. Nilsa Regina Damaceno-Rodrigues, Rosemeire Firmino e Valeria Veiga Sales**, funcionários do Laboratório de Biologia Celular (LIM 59) da FMUSP, por todo o apoio e pelas agradáveis horas que passamos juntos.

*Á Profa. Dra. **Ana Cristina Gobbo César**, minha querida colega do Instituto Básico de Biociências da Universidade de Taubaté, que tomou para si tarefas que eram minhas para que eu pudesse me dedicar mais a este trabalho.*

*À **Maria de Fátima Pacheco**, técnica do Laboratório de Histologia da Universidade de Taubaté, pelo auxílio na técnica de microscopia de luz.*

*À **Diva Collapaula Carvalho, Liduvina da Silva Neta de Barros, Tania Regina de Souza**, da Secretária do Programa Fisiopatologia Experimental da FMUSP, pelo valioso auxílio durante estes anos.*

*Ao **LIM 59** por todo apoio técnico e financeiro.*

“O rio atinge seu objetivo porque aprendeu a contornar obstáculos.” (Lao Tsé)

“O assunto mais importante do mundo pode ser simplificado até ao ponto em que todos possam apreciá-lo e compreendê-lo. Isso é -ou deveria ser- a mais elevada forma de arte.” (Charles Chaplin)

“Nós não somos o que gostaríamos de ser; nós não somos o que ainda iremos ser; mas, graças a Deus, não somos mais quem nós éramos.” (Martin Luther King)

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Carneiro da Cunha A., Freddi MJAL, Crestana MF, Aragão MS, Cardoso SC, Vilhena V. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE GRÁFICOS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 Compartimentos da Parede Cardíaca	4
2.1.1 Pericárdio	4
2.1.2 Miocárdio	5
2.1.3 Endocárdio	6
2.2 Elementos Fibrilares da Matriz Extracelular	7
2.2.1 Sistema colagênico	9
2.2.1.1 Distribuição do colágeno fibrilar na parede ventricular	13
2.2.2 Sistema elástico	21
2.2.2.1 Distribuição das fibras do sistema elástico na parede ventricular ..	29
2.2.3. Degradação da matriz extracelular	32
2.3. Remodelamento Ventricular na Hipertensão	34
2.3.1. Hipertrofia dos cardiomiócitos	35
2.3.2. Remodelamento da matriz extracelular cardíaca	37
2.4. Modelo Animal (Spontaneously Hypertensive Rat - SHR)	40
3 JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS	42
4 MÉTODOS	43
4.1 Animais	43
4.2 Avaliação Hemodinâmica	44
4.3 Obtenção do Material e Cálculo do Índice de Hipertrofia Cardíaca	46
4.4 Análises em Microscopia de Luz	46
4.4.1 Avaliação volumétrica ventricular	47
4.4.2 Avaliação volumétrica do colágeno fibrilar	49
4.4.3 Avaliação de diâmetro dos cardiomiócitos	50
4.5 Análises em Microscopia Eletrônica	51
4.5.1 Análise qualitativa ultraestrutural	52

4.5.2 Diâmetro das fibrilas de colágeno	53
4.5.3 Avaliação semiquantitativa das fibras do sistema elástico	53
4.5.4 Análise estatística	54
5 RESULTADOS	55
5.1 Índice de Hipertrofia e Massas Corporal, Cardíaca e Ventricular	55
5.2 Medidas Diretas da Pressão Arterial e da Frequência Cardíaca	56
5.3 Dados de Volumes Cardíaco, Ventricular e de Colágeno	57
5.4 Diâmetro dos Cardiomiócitos	60
5.5 Estudos Ultraestruturais	61
5.5.1 Arranjo e distribuição de diâmetro das fibrilas de colágeno	61
5.5.2 Distribuição das fibras do sistema elástico	64
6 DISCUSSÃO	75
7 CONCLUSÕES	94
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

Lista de Figuras

Figura 1. Modelo esquemático ilustrando as três camadas do coração	4
Figura 2. Organização do tecido conjuntivo no miocárdio.	6
Figura 3: Estrutura da molécula de colágeno.	10
Figura 4 - Esquema ilustrando as fibras de colágeno onduladas do perimísio	17
Figura 5 - Esquema ilustrando duas células musculares, mostrando “struts”	18
Figura 6 - A: Micrografia eletrônica de varredura do endomísio. B: Esquema ilustrando a trama fibrilar contínua que envolvendo inteiramente miócitos	18
Figura 7 – Conexões entre o citoesqueleto da célula muscular e a matriz extracelular	20
Figura 8 - Micrografias eletrônicas da ultraestrutura das fibras do sistema elástico.	22
Figura 9 – Esquema mostrando as moléculas de elastina unidas por ligações covalentes que mantem a malha macromolecular	23
Figura 10 - Esquema ilustrando a formação de uma fibra elástica	24
Figura 11 - Micrografia eletrônica mostrando uma fibra oxitalânica, constituída por feixes de microfibrilas.	25
Figura 12 Micrografias mostrando em a aparência de uma microfibrila em estado relaxado e sua aparência quando estirada Esquema mostrando um modelo simplificado desdobramento da fibrilina em resposta a forças de tração.....	26
Figura 13 - Esquema gráfico mostrando a organização estrutural de fibras elásticas propriamente ditas no tecido conjuntivo	28
Figura 14 – À esquerda, o desenho ilustra o sítio de dissecção para a cateterização da artéria femoral.	44
Figura 15. Desenho ilustrando o sistema de registro de pressão arterial e frequência cardíaca	45
Figura 16- Representação esquemática das fatias transversais do coração e da sobreposição do retículo de pontos para determinação do volume ventricular.	48
Figura 17 – Método de seleção de áreas ocupadas por colágeno.	49
Figura 18 – Fotomicrografia representativa de uma região do miocárdio com a marcação em amarelo para avaliação do diâmetro dos cardiomiócitos.	51

Figura 19. Micrografias eletrônicas do endomísio do miocárdio de rato Wistar (A), e SHR (B).	62
Figura 20 - Micrografia eletrônica do <u>endocárdio de rato Wistar</u>	67
Figura 21 - Micrografia eletrônica do <u>endocárdio de rato SHR</u>	67
Figura 22 - Micrografia eletrônica do <u>epicárdio de rato Wistar-Kyoto</u>	68
Figura 23 – Micrografia eletrônica do <u>epicárdio de rato SHR</u>	68
Figura 24 - Micrografia eletrônica do <u>perimísio do miocárdio de rato Wistar</u>	69
Figura 25 – Micrografia eletrônica do <u>perimísio do miocárdio de rato Wistar</u>	69
Figura 26 - Micrografia eletrônica do <u>perimísio do miocárdio de rato SHR</u>	70
Figura 27 – Micrografia eletrônica do <u>perimísio do miocárdio de rato SHR</u>	70
Figura 28 - Micrografia eletrônica do <u>endomísio do miocárdio de rato Wistar</u>	71
Figura 29 – Micrografia eletrônica do <u>endomísio do miocárdio de rato Wistar</u>	71
Figura 30 – Micrografia eletrônica do <u>endomísio do miocárdio de rato Wistar-Kyoto</u>	72
Figura 31 – Micrografia eletrônica do <u>endomísio do miocárdio de rato Wistar-Kyoto</u>	72
Figura 32 – Micrografia eletrônica do <u>endomísio do miocárdio de rato SHR</u>	73
Figura 33 – Micrografia eletrônica do <u>endomísio do miocárdio de rato SHR</u>	73
Figura 34 – Micrografia eletrônica do <u>endomísio do miocárdio de rato SHR</u>	74
Figura 35 – Micrografia eletrônica do <u>endomísio do miocárdio de rato SHR</u>	74

Lista de Tabelas

Tabela 1. Massa corporal, massa cardíaca, índice de hipertrofia cardíaca e massa ventricular dos ratos Wistar (WIS), Wistar Kyoto (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR).	55
Tabela 2. Pressão arterial diastólica, pressão arterial sistólica, pressão arterial média e frequência cardíaca de ratos Wistar (WIS), Wistar Kyoto (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR).	56
Tabela 3. Parâmetros volumétricos do coração, dos ventrículos e do colágeno ventricular em ratos Wistar (WIS), Wistar-Kyoto (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR).	57
Tabela 4. Diâmetro do cardiomiócito do ventrículo esquerdo em ratos Wistar (WIS), Wistar-Kyoto (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR).	60
Tabela 5. Diâmetro de fibrilas de colágeno do endomísio do ventrículo esquerdo em de ratos Wistar, Wistar-Kyoto e SHR.	62
Tabela 6. Distribuição diferencial das fibras do sistema elástico no ventrículo esquerdo de ratos Wistar (WIS), Wistar-Kyoto (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR).	65

Lista de Gráficos

Gráfico 1. Índice de hipertrofia cardíaca de ratos Wistar, Wistar-Kyoto e SHR.	56
Gráfico 2. Volume do coração de ratos Wistar, Wistar-Kyoto e SHR.....	58
Gráfico 3. Volume do ventrículo esquerdo de ratos Wistar, Wistar-Kyoto e SHR.	58
Gráfico 4. Fração de volume ocupada por colágeno fibrilar no ventrículo esquerdo de ratos Wistar, Wistar-Kyoto e SHR.	59
Gráfico 5. Volume absoluto de colágeno fibrilar no ventrículo esquerdo de ratos Wistar, Wistar-Kyoto e SHR.....	59
Gráfico 6. Diâmetro de cardiomiócitos de ventrículo esquerdo de ratos Wistar, Wistar-Kyoto e SHR.....	60
Gráfico 7. Distribuição de frequência, em porcentagem de fibrilas de colágeno do endomísio do ventrículo esquerdo de ratos Wistar, Wistar-Kyoto e SHR segundo classes de diâmetro.....	63

Resumo

Galhardo MS. *Distribuição diferencial e remodelamento dos elementos fibrilares da matriz extracelular no coração de ratos espontaneamente hipertensos* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

A linhagem de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) tem sido utilizada para como modelo animal para hipertensão humana, uma vez que estes animais desenvolvem pressóricos aumentados, hipertrofia ventricular esquerda, aumento de colágeno intersticial e disfunção diastólica. Embora o excesso de colágeno fibrilar tenha sido bem estudado neste modelo e esteja envolvido na insuficiência cardíaca observada, não há estudos quantitativos acurados (baseados na estereologia) para avaliar precisamente o volume tecidual ocupado pelo colágeno fibrilar e o remodelamento das fibrilas de colágeno segundo seu diâmetro uma vez que variações no diâmetro das fibrilas têm grande impacto funcional. Mais ainda, nunca foi estudado neste modelo o remodelamento das fibras do sistema elástico (oxitalânicas, elaunínicas e elásticas propriamente ditas), que juntamente com o componente colagênico são responsáveis pelas características biomecânicas do tecido. Assim sendo, os corações de ratos Wistar (WIS), Wistar Kyoto (WKY) e SHR foram submetidos a análise hemodinâmicas e foram processados para microscopia de luz e eletrônica, segundo amostragem estereológica. Cortes corados com HE foram utilizados para avaliação do diâmetro dos cardiomiócitos e do volume absoluto do coração e do ventrículo esquerdo; cortes corados com Picrossirius-hematoxilina foram utilizados para a avaliação da fração de volume ocupada por colágeno no ventrículo esquerdo e volume absoluto de colágeno; cortes ultra-finos foram utilizados para avaliação do diâmetro das fibrilas de colágeno cortadas transversalmente e para avaliação da distribuição das fibras oxitalânicas, elaunínicas e elásticas. Os resultados mostram que a hipertrofia ventricular dos animais SHR deveu-se à hipertrofia dos cardiomiócitos associada à maior quantidade de colágeno fibrilar (3,8 x maior no SHR que no WIS). A análise ultraestrutural mostrou que as fibrilas de colágeno no endomísio variam, em nanômetros, de 31 a 53 nos animais WIS, de 36 a 67 nos WKY e de 31 a 85 nos SHR, com medianas respectivamente de 39,58, 48,38 e 54,39, sendo que do ponto de vista estatístico a distribuição dos diâmetros das fibrilas colágenas dos animais SHR é diferente das outras duas linhagens. A análise ultra-estrutural das fibras do sistema elástico mostrou que as fibras oxitalânicas, elaunínicas e elásticas apresentam uma distribuição diferencial nos diversos compartimentos da parede cardíaca dos animais, sendo que nas três linhagens há fibras elásticas propriamente ditas no endocárdio e epicárdio; no entanto, no perimísio as fibras elásticas e elaunínicas aparecem raramente nos ratos SHR e com maior frequência nos WIS e WKY; no endomísio dos ratos SHR não foi possível observar a mesma riqueza de fibras elásticas e elaunínicas presentes nas outras linhagens, havendo assim um predomínio de fibras oxitalânicas no

endomísio dos animais SHR. Os resultados mostram que, além das modificações quantitativas no conteúdo de colágeno no miocárdio do ventrículo esquerdo dos animais SHR, há também uma alteração qualitativa na população de fibrilas colagênicas que passa a ser constituída por fibrilas mais grossas. Mais ainda, os resultados mostram que, em relação às fibras do sistema elástico, a predominância de fibras oxitalânicas no endomísio dos animais SHR sugere que as forças de tensão maiores no coração destes animais modulem não somente o sistema colagênico mas também o sistema elástico no sentido de acumular fibras que suportam melhor as cargas, contribuindo para a perda da complacência da parede ventricular.

Descritores: Coração, Hipertensão, Colágeno Fibrilar, Fibras Elásticas, Rato Espontaneamente Hipertenso, Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Abstract

Galhardo MS. *Differential distribution and remodelling of fibrillar elements of the extracellular matrix in the heart of spontaneously hypertensive rat* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2012.

The strain of spontaneously hypertensive rats (SHR) has been used as an animal model for human hypertension, since these animals develop increased blood pressure, left ventricular hypertrophy, increased interstitial collagen and diastolic dysfunction. Although excess fibrillar collagen has been well studied in this model and is involved in observed heart failure, there are no accurate quantitative studies (i.e., based on stereology) to precisely assess the volume of tissue occupied by fibrillar collagen neither the remodeling of collagen fibrils with respect to their diameters, and such studies are very important because variations in the diameter of the fibrils have a major functional impact.

Moreover, the remodeling of elastic system fibers (oxytalan, elauninic and elastic proper), which together with the collagenous component are responsible for biomechanical features of the tissue, has never been studied in this model. Thus, the hearts of Wistar (WIS), Wistar Kyoto (WKY) and SHR rats went through hemodynamic analysis and were processed for light and electron microscopy, according to stereological sampling criteria. HE-stained sections were used to evaluate the diameter of the cardiomyocytes and the absolute volume of the heart while left ventricular sections stained by Picrosirius-hematoxylin were used to evaluate the volume fraction occupied by collagen in the left ventricle as well as its absolute volume of collagen; ultra-thin sections were used for evaluation of the diameter of transversally sectioned collagen fibrils and for evaluation of the distribution of oxytalan, elauninic and elastic proper fibers.

The results show that the ventricular hypertrophy of SHR rats was due to cardiomyocyte hypertrophy associated with a higher amount of fibrillar collagen (3.8 times as high than in the WIS rats). The ultrastructural analysis showed that the collagen fibrils in the endomysium range in nanometers, from 31 to 53 in WIS animals, 36 to 67 in the WKY and 31 to 85 in SHR, with medians 39.58, 48.38 and 54.39, respectively. The distribution of diameters of collagen fibrils is statistically different in SHR animals when compared to the other two strains. The ultrastructural analysis of the fibers of the elastic system showed that oxytalan, elauninic and elastic fibers present a differential distribution across the various compartments of the heart wall of the animals. In the three strains there are elastic fibers in the endocardium and epicardium, while in the perimysium, the elastic fibers proper and the elauninic fibers rarely appear in SHR rats, being more frequent in WIS and WKY rats; the endomysium of SHR rats did not exhibit the same richness of elastic fibers proper and elauninic fibers present in other strains, occurring thus a predominance of oxytalan fibers in the endomysium of SHR rats.

The results also show that, in addition to the quantitative changes in collagen content of left ventricular myocardium of SHR rats, there is a qualitative alteration in the population of collagen fibrils that is richer in thicker fibrils. Moreover, the results show that, with respect to the fibers of the elastic system, the predominance of the oxytalan fibers in the endomysium of SHR rats suggests that the higher tensile forces in the hearts of these animals modulate not only the collagenous system but also the elastic system, entailing accumulation of fibers suited to better support the loads, contributing to the loss of ventricular wall compliance.

Descriptors: Heart, Hypertension, Fibrillar Collagen, Elastic Fiber, Spontaneously Hypertensive Rat, Transmission Electron Microscopy.

1 INTRODUÇÃO

A pressão arterial é o fenótipo final resultante da integração entre as influências ambientais e a expressão de vários genes. A manutenção bem como a variação momento a momento da pressão arterial dependem de mecanismos redundantes que determinam ajustes da frequência e da contratilidade cardíacas, do estado contrátil dos vasos de resistência e de capacitância e da distribuição de fluido dentro e fora dos vasos. Os principais fatores envolvidos no controle da pressão arterial são o estresse oxidativo, o sistema renina-angiotensina, a hiperatividade simpática dos barorreceptores e quimiorreceptores, fatores secretados pelo endotélio e mecanismos renais (Kaplan, 1998). Considera-se hipertensa a pessoa que, medindo a pressão arterial em repouso, apresenta valores iguais ou acima de 14 por 9 (140mmHg X 90mmHg).

A hipertensão arterial é uma doença crônico-degenerativa de caráter multigênico e multifatorial que pode levar a lesões em outros órgãos além do coração como olhos, cérebro, rins e vasos sanguíneos (Brown, 1996).

A hipertensão é o principal fator de risco para o infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca e acidentes vasculares. De acordo com o relatório anual de 2012 da Organização Mundial da Saúde (OMS), 1/3 da população mundial é hipertensa.

Dados do ministério da Saúde divulgados em abril do mesmo ano mostram que a doença atinge 22,7% da população adulta brasileira,

chegando a 59,7% na população acima de 65 anos e 5,4% nos jovens entre 18 e 24 anos.

A hipertensão, o diabetes e a obesidade são enfermidades tão comuns que é difícil não conhecer alguém que sofra de pelo menos uma delas. Por serem tão comuns, muitas vezes se perde a dimensão de sua gravidade, mas essas três doenças são as maiores causas dos problemas cardiovasculares e a principal causa de mortes em todo o mundo, sendo responsáveis pela metade das mortes por acidente vascular cerebral e por 45% dos infartos do miocárdio.

Sabe-se que a hipertensão arterial sistêmica leva à hipertrofia ventricular esquerda como resposta adaptativa miocárdica que, a curto prazo, reduz o estresse da parede ventricular, permitindo que o mesmo mantenha sua capacidade mecânica (Badeer, 1964). A hipertrofia, em parte, deve-se à hipertrofia dos cardiomiócitos e, em parte, ao remodelamento da matriz extracelular.

A matriz extracelular cardíaca é formada por uma trama glicoproteica que envolve e se relaciona com as células constitutivas do coração. Os principais componentes da matriz são: colágeno tipo I e tipo III, elastina, fibrilina, proteínas adesivas e proteoglicanos. A eficiência mecânica do miocárdio depende das propriedades contráteis dos cardiomiócitos associados a essa matriz extracelular que possui características próprias de resistência mecânica e resiliência (Wilson e Spinale, 2001).

É bem documentado o remodelamento dos diferentes tipos de fibras de colágeno e das proteínas adesivas da matriz extracelular na parede

cardíaca frente a um quadro de hipertensão, porém não foi possível encontrar publicações sobre o remodelamento das fibras do sistema elástico na hipertensão. Mais ainda, não há registros na literatura da utilização de métodos estereológicos para quantificação de colágeno no coração de ratos hipertensos (SHR).

Este trabalho tem como proposta preencher, ainda que parcialmente, esta lacuna do conhecimento científico, utilizando medidas quantitativas baseadas na estereologia e identificação por microscopia eletrônica para estudar a distribuição dos elementos fibrilares da matriz extracelular cardíaca comparando-se animais SHR e os Wistar-Kyoto (WKY) normotensos (linhagem que originou a linhagem SHR). No entanto, os ratos Wistar-Kyoto são geneticamente heterogêneos (Kurtz et al., 1989, St Lezin et al., 1992) e por isso, a linhagem Wistar (WIS) normotensa também foi utilizada como controle.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Compartimentos da Parede Cardíaca

Para compreensão das alterações decorrentes da hipertensão no coração, vale recordar histologicamente, as camadas (túnicas) que compõem sua parede: endocárdio, miocárdio e epicárdio (Figura 1).

Figura 1. Modelo esquemático ilustrando as três camadas histológicas do coração (endocárdio, miocárdio e pericárdio visceral, também denominado epicárdio) e o pericárdio parietal.

2.1.1 Pericárdio

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

- Pericárdio parietal ou fibroso formado por tecido conjuntivo denso, rico em fibras colágenas e elásticas, revestido por epitélio simples

pavimentoso (mesotélio), constituindo uma membrana muito estudada por seu emprego nas biopróteses do sistema cardiovascular.

- Pericárdio visceral ou seroso, denominado epicárdio, constituído por mesotélio que reveste a superfície externa do coração em associação a uma camada de tecido conjuntivo fibroso que se continua com o conjuntivo do miocárdio.

O pericárdio visceral e parietal delimitam a cavidade pericárdica humana, que contém cerca de 50 ml de líquido pericárdico, secretado pelas células mesoteliais, como um filtrado do plasma.

Um estudo demonstrou a capacidade das células epiteliais do epicárdio de 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).

2.1.2 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 com o conjuntivo das válvulas cardíacas e das cordas tendíneas: epimísio, perimísio e endomísio. O epimísio se localiza internamente ao epicárdio e também ao endocárdio, sendo dificilmente distinguido como uma camada propriamente dita, uma vez que se confunde com o tecido conjuntivo do endocárdio e miocárdio. Por sua

vez, o perímísio corresponde a grandes trabéculas de tecido conjuntivo que envolvem grupos de cardiomiócitos, delimitando feixes de fibras musculares, se continuando com o epimísio e com o endomísio que, caracteristicamente, envolve cada cardiomiócito e os conecta entre si (Burlew e Weber, 2000). A organização do tecido conjuntivo no miocárdio está ilustrada na Figura 2.

Figura 2. Organização do tecido conjuntivo no miocárdio. Cada cardiomiócito (**M**) está envolvido pelo delicado endomísio (**E, em rosa**); por sua vez, a denominação perímísio (**P, em azul**) se refere ao tecido conjuntivo que envolve grupos de miócitos; já o termo epimísio (**EP, em amarelo**) corresponde ao revestimento conjuntivo fibroso que se continua como epicárdio e com o endocárdio (adaptado de Souza, 2002).

2.1.3 Endocárdio

O endocárdio corresponde ao revestimento interno das cavidades cardíacas. Pode ser dividido em três estratos:

- endotélio, que é o epitélio simples pavimentoso com propriedades especiais sintéticas e mecânicas, em contato direto com as cavidades atriais e ventriculares;
- conjuntivo sub-endotelial, que é constituído por tecido conjuntivo frouxo com finas fibras de colágeno e fibras elásticas;
- sub-endocárdio, uma camada denominada de tecido conjuntivo que se confunde com o epimísio do miocárdio. Trata-se de um tecido conjuntivo rico em células adiposas, vasos, nervos e células musculares lisas. No sub-endocárdio das paredes ventriculares estão presentes as fibras de Purkinje (células musculares especiais com função na transmissão de impulso elétrico).

2.2 Elementos Fibrilares da Matriz Extracelular

Os tecidos conjuntivos são estruturas biológicas complexas, constituídas por células e uma rica matriz extracelular formada por uma variedade de componentes químicos que confere a característica funcional do tecido. As células podem ser “nativas” (como fibroblastos, condrócitos, osteócitos) ou relacionadas às atividades inflamatória e imunológica (como leucócitos, macrófagos, mastócitos). Os principais componentes da matriz extracelular são moléculas de 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. A matriz extracelular não só promove a organização adequada e a integridade dos tecidos, mas também facilita suas funções básicas e modula a resposta frente a estímulos patológicos.

O tecido conjuntivo também participa ativamente nos processos de reparo e fibrose, nos quais 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 de determinado órgão, permitindo a manutenção da homeostase, a diferenciação em cada estágio do desenvolvimento e adaptações frente a novos estímulos (Montes, 1996).

No caso do coração, a eficiência mecânica do miocárdio depende das propriedades contráteis dos cardiomiócitos envolvidos por uma matriz extracelular que possui características próprias de resistência mecânica e resiliência (Wilson e Spinale, 2001).

Os principais componentes da matriz extracelular cardíaca são: 1) proteínas estruturais, como colágeno tipo I e tipo III (predominantes), elastina, fibrilina; 2) proteínas adesivas como colágeno IV e VI, laminina, fibronectina; 3) proteoglicanos.

A habilidade de sintetizar os componentes da matriz extracelular difere entre as células do coração: cardiomiócitos e células endoteliais produzem colágenos tipos IV e VI, laminina e perlecan, enquanto fibroblastos produzem colágenos tipos I e III, fibronectina, proteoglicanos, metaloproteinases e seus inibidores (Corda et al., 2000; Janicki e Brower, 2002). Os fibroblastos, responsáveis pela síntese e manutenção da matriz extracelular, são as células mais prevalentes do coração, enquanto que os cardiomiócitos (que são as células mais importantes do ponto de vista funcional) representam apenas um terço do número total das células.

2.2.1 Sistema colagênico

Os colágenos são uma família de proteínas fibrosas bem características, encontradas em todos os organismos multicelulares. São as proteínas mais abundantes nos mamíferos, constituindo cerca de 25% de sua massa protéica total. A principal característica de uma molécula de colágeno típica é a estrutura longa e rígida de sua fita tripla helicoidal, na qual três cadeias polipeptídicas de colágeno, chamadas cadeias α , são enroladas umas nas outras formando um tipo de corda supertorcida (Figura 3).

Figura 3: Estrutura da molécula de colágeno. (A) Modelo de uma cadeia α no qual cada aminoácido é representado por uma esfera. Cada cadeia α é composta por uma série de seqüências Glicina-X-Y, na qual X e Y podem ser qualquer aminoácido. (B) Um modelo de uma molécula de colágeno formada por três cadeias α , cada uma mostrada em cor diferente, arranjadas em forma de tripla hélice (Alberts et al., 2002).

Existem vários tipos de colágeno, cada um definido por suas cadeias α_1 e α_2 específicas. Já foram descritos 28 diferentes tipos de colágenos (Kroshnoodi et al., 2008).

As moléculas de colágeno se associam no espaço extracelular e, dependendo de sua composição e formato, podem formar fibrilas, redes ou mesmo se associar a fibras colágenas. Existem, portanto, colágenos fibrilares (isto é, que formam fibrilas e fibras, como por exemplo os colágenos tipo I, II, III) e não fibrilares (como o colágeno tipo IV, que é um dos principais componentes das lâminas basais).

Os principais tipos de colágeno encontrados nos tecidos conjuntivos são os tipos I, II, III, IV, V, VI e VII.

O colágeno tipo I, o mais comum entre os colágenos, forma fibrilas grossas (com diâmetro médio de 75nm) que se associam formando fibras grossas de 2 a 10 μm , conhecidas como “fibras colágenas” na histologia clássica. Estão presentes no tecido conjuntivo propriamente dito, no osso, dentina, cemento, tendão, ligamentos, fâscias, epimísio, epineuro constituindo cerca de 90% do colágeno do organismo, tendo como principal função, a resistência à tensão (Parry e Craig, 1988). É interessante observar que as fibrilas de colágeno tipo I são, na realidade, fibrilas heterotípicas, constituídas também por fibrilas de colágeno tipo V que tem importante função na determinação do diâmetro final da fibrila (Birk et al., 1990). A deficiência de colágeno tipo V leva ao aparecimento de fibras colágenas de aspecto semelhante àsquelas encontradas nos pacientes com Ehlers-Danlos (Wenstrup et al., 2006).

O tipo colágeno tipo II permanece sob forma de fibrilas nos tecidos, sendo encontrado quase que exclusivamente na matriz extracelular das cartilagens hialina e elástica e na membrana tectória do órgão de Corti,. A sua principal função é a resistência às forças compressivas, uma vez que se associa a grandes quantidades de proteoglicanos na matriz extracelular (Thalmann, 1993). Assim como mencionado para o colágeno tipo I, as fibrilas de colágeno tipo II também são heterotípicas, cabendo às fibrilas de colágeno tipo XI o papel de regulador do diâmetro fibrilar final (Kadler et al., 2007).

Já o colágeno tipo III forma fibrilas finas (com diâmetro médio de 45nm) que se associam formando fibras finas de 0,5 a 2,0 μm diâmetro, encontradas na derme papilar, baço, fígado, pulmão, linfonodos, endomísio, endoneuro etc., constituindo o estroma de outros órgãos parenquimatosos. Correspondem às clássicas fibras reticulares referidas na histologia clássica e sua função é formar uma rede de sustentação delicada para as células estromais (Montes, 1996; Alberts et al., 2002).

Uma vez que os colágenos tipo I e tipo III diferem no diâmetro das fibras, no alinhamento espacial e no grau de entrelaçamento, consequentemente, o tecido que contiver mais fibras de colágeno do tipo I (fibras maior diâmetro formadas por fibrilas mais grossas) será mais resistente à tração do que o tecido com maior concentração de fibras do tipo III (fibras de menor diâmetro formadas por fibrilas finas) (Montes, 1996).

Diferentemente dos outros tipos, o colágeno tipo IV aparece somente nas lâminas basais de todos os tecidos; suas moléculas se associam formando um rede que interage com outros componentes da matriz nesta localização como a laminina e perlecan. Assim, através desta complexa interação molecular, estes componentes formam lâminas basais altamente específicas para cada tecido que estão diretamente envolvidas em processos biológicos como adesão, migração e desenvolvimento celular, regeneração e cicatrização de tecidos, além de servir como um local de reserva de fatores de crescimento e enzimas (Kroshnoodi et al., 2008).

As fibrilas de colágeno tipo VI formam feixes que estão presentes em basicamente todos os tecidos conjuntivos em associação às lâminas basais.

Há evidências que o colágeno tipo VI desempenhe uma função de ancoragem da lâmina basal, devido à sua forte interação com o colágeno tipo IV; além disso, o colágeno tipo VI interage também diretamente com fibrilas de colágeno tipo I e tipo III (Knupp et al., 2006).

As fibrilas de colágeno tipo VII são os principais constituintes das fibrilas de ancoragem, com 750 nm de comprimento e estriação típica, classicamente descritas na interface entre lâmina basal e o tecido conjuntivo na pele, na mucosa oral, na mucosa do trato respiratório e reprodutivo. Sua função é realizar a ancoragem entre a lâmina basal e fibras colagênicas do tecido conjuntivo subjacente. Esta afirmação se confirma pela observação que a deficiência de fibrilas de ancoragem leva a um padrão fenotípico de epidermólise bolhosa, com a presença de bolhas cutâneas devido à separação da derme ao longo da lâmina basal (Sakai et al., 1989).

2.2.1.1 Distribuição do colágeno fibrilar na parede ventricular

No ventrículo esquerdo adulto normal, 1,8% do miocárdio é composto de colágeno (Weber, 1989). Estudos de hibridização *in situ* mostraram o colágeno tipo I e tipo III são sintetizados pelos fibroblastos intersticiais e não pelos cardiomiócitos (Eghabali et al., 1989).

Pequenas alterações em sua concentração e/ou nas proporções relativas dos tipos de colágeno exercem importantes efeitos nas propriedades mecânicas ativas e passivas do coração; por exemplo, na

hipertrofia ventricular, a concentração de colágeno no ventrículo esquerdo humano passa de 1,8% para 2,6% (Shirwany e Weber, 2006).

No coração humano adulto foram identificados cinco tipos de colágenos: I, III, IV, V e VI (Speiser et al., 1991).

O colágeno tipo I é responsável pela estruturação do interstício e do espaço perivascular. As modificações da arquitetura cardíaca presentes na hipertrofia ventricular estão relacionadas com concentrações maiores de colágeno tipo I.

O endomísio é rico em colágeno tipo III constituindo as “fibras reticulares” que envolvem os cardiomiócitos acomodando as variações da forma da célula durante o ciclo cardíaco. Estas fibras têm papel importante na capacidade de distensibilidade do coração (Fedak et al., 2005).

No miocárdio de primatas não humanos a distribuição dos tipos de colágeno é: 85% corresponde a colágeno tipo I, 11% é colágeno tipo III e 3% é colágeno tipo V. Os colágenos tipo I e tipo III transmitem forças mecânicas por todo o miocárdio mantendo a estrutura tecidual durante o ciclo cardíaco e as propriedades visco-elásticas do órgão (Weber et al., 1988).

O colágeno tipo IV está presente nas lâminas basais dos cardiomiócitos e das células endoteliais e participa das estruturas de adesão entre células e matriz extracelular.

O colágeno tipo V contribui para a regulação da espessura das fibras de colágeno, enquanto que o colágeno tipo VI, além de ter participação nos processos de remodelamento cardíaco pós-injúria, participa também nos fenômenos de diferenciação dos mioblastos e miofibroblastos no miocárdio,

merecendo atenção nas pesquisas com células tronco para reconstrução miocárdica (Naugle et al., 2006).

Colágeno fibrilar no epicárdio e endocárdio

Embora haja menção às fibras colágenas do epicárdio nos livros didáticos, são raras as publicações sobre o assunto e sua alteração em distúrbios patológicos do coração. Em 2007, em um trabalho com técnicas de microscopia eletrônica de varredura e testes biomecânicos, foi observado que, na região mais superficial e mais profunda do epicárdio, as fibras colágenas (e as elásticas também) se alinham paralelas entre si, enquanto que na região intermediária do epicárdio as fibras colágenas não apresentam uma orientação preferencial (Jöbsis et al., 2007).

O epicárdio participa ativamente na manutenção das forças residuais, pois se esta estrutura for retirada ocorre uma mudança na conformação na estrutura ventricular; além disso, os testes mecânicos mostram que o epicárdio desempenha um papel nas propriedades mecânicas passivas, principalmente durante o enchimento ventricular na fase inicial da diástole. Na pericardite constrictiva, há um acúmulo de colágeno tipo I no epicárdio, formando uma capa fibrótica espessa, às vezes com calcificação, que leva à restrição do enchimento diastólico (Jöbsis et al., 2007).

Por sua vez, no endocárdio as “fibras reticulares”, constituídas por colágeno tipo III, são bastante estudadas principalmente devido às complicações das endocardites e da endomiocardiofibrose, que é uma doença progressiva, de origem desconhecida, que afeta seriamente o

coração, promovendo a substituição do tecido conjuntivo frouxo do endocárdio por um tecido fibrótico (ou fibroelástico) que termina por restringir o volume das câmaras ventriculares.

Colágeno fibrilar no miocárdio

O epimísio, tanto na sua face epicárdica como endocárdica, possui fibras colágenas relativamente mais grossas que o restante do miocárdio, dispostas em uma trama que se alinha ao maior eixo dos miócitos em condições de estiramento. Supõe-se que esta malha colagênica proteja os sarcômeros de um possível estiramento além da força máxima (Robinson et al., 1983; Morita et al., 1991).

No perimísio, as fibras de colágeno tem orientação preferencial localizadas paralelamente ao maior eixo dos miócitos. No tecido em repouso, apresentam um padrão ondulado, o que sugere que essas fibras não são estiradas fortemente durante o enchimento ventricular na diástole (Figura 4). De fato, à medida que a pressão do ventrículo esquerdo aumenta, os sarcômeros se distendem e as fibras colagênicas perimisiais vão perdendo sua ondulação enquanto a parede ventricular se relaxa. No seu retorno à posição ondulada, as fibras colágenas perimisiais colaboram no recolhimento elástico da parede ventricular que se segue à diástole (Mackenna et al., 1996; 1997; Robinson et al., 1983).

Figura 4 - Esquema ilustrando as fibras de colágeno onduladas do perimísio (em verde) dispostas paralelamente aos miócitos (adaptado de Janicki e Brower, 2002).

O endomísio constitui-se pela lâmina basal dos cardiomiócitos e das células endoteliais associadas a uma rede de proteínas fibrilares da matriz extracelular que incluem fibras de colágeno tipo III e fibras do sistema elástico (Junqueira e Carneiro, 2009).

A organização estrutural do colágeno fibrilar do endomísio tem sido estudada principalmente na varredura. Inicialmente, Borg et al. (1982) e Robinson et al. (1987) propuseram a existência de “*struts*”, que correspondiam a fibras de colágeno fibrilar (que em conjunto medem de 120 a 150 nm de diâmetro), conectando as lâminas basais de cardiomiócitos vizinhos e de capilares entre si, além de um complexo de fibras de colágeno isoladas ao redor da célula (Figura 5).

Figura 5 - Esquema ilustrando duas células musculares (**M**), mostrando “struts” (**S**), inseridos na periferia da célula, ao nível da linha Z, e a trama colagênica ao redor da célula, como proposto por Robinson et al., 1987.

A partir de estudos em microscopia de varredura, o grupo do Prof. Pietro Motta da “La Sapienza Università di Roma” publicou, em 2001, uma proposta para organização estrutural do endomísio na qual uma trama de fibras de colágeno tridimensional contínua que envolveria os miócitos e capilares (Figura 6).

Figura 6 - **A**: Micrografia eletrônica de varredura do endomísio. Os miócitos foram retirados quimicamente e pode-se observar a rede colagênica endomisial; **ml**: lacuna deixada pelo miócito; **cl**: lacuna deixada pelo capilar. Barra: 10 µm. **B**: Esquema ilustrando a trama fibrilar contínua que envolve inteiramente miócitos (**M**) e capilares (**C**). Reproduzido de Macchiarelli et al. (2002).

Este modelo atual, em contraposição à idéia anterior que a conexão entre células vizinhas se daria apenas através dos “struts” é o mais aceito atualmente, sendo compatível com as observações em microscopia de luz. Por este modelo, a conexão dos cardiomiócitos entre si pode ser responsável 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 de um modo sincronizado. Além disso, a conexão entre cardiomiócitos e capilares pode ser responsável pela manutenção da patência do capilar durante a sístole. Desta forma, a própria rede fibrilar em si poderia ser responsável por muitas das propriedades viscoelásticas do coração, prevenindo que os miócitos sejam excessivamente estirados e lesionados (Macchiarelli et al., 2002).

Os cardiomiócitos interagem diretamente com esta trama colagênica (formada principalmente por colágenos tipos I, III e VI) através de receptores transmembrana (integrinas) que se associam a elementos de adesão célula-matriz como a laminina, o perlecan e entactina.

Quando ativadas, as integrinas agrupam-se a proteínas do citoesqueleto associadas à membrana plasmática, tais como vinculina, talina, paxilina, e enzimas sinalizadoras formando placas de adesão focal. Esta é a base molecular através da qual a matriz extracelular controla o comportamento celular (Hsueh et al., 1998; Chan et al., 1999).

Alguns autores tem desenvolvido o conceito de que a transmissão da força contrátil do 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 intramuscular. Há dados bioquímicos, que demonstram que a rede de proteínas na região de membrana celular pode transmitir forças desde os elementos contráteis em direção do tecido conjuntivo do endomísio (Maasa et al., 2001). Pelo menos dois complexos protéicos, um contendo vinculina e outro contendo distrofina, tem potencial para transmitir força desde os filamentos de actina até os componentes do endomísio (Monti et al., 1999).

A Figura 7 ilustra a interação célula-matriz no músculo cardíaco.

Figura 7 – Conexões entre o citoesqueleto da célula muscular e a matriz extracelular. A actina recebe os estímulos mecânicos da matriz através das integrinas, como ocorre com outras células. O complexo distroglican-sarcoglican-distrofina é uma ligação a mais. A porção COOH se associa a sarcoglicana, distroglicana, distrobrevina, sincolinina, óxido nítrico sintase e sintrofina. A porção NH₂ se liga a actina, vinculina e integrina. Estes dois sistemas fornecem uma estrutura que mantém a integridade do sarcolema e conecta elementos da matriz extracelular às proteínas do citoesqueleto (Firestein et al., 2008).

Estes complexos são responsáveis pela mecanotransdução das modificações do ambiente extracelular para as células, através de vias de

sinalização que incluem fosforilação da tirosina de proteínas como paxilina, ativação de quinases do complexo de adesão focal, como FAK, Pyk2, Src, serino-e-treonina-quinase, proteino-quinase C (CPK), e outras. A possibilidade do envolvimento destas vias de sinalização no remodelamento da matriz extracelular cardíaca simultâneo à hipertrofia cardíaca se reforça frente a vários achados “in vitro”: 1) a ativação da integrina induz a formação de placas de adesão; 2) a sinalização das integrinas se contrapõe ou tem ação sinérgica a fatores de crescimento e à angiotensina II; 3) as vias de sinalização podem ser responsivas às forças mecânicas (Jane-Lise, 2000).

2.2.2 Sistema elástico

As fibras elásticas são particularmente abundantes nos pulmões, pele e vasos sanguíneos de grande calibre sendo responsáveis pela extensibilidade e resiliência dos tecidos. Nos últimos anos, com o aumento dos estudos sobre as fibras elásticas, apareceram evidências que estas modulam a sinalização, a adesão e proliferação celular (Dietz e Mecham, 2000; Brooke et al., 2003), além de suas funções biomecânicas.

O sistema elástico compreende fibras elásticas, elaunínicas e oxitalânicas (Ross e Bornstein, 1969; Montes, 1996; Arribas et al., 2006). Do ponto de vista ultraestrutural, 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, compostas principalmente por fibrilina. Durante o desenvolvimento de uma fibra elástica,

o 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, mesmo em tecidos estáveis de indivíduos adultos, é possível observar somente feixes de microfibrilas sem a elastina (tais estruturas são conhecidas como fibras oxitalânicas) ou ainda feixes de microfibrilas contendo grumos esparsos de elastina (conhecidos como fibras elaunínicas). Estas observações mostram que nem todos os feixes de microfibrilas estão destinados a servir como “guias” para a deposição de elastina, podendo ser entidades microfibrilares independentes no tecido conjuntivo.

Assim sendo, os feixes de microfibrilas estão presentes nos três tipos de fibras do sistema com quantidades crescentes de elastina associada, de acordo com a sequência: oxitalânica, elaunínica e elástica (Figura 8).

Figura 8 - Micrografias eletrônicas da ultraestrutura das fibras do sistema elástico. Nas fibras elaunínica e elástica a elastina aparece depositada entre as microfibrilas como uma massa amorfa (em negro) enquanto que as fibras oxitalânicas são desprovidas de elastina (Montes, 1996).

É importante diferenciar “elastina” e “fibras elásticas”. A elastina é a proteína predominante em uma fibra elástica madura, sendo responsável por sua propriedade mecânica característica de resiliência (Figura 9).

Figura 9 – Esquema mostrando as moléculas de elastina unidas por ligações covalentes que mantêm a malha macromolecular; cada molécula pode se expandir e retornar ao seu formato original, de modo a esticar e encolher o conjunto como um todo (Junqueira e Carneiro, 2009).

A elastina é uma proteína quimicamente inerte, hidrofóbica e estável em condições fisiológicas e, em condições normais, permanece no tecido por todo o tempo de vida do organismo (Shapiro et al., 1991).

Ross et al. (1977) apontaram para o fato de que os três diferentes tipos de fibras do sistema elástico pertencem a uma série contínua de desenvolvimento sendo que as oxitalânicas são as primeiras a surgirem, seguidas pelas fibras elaunínicas e, finalmente, elásticas (Figura 10).

Observações em mamíferos sugerem que as fibras oxitalânicas e elaunínicas são precursoras das fibras elásticas do ponto de vista ontogenético e filogenético (Bradamante e Svajger, 1977; Sage e Gray, 1979).

Figura 10 - 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.

O fato de que os feixes de microfibrilas assumem a forma e a orientação das supostas fibras elásticas levou Ross et al. (1977) a sugerirem que as microfibrilas conseguem alinhar as moléculas de tropoelastina de uma maneira precisa, de modo a justapor os locais das ligações cruzadas destas moléculas, antes que eles possam ser oxidados pela lisil-oxidase, levando assim à polimerização correta da elastina.

As microfibrilas das fibras oxitalânicas e as microfibrilas que circundam as fibras elásticas e elaunínicas têm a mesma constituição química (Streeten e Licari, 1983); sendo todas constituídas principalmente pela proteína fibrilina, uma grande glicoproteína de 350 kDa (Sakai et al., 1986). Em 1991, outra isoforma, denominada fibrilina-2, foi descrita por Lee e colaboradores. O papel estrutural destas proteínas foi reforçado com a descoberta de 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 (Sherratt et al., 2001).

As microfibrilas têm uma organização supramolecular bastante complexa e, além das fibrilinas, estão presentes na sua constituição várias moléculas, tais como: 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, sequestrando-o na matriz extracelular para ser liberado quando necessário (Gibson et al., 1998). 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 56nm, 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 (Figura 11).

Figura 11 - 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 (reproduzido de Montes, 1996).

Estudos voltados para a organização supramolecular das microfibrilas levaram à suposição de que estas possuiriam uma capacidade de “recolhimento elástico”, mesmo sem conter elastina. Esta ideia está baseada em estudos biomecânicos que mostram que a periodicidade axial normal de 56nm entre as “contas” da microfibrila relaxada pode chegar até 165nm, quando o tecido é submetido à tração e retornar aos padrões de relaxamento quando a força cessa (Kielty et al., 2002; 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 (Figura 12).

Figura 12 - À esquerda: micrografias mostrando em a aparência de uma microfibrila em estado relaxado (1) e sua aparência quando estirada (2) (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 ultraestrutural 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).

Distribuição diferencial das fibras do sistema elástico nos tecidos

As fibras do sistema elástico não estão distribuídas homogeneamente nos tecidos, sendo que em compartimentos distintos dos vários órgãos sua presença difere tanto quantitativamente quanto qualitativamente.

Uma vez que é a elastina que confere elasticidade, as fibras elásticas propriamente ditas (por apresentarem maior quantidade relativa de elastina) têm as propriedades elastoméricas mais evidentes enquanto que as fibras oxitalânicas (que são consideradas muito pouco elásticas) são mais resistentes à tensão, impedindo o estiramento das microregiões onde elas ocorrem. Já as fibras elaunínicas teriam um grau intermediário de elasticidade (Cotta-Pereira et al.,1984). A existência de uma distribuição diferencial destes três tipos de fibras nos tecidos é sugestiva de que o grau de elasticidade de cada uma confere versatilidade ao sistema.

Assim, as fibras elásticas propriamente ditas aparecem como um dos principais componentes dos tecidos conjuntivos que possuem propriedades elastoméricas como alvéolos pulmonares, ligamentos elásticos, derme, cartilagem elástica e parede de artérias. Nos diferentes tecidos, as fibras elásticas podem se apresentar sob três aspectos distintos: como fibras alongadas com comprimento variável na derme e alvéolos pulmonares; em arranjo tridimensional em favo de mel na cartilagem elástica, e como lâminas elásticas nas artérias de grande calibre. Essas estruturas complexas e distintas parecem surgir em consequência da intensidade e da direção das forças aplicadas aos tecidos (Mecham e Heuser, 1990) (Figura 13).

Figura 13 - Esquema gráfico mostrando a organização estrutural de fibras elásticas propriamente ditas no tecido conjuntivo. (A) fibras alongadas; (B) fibras elásticas em favo de mel; (C) lâminas elásticas (adaptado de Ushiki, 2002).

Por sua vez, as fibras elastínicas são encontradas na interface da derme reticular com a papilar (Cotta-Pereira et al., 1976), na camada condrogênica das cartilagens hialinas (Cotta-Pereira et al., 1984), no epineuro (Ferreira et al., 1987), na camada subepitelial da traquéia e do brônquio em humanos (Bock e Stochinger, 1984) e na região intermediária do anel anular da articulação entre o estribo e a janela oval (Souza et al., 1991).

Já as fibras oxitalânicas são encontradas onde o tecido conjuntivo está sujeito a forças de tensão mecânica tais como: 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 traqueia e brônquios humanos (Bock e Stochinger, 1994), 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 (Bock, 1978).

A presença das fibras oxitalânicas na zônula ciliar, no periodonto e na junção dermo-epidérmica foi interpretada como uma evidência de que esses

feixes de microfibrilas podem desempenhar um papel estrutural de ancoragem, ligando o cristalino ao corpo ciliar do olho, conectando o osso ao cimento do dente no ligamento periodontal e ligando a derme à epiderme, respectivamente. O componente microfibrilar pode ter a função similar nas próprias fibras elásticas, ancorando a elastina à matriz circundante (Gibson e Cleary, 1987). Esta função de ancoragem se confirma, uma vez que duas proteínas associadas às microfibrilas, a MAGP-1 e a MAGP-2, interagem com o colágeno IV das lâminas basais e com as integrinas da membrana celular, respectivamente (Finnis e Gibson, 1997; Gibson et al., 1998).

2.2.2.1 Distribuição das fibras do sistema elástico na parede ventricular

Muito se sabe sobre a resiliência do tecido conjuntivo cardíaco e se reconhece sua função protetora ao atuar como uma mola tênsil durante o trabalho muscular; porém, pouca atenção foi dada até agora à distribuição dos componentes do sistema elástico no coração.

A literatura ressalta o papel fundamental da estrutura supramolecular do espaço intersticial do miocárdio, composta por células não-miocíticas e por uma trama altamente organizada de elementos que mantem a arquitetura e o comportamento mecânico dos cardiomiócitos (Brilla et al., 1992). O maior alvo de atenção tem sido o colágeno miocárdico principalmente porque uma exuberante fibrose acompanha muitas das afecções cardíacas. Portanto, o estudo da distribuição do material elástico, que tem sido negligenciado, pode ser importante para o entendimento das

alterações nas propriedades mecânicas do coração, que compõem o quadro de muitas afecções cardíacas tais como infarto do miocárdio, doença de Chagas e hipertrofia cardíaca hipertensiva.

A existência das fibras elásticas no coração foi relatada pela primeira vez por Perkins e Miller em 1927. A partir de então, os livros didáticos descrevem sua presença no epicárdio, endocárdio e miocárdio dispostas paralelamente às fibras musculares (Junqueira e Carneiro, 2009; Fawcett, 1987). Recentemente, nosso grupo de pesquisa resolveu incluir esse tema na linha de pesquisa Biopatologia da Matriz Extracelular do nosso laboratório, pois não havia estudos na literatura sob a luz dos conhecimentos atuais sobre o sistema elástico.

Battig e Low (1961) realizaram um estudo pioneiro sobre aspectos ultraestruturais do coração e descreveram fibras elásticas e microfibrilas no endomísio, relatando que as microfibrilas que formavam feixes eram semelhantes às aquelas microfibrilas que apareciam nas fibras elásticas.

Em 1973, Fenoglio e Wagner publicaram excelentes micrografias eletrônicas de transmissão nas quais é possível observar fibras oxitalânicas em valva mitral de corações humanos. Os autores se referem a estas estruturas apenas como “acúmulo de material fibrilar”, sem identificar precisamente estes elementos histológicos que já haviam sido caracterizados há mais de 10 anos antes como uma entidade independente do tecido conjuntivo.

Em 1974, Frank e Langer reconheceram, ao microscópio eletrônico, a existência de pequenas fibras elásticas ricas em microfibrilas no coração, porém não fazem qualquer menção ao seu papel funcional.

Na década de 80 e início da década de 90, foi proposto que a complexa rede de colágeno fibrilar (que nesta época estava sendo descrita no miocárdio pela microscopia de varredura) seria o elemento elástico mais importante do coração (Caulfield e Borg, 1979; Borg e Caulfield, 1981; Borg et al, 1982; Robinson et al., 1987; Caulfield e Bittner, 1988), chegando mesmo a se ignorar os perfis de fibras elásticas e oxitalânicas que apareciam nas micrografias eletrônicas de publicações, como em Robinson et al. (1983) e Morita et al. (1991).

A exceção à regra foi um estudo descritivo de vários órgãos, no qual Goldfischer et al. (1985) reconhecem, e denominam corretamente, “fibras oxitalânicas” no músculo papilar cardíaco em humanos, além de apontá-las como participantes de fenômeno de ancoragem dos elementos teciduais. Além deste, houve um estudo, utilizando anticorpos anti-elastina, que comprovou a existência de elastina no epicárdio, endocárdio e endomísio, afirmando também a inexistência de fibras elásticas no perimísio (Farquharson e Robins, 1989).

Em 1996, pesquisadores brasileiros descreveram a diminuição dos componentes do sistema elástico durante o processo de envelhecimento em corações humanos (Carvalho Filho et al., 1996) e, em 1998, esse mesmo grupo descreveu a existência de uma malha de fibras elásticas no septo interventricular entre as fibras de colágeno (Ferraz-de-Carvalho e Liberti,

1998), definindo a existência de uma malha contínua de fibras elásticas, elauínicas e oxitalânicas imiscuídas entre as fibras de colágeno.

Mesmo sem fazer relacionar as microfibrilas encontradas na matriz extracelular do miocárdio com as fibras do sistema elástico, Gibson e colaboradores (1998) mostraram, por imunoistoquímica, a presença das glicoproteínas associadas às microfibrilas MAGP- 1 e MAGP-2 em grande quantidade no perimísio e endomísio no músculo cardíaco, sugerindo uma distribuição diferencial das microfibrilas no coração.

A distribuição dos três tipos de fibras do sistema elástico na parede vascular, em especial nas artérias, tem sido descrita na literatura (Lee e Oh, 2010, Pratt e Curci, 2010), existindo, inclusive muitos estudos sobre alterações dessas fibras nos vasos de sujeitos hipertensos (Arribas et al., 2006; Briones et al., 2010), porém no que se refere ao miocárdio não foi possível encontrar relatos sobre a distribuição das fibras do sistema elástico em hipertensos, seja em humanos ou em modelos animais.

2.2.3. Degradação da matriz extracelular

As metaloproteinases da matriz extracelular são uma grande família de proteinases (24) secretadas por fibroblastos, osteoblastos, condrócitos, macrófagos, leucócitos, células musculares e epiteliais, etc., Sua atividade é dependente de zinco e sua função é catalizar a degradação dos componentes da matriz extracelular, assim como ativar fatores de crescimento latentes, receptores de membrana e moléculas de adesão.

A degradação regulada da matriz extracelular está envolvida em muitos processos, tais como cicatrização, remodelamento tecidual, angiogênese e desenvolvimento embrionário. Por outro lado, o excesso de atividade de MMP está presente em diversas doenças, como a artrite reumatóide, osteoartrite, câncer, doenças auto-imunes e cardiovasculares.

Estão incluídas nesta família de proteínas as collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13), as estromelisinases (MMP-3, MMP-10), as gelatinases (MMP-2, MMP-9), matrilisina (MMP-7), as MMP de macrófagos (MMP-12) e as MMPs de membrana (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17). Essas enzimas são reguladas por outra classe de proteínas denominadas “inibidores teciduais de metaloproteinases” (TIMPs) (Ashworth et al., 1999).

Algumas metaloproteinases, como MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-12, MMP-13 tem atividade elastolítica (Reynolds e Meikle, 1997) e, com exceção da MMP-9, degradam também as microfibrilas associadas à elastina (Ashworth et al., 1999).

A matriz extracelular cardíaca é uma estrutura dinâmica cujos componentes protéicos são mantidos por um delicado controle homeostático que preserva a geometria e a integridade cardíacas. Assim sendo, 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).

Há diversos mecanismos teciduais desencadeantes da atividade das MMPs e TIMPs no coração: efetores do sistema renina-angiotensina-

aldosterona, fatores de crescimento como IGF, TGF β e FGF-2 e citocinas, como TNF- α (Fedak et al., 2005, Spinale, 2007).

A MMP-9 está envolvida na patogênese de amplo espectro de doenças cardiovasculares incluindo arterioesclerose, reestenose, cardiomiopatias, insuficiência cardíaca congestiva, infarto do miocárdio e aneurisma da aorta (Messerli, 2004).

2.3. Remodelamento Ventricular na Hipertensão

A hipertrofia ventricular esquerda decorrente da hipertensão arterial sistêmica é historicamente explicada como resposta adaptativa miocárdica que reduz o estresse da parede ventricular, permitindo que o mesmo mantenha sua capacidade mecânica (Badeer, 1964; Grossman et al., 1975).

Em resposta à injúria ou esforço, estabelece-se o processo de remodelamento cardíaco, que inclui a hipertrofia do cardiomiócito, 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).

A hipertrofia, em parte, deve-se à hipertrofia dos cardiomiócitos e, em parte, ao remodelamento da matriz extracelular. Este é um assunto importante em termos de saúde pública, uma vez que a hipertrofia cardíaca está relacionada ao aumento de risco para desenvolvimento de insuficiência cardíaca (Chobanian e Hill, 2000).

2.3.1. Hipertrofia dos cardiomiócitos

Os mecanismos que promovem a hipertrofia celular em decorrência do estresse ventricular não são totalmente conhecidos, sendo interpretada como uma resposta adaptativa compensatória que evita, a curto prazo, a incapacidade do ventrículo esquerdo de vencer a resistência da pós-carga e ejetar sangue (Franchini, 2001).

Em modelos experimentais pode-se avaliar, além da massa miocárdica, a estrutura e ultraestrutura histológica, o que possibilita a avaliação das dimensões e números dos miócitos e outras células miocárdicas, bem como de suas organelas (Anversa et al., 1976).

Tanto em modelos experimentais, quanto em corações hipertrofiados de humanos, os cardiomiócitos apresentam poliploidia, o que indica multiplicação do material genético (Vliegen et al., 1995). Ocorre aumento acentuado do número de miofibrilas e a área celular ocupada por organelas como mitocôndrias e retículo sarcoplasmático aumenta proporcionalmente ao crescimento celular. Na hipertrofia compensatória, o aumento do número de cristas mitocondriais impede um desequilíbrio entre a capacidade de produção de energia e a massa das microfibrilas (Rabinowitz e Zak, 1975; Anversa et al., 1976).

Durante a hipertrofia do cardiomiócito, além do aumento da expressão de proteínas contráteis, estruturais e relacionadas às vias metabólicas, ocorre re-expressão de isoformas fetais de miosina e actina, além da repressão peptídeo auricular natriurético (ANP) e a enzima conversora da

angiotensina I. Acredita-se que isso permite a síntese coordenada das proteínas necessárias para o aumento do tamanho dos cardiomiócitos e adequação às demandas de energia alterados dessas células agora maiores (Swynghedauw, 1999).

As modificações principais na hemodinâmica são aumento da pressão sistólica e diastólica que levam a um aumento de tensão e estiramento das células contráteis, dos fibroblastos e da matriz extracelular. As variáveis mecânicas podem ativar mecanismos de crescimento celular em cardiomiócitos sobrecarregados. No entanto, aumento do trabalho cardíaco provocado por sobrecarga também aumenta a demanda de energia que, por sua vez, pode estimular o crescimento celular (Franchini, 2001).

Por causa dos fenômenos de interação entre célula-matriz, os cardiomiócitos tem a capacidade de mecanotransdução. A observação ultraestrutural permitiu identificar dois arranjos de sítios de interação célula-matriz: as placas de adesão focal e os costâmeros.

As placas de adesão focal (semelhantes aquelas encontrada em fibroblastos em cultura) são regiões da membrana plasmática ricas em vinculina, talina e integrinas acopladas a uma malha de actina (Chan et al., 1999). Os costâmeros são regiões da membrana plasmática que contem as mesmas proteínas da placa de adesão focal e estão situadas próximas às linhas Z das miofibrilas periféricas, tendo como função ancorar lateralmente a estrutura sarcomérica à membrana celular que, por sua vez, ancora-se à matriz extracelular nesta região (Sonoda et al., 1999; Franchini, 2001) A interação da matriz extracelular com o citoesqueleto e, portanto, a

transdução dos estímulos mecânicos se dá nas regiões de adesão focal e nos costâmeros.

Uma hipótese seria que a mecanotransdução teria início pela ativação de canais devido ao estiramento, resultando em fenômenos elétricos localizados representados por despolarização ou hiperpolarização da membrana celular (Sokabe e Sachs, 1990). Outra hipótese, que não exclui a anterior, atribui ao estiramento a liberação pelos cardiomiócitos de fatores de crescimento, endotelina I e angiotensina II que atuam de modo autócrino e parácrino (Corda et al., 1997; Scheinowitz et al., 1998).

2.3.2. Remodelamento da matriz extracelular cardíaca

O coração tem capacidade de se adaptar às solitações mecânicas alterando as concentrações de seus diversos elementos teciduais. Pode-se imaginar que esta alteração é adaptativa (ou fisiológica) enquanto houver o balanço proporcional apropriado para o funcionamento normal do coração. Isto pode ser visto clinicamente: em atletas corredores de longa distância e levantadores de peso que apresentam aumento significativo de massa ventricular esquerda (hipertrofia presumivelmente fisiológica), sem envolvimento do sistema renina-angiotensina-aldosterona e tem função diastólica é normal; já em pacientes hipertensos o aumento de massa ventricular esquerda (até mesmo em menor grau do que aquela vista em atletas) deve-se ao acúmulo de colágeno associado à hipertrofia das células

musculares, há o envolvimento do sistema renina-angiotensina-aldosterona e o desfecho é a insuficiência cardíaca (Janicki, 1992; Weber et al., 1993).

A fibrose intersticial e perivascular no miocárdio, devida à deposição exagerada de fibras de colágeno tipo I e III, é um achado reconhecido na hipertrofia cardíaca hipertensiva. A fibrose intersticial aumenta a rigidez do miocárdio (como demonstrado em vários modelos experimentais, Weber, 1888; Jalil, 1989; Brilla, 1991) e induz à disfunção diastólica do ventrículo esquerdo, bem como a heterogeneidade elétrica do miocárdio, o que predispõe a arritmias ventriculares (McLenachan e Dargie, 1990).

Este tipo de fibrose pode ser o resultado de alterações complexas nos mecanismos que controlam o metabolismo do colágeno em fibroblastos e em miofibroblastos sob a influência de fatores profibroticos como fator de crescimento transformador β (TGF- β) e diminuição ou estagnação dos níveis de atividade de enzimas responsáveis pela degradação do colágeno (Weber, 2000).

A fibrose perivascular reduz a distensibilidade da parede dos vasos intramurais, contribuindo para redução do fluxo coronário no miocárdio (Frohlich, 2011). A fibrose perivascular pode ser a resposta reparativa de fibroblastos estimulada pela infiltração local de células inflamatórias (Young, 2008).

Diferentes metaloproteinases (MMPs) desempenham um importante papel no remodelamento cardíaco em condições normais e patológicas (Chakraborty e Eghbali, 1989). Assim sendo, o desenvolvimento de fibrose cardíaca está associado a mudanças na concentração e estado de ativação

de MMPs. O desequilíbrio entre MMPs e TIMPs na insuficiência cardíaca favorece a degradação do colágeno estável e contribui para a perda de tônus e dilatação da parede ventricular. Além disso, o estímulo para a degradação da matriz desestabiliza as vias de sinalização mediadas por integrinas, comprometendo a função dos cardiomiócitos.

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 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 células musculares cardíacas, o acúmulo de colágeno aumenta a carga das células musculares. Quando em excesso, o colágeno impede que as forças de tração alcancem adequadamente os cardiomiócitos envolvidos pelo 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 relativo da concentração 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, forma fibras mais finas, mais flexíveis (fibras reticulares) e com

maior interação com os proteoglicanos proporcionando grande parte das propriedades mecânicas do coração normal (Souza, 2002).

Como visto, a literatura é rica a respeito do remodelamento dos diferentes tipos de fibras de colágeno, porém não foi possível encontrar publicações sobre o remodelamento das fibras do sistema elástico na hipertensão, embora haja relatos bastante interessantes apontando para o aumento da atividade da enzima elastase, que degrada a elastina das fibras elásticas (Cheng et al., 2006; Arribas et al., 2006).

2.4. Modelo Animal (*Spontaneously Hypertensive Rat* - SHR)

Através de cruzamentos entre ratos Wistar Kyoto com níveis elevados de pressão sanguínea, Okamoto e Aoki (1963), pesquisadores da Faculdade de Medicina de Kyoto (Japão) obtiveram uma linhagem de ratos com espontaneamente hipertensos (SHR, *spontaneously hypertensive rat*).

Os SHR começam a manifestar hipertensão com aproximadamente 4 semanas de idade, apresentando níveis tensionais considerados hipertensivos já entre a 7ª e a 15ª semanas, atingindo pressão sistólica de 180–200 mmHg que permanece em um platô entre a 20ª e a 28ª semanas. Com cerca 1 ano e meio de idade, quando os animais começam a desenvolver um quadro de insuficiência cardíaca congestiva, associada à uma elevada taxa de mortalidade.

A vantagem de se utilizar este modelo de aumento gradual de pressão é que apresenta respostas hemodinâmicas e endócrinas

semelhantes às do homem com hipertensão essencial. No modelo experimental SHR os mecanismos hipertensores são alterações vasculares e neurais (Pinto et al., 1998) .

Embora não exista um modelo animal experimental ideal para o estudo da hipertensão humana, com as mesmas características anatômicas, hemodinâmicas e que apresente as mesmas afecções cardiovasculares, a linhagem SHR tem sido a mais utilizada para estes propósitos uma vez que estes animais desenvolvem muitas características da hipertensão essencial em humanos como, por exemplo, elevação da resistência periférica total com restrição arteriolar e venular, hipertrofia precoce do músculo cardíaco e da musculatura vascular, comprometimento renal e insuficiência cardíaca tardia (Diez et al., 1996, Varo et al., 2000).

3 JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

Levando-se em consideração:

a) que não foi possível encontrar na literatura dados sobre a distribuição de fibras do sistema elástico nos diferentes compartimentos da parede ventricular de ratos normotensos e hipertensos, apesar da evidência que estas fibras conferem aos tecidos a propriedade elástica e mantém a arquitetura dos órgãos protegendo o tecido mesmo quando submetido a expansão repetida, como acontece no coração, e

b) que não foi possível encontrar na literatura estudos que utilizam métodos estereológicos para quantificar de modo acurado e sem viés o volume ocupado por colágeno em corações de ratos normotensos e hipertensos; apesar de se saber que o remodelamento cardíaco decorrente da hipertensão leva a um aumento do colágeno fibrilar depositado na parede ventricular que termina por acarretar insuficiência cardíaca...

... a proposta deste estudo foi realizar, através de técnicas estereológicas e de microscopia eletrônica de transmissão, uma avaliação sistemática do remodelamento dos elementos fibrilares da matriz extracelular com ênfase nas alterações ultraestruturais das fibras dos sistemas colagênico e elástico do ventrículo esquerdo de ratos SHR, Wistar-Kyoto e Wistar.

4 MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos machos espontaneamente hipertensos da linhagem SHR e ratos normotensos das linhagens Wistar-Kyoto e Wistar.

Os animais tinham todos 3 meses de idade no início dos procedimentos e foram obtidos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

A manutenção dos animais foi feita no Biotério do Laboratório de Hipertensão Experimental no Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, com temperatura controlada (22°C) e ciclo de claro/escuro de 12/12 h, recebendo ração e água *ad libitum*.

Foram utilizados 12 animais de cada linhagem (Wistar, Wistar-Kyoto e SHR), sendo destinados 7 corações ao estudo em microscopia de luz e 5 à microscopia eletrônica.

O projeto de pesquisa que originou esta Tese foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq 023/2010).

4.2 Avaliação Hemodinâmica

As avaliações hemodinâmicas sistêmicas foram realizadas em todos os animais no Laboratório de Hipertensão Experimental no Instituto do Coração.

É necessário fazer a canulação da artéria femoral para registro direto dos sinais de pressão arterial sistólica, diastólica a partir da, qual se infere a pressão média e a frequência cardíaca. Os animais foram anestesiados com Ketamina (80 mg/kg) e Xilazina (12mg/kg) para colocação de cateteres (PE-10, diâmetro interno = 0,01, conectado ao PE-50, diâmetro interno = 0,05 mm). A extremidade do cateter de menor calibre foi introduzida na artéria femoral exposta através de uma incisão na região inguinal esquerda na mesma direção do feixe vâsculo-nervoso (Figura 14)

Figura 14 – À esquerda, o desenho ilustra o sítio de dissecção para a cateterização da artéria femoral. No centro e à direita, os desenhos mostram a oclusão da artéria femoral e a inserção da cânula (desenho de S. Lacchini).

Os cateteres foram fixados com fio de algodão, nos vasos e suas extremidades mais calibrosas foram passadas subcutaneamente, exteriorizadas no dorso da região cervical e fixadas com fio de algodão na

pele. Após o término da cirurgia cada rato foi mantido em uma caixa de Plexiglas com dimensões de 25x15x10 cm.

Vinte e quatro horas após a canulação, o cateter arterial foi conectado a uma extensão de 20 cm (PE-50), permitindo livre movimentação do animal pela caixa, durante todo o período do experimento. Esta extensão foi conectada a um transdutor eletromagnético (Kent Instruments, EUA) que, por sua vez, foi conectado a um pré-amplificador (Stemtech BPMT-2 Quintron Instrument Inc, EUA). Sinais de pressão arterial foram gravados durante um período de 30 minutos em um microcomputador equipado com um sistema de aquisição de dados (Windaq, 2Kz, DATAQ Instruments, EUA), permitindo análise dos pulsos de pressão, batimento-a-batimento, com uma frequência de amostragem de 2000 Hz por canal, para estudo dos valores de pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, pressão arterial média e frequência cardíaca (Figura 15).

Figura 15. Desenho ilustrando o sistema de registro de pressão arterial e frequência cardíaca (modificado de S. Lacchini).

Os valores de frequência cardíaca foram determinados a partir do intervalo entre dois picos sistólicos. As planilhas de dados obtidas foram analisadas em programa comercial para análise (Excel 5.0), onde se calcularam a média e o erro padrão da média.

4.3 Obtenção do Material e Cálculo do Índice de Hipertrofia Cardíaca

Após a realização dos procedimentos para análise hemodinâmica, os animais foram pesados e receberam uma dose de anestésico (pentobarbital sódico, 40mg/Kg) e foram perfundidos com KCl a 14mM em soro fisiológico para que o coração parasse em diástole. A seguir, foi feita a perfusão cardíaca com formol a 10% e procedeu-se a retirada do órgão. O índice de hipertrofia cardíaca foi calculado, em mg/g, dividindo-se a massa do coração pela massa corporal do rato.

4.4 Análises em Microscopia de Luz

Os corações foram removidos após a perfusão e pesados. Em seguida, procedeu-se a dissecação cuidadosa do excesso de tecido adiposo. Os corações foram mergulhados em paraformaldeído 4% por 24hs e depois foram mantidos em álcool etílico 70% para realização da amostragem do tecido para o estudo estereológico.

Os volumes totais do coração, bem como dos ventrículos (VD + VE) foram obtidos dividindo-se a massa (“wet weight”, g) do órgão pela densidade específica do tecido (1,06 g/cm³, Mendez e Keys, 1961).

4.4.1 Avaliação volumétrica ventricular

Os ventrículos foram incluídos em um bloco de ágar para facilitar a obtenção das fatias de transversais (ortogonais ao maior eixo do órgão), com o auxílio de uma navalha. As fatias obtidas foram utilizadas para estimar o volume ventricular. Resumidamente, este método permite obter uma estimativa acurada do volume de compartimentos de um objeto (no caso, os ventrículos do coração), cortando-se o objeto em fatias de mesma espessura para, em seguida, medir-se as áreas ocupadas pelo compartimento de interesse na face de corte de cada fatia e multiplicá-las pela distância dos cortes (ou pelo volume do objeto todo, caso este seja conhecido).

Assim, as fatias dos ventrículos incluídas em agar foram alinhadas sobre uma superfície lisa e conjunto foi fotografado. Com o auxílio do programa Image J (NIH, USA) foi sobreposto à imagem um sistema teste de pontos (do qual se conhecia a área associada a cada ponto) e foram contados separadamente os pontos incidentes em parede de VE, parede de VD e septo interventricular (Figura 16). Para análise volumétrica os pontos incidentes sobre o septo interventricular foram adicionados ao VE.

Figura 16- Representação esquemática das fatias transversais do coração e da sobreposição do retículo de pontos para determinação do volume ventricular.

O procedimento de amostragem do coração foi realizado de maneira sistemática, randômica e uniforme (*SUR sampling*) em multi-estágio levando em consideração o princípio do “*fractionator*” (Gundersen, 1986) de maneira que todo o tecido tenha a mesma chance de ser amostrado e a amostra selecionada para análise seja representativa do todo.

A fração de volume ocupada pelo VE foi calculada pela fórmula:

$$FvVE = (\sum ptVE + \sum ptSIV) / (\sum ptVE + \sum ptSIV + \sum ptVD),$$

onde: $\sum ptVE$ é a somatória dos pontos incidentes sobre as paredes do VE, $\sum ptSIV$ é a somatória de pontos incidentes sobre o septo interventricular e $\sum ptVD$ é a somatória dos pontos incidentes sobre as paredes do VD.

Para o cálculo do volume absoluto do VE foi usada a fórmula:

$$V_{VE} = FvVE \times V_{Vent},$$

onde, $FvVE$ é a fração de volume do VE e V_{Vent} é o volume da peça VD + VE obtido a partir do peso e densidade da peça.

4.4.2 Avaliação volumétrica do colágeno fibrilar

Para o estudo do volume ocupado pelo colágeno no ventrículo esquerdo, a porção de ventrículo esquerdo das fatias já mencionadas foi picotada em fragmentos de tecido, segundo o método do “*smooth fractionator*” (Gundersen, 2002), que foram divididos em dois conjuntos: um deles foi destinado para microscopia de luz e outro para eletrônica.

O conjunto de amostras para microscopia de luz pertencente a cada animal foi incluído randomicamente em um único bloco de parafina para garantir que cortes isotrópicos, randômicos e uniformes (IUR, *isotropic uniform random*) fossem obtidos. Cortes histológicos de 5 µm foram obtidos e corados com Picrossírius-hematoxilina, para coloração do colágeno em vermelho (Junqueira et al., 1979).

As imagens obtidas dos cortes histológicos foram processadas pelo Programa de edição de imagens Photoshop (Adobe) para seleção das áreas ocupadas por colágeno. (Figura 17).

Figura 17 – Método de seleção de áreas ocupadas por colágeno. Em A, fotomicrografia de miocárdio de animal SHR corado com o Picrossírius-hematoxilina, na qual o colágeno fibrilar do endomísio aparece corado em vermelho. Através de tratamento da imagem no Programa Photoshop foi possível selecionar a área ocupada pelo colágeno, como mostrado na imagem B.

A seguir, a nova imagem criada, contendo somente os perfis do colágeno fibrilar foi processada no Programa Image J, que permitiu o cálculo da área ocupada pelo colágeno fibrilar.

Sabendo-se que a fração de volume ocupada por uma estrutura num dado compartimento de referência num corte bidimensional (no caso, a fração ocupada por colágeno fibrilar em cortes de ventrículo esquerdo) corresponde ao volume da mesma estrutura no espaço tridimensional onde ela se encontra, pode-se calcular:

$$V_{col} = F_{vcol} \times V_{VE},$$

onde F_{vcol} é a fração de volume de colágeno e V_{VE} é o volume absoluto do VE.

4.4.3 Avaliação de diâmetro dos cardiomiócitos

Foram utilizados cortes histológicos corados com Hematoxilina-eosina para a obtenção das medidas do diâmetro dos cardiomiócitos nos perfis celulares cortados transversalmente nos quais foi possível observar o núcleo.

Foram avaliadas 150 células para cada animal utilizando-se o programa de análise de imagem Image J (NIH, USA) para traçar uma linha que passava sobre o núcleo e marcava o menor diâmetro do perfil celular, segundo Mori et al., 2004. (Figura 18).

Figura 18 – Fotomicrografia representativa de uma região do miocárdio com a marcação em amarelo para avaliação do diâmetro dos cardiomiócitos.

4.5 Análises em Microscopia Eletrônica

O material utilizado na obtenção de preparações para microscopia eletrônica foi constituído por pequenos fragmentos de ventrículo esquerdo processados segundo a rotina do Laboratório de Biologia Celular (LIM 59) da Faculdade de Medicina da USP, resumida nas seguintes etapas:

Pequenos fragmentos representativos dos ventrículos esquerdos foram fixados em solução de ácido tânico 0,1% dissolvido em glutaraldeído 2,0% em tampão fosfato 0,15M, pH 7,2, por 2 horas. A seguir, foram pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio 1% em salina e contrastados em solução de acetato de uranila 0,5% em salina, por 12 horas e incluído em resina Araldite. Foram obtidos cortes ultra-finos (de 70nm) em ultramicrotomo Reichert, submetidos a contrastação dupla por acetato de uranila 2% e por citrato de chumbo 0,5%. 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 ultraestrutural, inclusive das fibras do sistema elástico, foi preconizada por Mizuhira e Futaesaku em 1972. A concentração 0,1% de ácido tânico, segundo Montes (1996) é suficiente para obtenção de um contraste regular das fibras do sistema elástico, sem prejudicar a preservação dos demais componentes celulares. De fato, a adição de 0,1% de ácido tânico ao glutaraldeído confere uma forte eletrondensidade ao colágeno fibrilar, à elastina e às microfibrilas associadas.

4.5.1 Análise qualitativa ultraestrutural

Regiões representativas do interstício do epicárdio, do endocárdio e do miocárdio (epimísio, perimísio e endomísio) foram observadas sistematicamente ao microscópio eletrônico para reconhecimento de:

- fibras de colágeno a partir de suas características ultraestruturais, como a estriação típica de 64 nm e a associação para formação de fibras;
- elementos fibrilares do sistema elástico com base nos perfis ultraestruturais das fibras oxitalânicas, elaunínicas e elásticas propriamente ditas;
- perfis ultraestruturais característicos de zonas de interação entre os cardiomiócitos e a matriz-extracelular endomisial, como costâmeros e placas de adesão focal;

4.5.2 Diâmetro das fibrilas de colágeno

Foram medidos os diâmetros de secções transversais das fibrilas colágenas do endomísio (mínimo de 300 perfis para cada grupo) presentes micrografias eletrônicas digitalizadas de aumento conhecido. O programa de análise de imagem Image J (NIH, USA) foi utilizado para marcar e medir a extensão do diâmetro fibrilar. Os resultados obtidos foram classificados em classes para construção do gráfico de distribuição da frequência de diâmetros das fibrilas de colágeno no endomísio das três linhagens.

4.5.3 Avaliação semiquantitativa das fibras do sistema elástico

As quantidades relativas de fibras do sistema elástico foram estimadas através de um sistema semi-quantitativo, em diferentes classes, segundo Ferreira et al. (1987) e Caldini et al. (1990):

(-): ausentes

(+): encontradas raramente

(++): encontradas com frequência

(+++): encontradas em abundância

4.5.4 Análise estatística

Para estudar as diferenças entre os grupos nas diversas variáveis, foi feita a verificação de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e foram aplicados one-way ANOVA ou o teste de Kruskal-Wallis conforme necessário segundo a distribuição dos dados. O nível de significância estatística foi estabelecido em 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Índice de Hipertrofia e Massas Corporal, Cardíaca e Ventricular

A massa corporal média dos animais SHR foi estatisticamente menor que a massa das outras duas linhagens.

A massa cardíaca, o índice de hipertrofia cardíaca e a massa dos dois ventrículos em uma única peça são significativamente maiores nos animais SHR.

A Tabela 1 e o gráfico 1 mostram os resultados destes parâmetros. Notar que, embora estatisticamente não haja diferenças significativas, os valores obtidos para os animais WKY são intermediários entre WIS e SHR.

Tabela 1. Massa corporal, massa cardíaca, índice de hipertrofia cardíaca e massa ventricular dos ratos Wistar (WIS), Wistar Kyoto (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR).

	WIS	WKY	SHR
A) Massa corporal (g)	296,42±9,18	268,75±8,26	228,75±10,65 [§]
B) Massa cardíaca (g)	0,89±0,03	0,98±0,04	1,04±0,04 [§]
C) Índice de hipertrofia cardíaca (mg/g) (B x 1000) / A	3,05±0,12	3,81±0,25	4,50±0,25 [¥]
D) Massa ventricular VD + VE (g)	0,65±0,02	0,70±0,03	0,75±0,02 [§]

Os valores representam média±erro padrão da média;
ANOVA: § = p<0,05 vs WIS; ¥ = p<0,05 vs WIS e vs WKY

O Gráfico 1 ilustra os dados obtidos para hipertrofia cardíaca.

Gráfico 1. Índice de hipertrofia cardíaca de ratos Wistar, Wistar-Kyoto e SHR.

5.2 Medidas Diretas da Pressão Arterial e da Frequência Cardíaca

Conforme o esperado, os valores de pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e pressão arterial média são mais elevados nos animais SHR. A Tabela 2 resume os valores da pressão arterial e frequência cardíaca obtidos para os grupos SHR, Wistar–Kyoto e Wistar.

Tabela 2. Pressão arterial diastólica, pressão arterial sistólica, pressão arterial média e frequência cardíaca de ratos Wistar (WIS), Wistar Kyoto (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR).

	WIS	WKY	SHR
PA diastólica (mmHg)	99,87±1,8	93,89±2,9	139,82±3,1 [§]
PA sistólica (mmHg)	136,73±2,3	132,54±2,7	199,14±3,6 [§]
PA média (mmHg)	117,22±2,0	111,83±2,7	168,39±3,2 [§]
Frequência cardíaca (bpm)	313±6	315±8	327±3

Os valores representam média±erro padrão da média; PA = pressão arterial.
ANOVA: § = $p < 0,05$ vs WIS e WKY.

5.3 Dados de Volumes Cardíaco, Ventricular e de Colágeno

Os dados obtidos na avaliação volumétrica do coração, dos ventrículos e do colágeno fibrilar nas três linhagens estudadas estão discriminados na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros volumétricos do coração, dos ventrículos e do colágeno ventricular em ratos Wistar (WIS), Wistar-Kyoto (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR).

	WIS	WKY	SHR
A) Volume cardíaco (cm³) Massa coração x 1,06*	0,84±0,03	0,93±0,03	0,98±0,03 [§]
B) Volume VD + VE (cm³) Massa ventricular x 1,06*	0,61±0,02	0,66±0,02	0,71±0,02 [§]
C) Fração de volume VE (%)	75,73±1,29	83,44±2,27	86,46±4,19 [§]
D) Volume VE (cm³) (C/100) x B	0,47±0,02	0,54±0,01	0,59±0,03 [§]
E) Fração de volume de colágeno VE (%)	0,99±0,45	2,21±0,41	3,86±1,14 [¥]
F) Volume de colágeno VE (cm³) (E /100) x D	0,0047±0,02	0,0121±0,02	0,0230±0,07 [¥]

Valores representam a média ± EPM. Anova: § = p<0,05 vs WIS; ¥ = p<0,05 vs WIS e vs WKY

*1,06 = densidade do tecido cardíaco (Mendez e Keys, 1961);

VD = ventrículo direito; VE = ventrículo esquerdo

Os dados de volume absoluto do coração e volume absoluto ventricular, calculados pelas respectivas massas divididas pela densidade do tecido cardíaco (1,06 g/cm³), foram maiores nos animais SHR quando comparados ao WIS (Tabela 3). O Gráfico 2 ilustra os valores encontrados para o volume cardíaco nas linhagens estudadas.

Gráfico 2: Volume do coração de ratos Wistar, Wistar-Kyoto e SHR.

ANOVA: § = $p < 0,05$ vs WIS.

A fração de volume tecidual ocupada pelo ventrículo esquerdo no volume ventricular total e o volume do ventrículo esquerdo também foram significativamente maiores nos animais SHR quando comparados aos WIS (Tabela 3), indicando que houve hipertrofia ventricular, como esperado para os SHR. O Gráfico 3 ilustra os valores obtidos para volume tecidual do ventrículo esquerdo.

Gráfico 3: Volume do ventrículo esquerdo de ratos Wistar, Wistar-Kyoto e SHR.

ANOVA: § = $p < 0,05$ vs WIS

Os cortes histológicos corados pelo Picrossírius-hematoxilina foram analisados quantitativamente para avaliação do colágeno fibrilar (Tabela 3). Pode-se observar estes dois parâmetros são maiores nos ratos SHR quando comparados aos ratos WIS e também aos ratos WKY (Gráfico 4 e Gráfico 5).

Gráfico 4. Fração de volume ocupada por colágeno fibrilar no ventrículo esquerdo de ratos Wistar, Wistar-Kyoto e SHR.

ANOVA: ¥ = $p < 0,05$ vs WIS e vs WKY

Gráfico 5. Volume absoluto de colágeno fibrilar no ventrículo esquerdo de ratos Wistar, Wistar-Kyoto e SHR.

ANOVA: ¥ = $p < 0,05$ vs WIS e vs WKY

5.4 Diâmetro dos Cardiomiócitos

A análise das medidas dos diâmetros dos cardiomiócitos mostra que nos animais SHR os diâmetros são significativamente maiores quando comparados aos animais WIS, indicando que, como esperado, houve hipertrofia celular (Tabela 4).

Tabela 4. Diâmetro do cardiomiócito do ventrículo esquerdo em ratos Wistar (WIS), Wistar-Kyoto (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR).

	WIS	WKY	SHR
Diâmetro dos cardiomiócitos (μm)	16,11 $\pm$ 1,62	19,71 $\pm$ 0,46	23,03 $\pm$ 3,62 [§]

Valores representam a média $\pm$ EPM. Anova: § = $p < 0,05$ vs WIS.

O Gráfico 6 ilustra a medida dos diâmetros dos cardiomiócitos nas diferentes linhagens estudadas.

Gráfico 6. Diâmetro de cardiomiócitos de ventrículo esquerdo de ratos Wistar, Wistar-Kyoto e SHR.

ANOVA: § = $p < 0,05$ vs WIS.

5.5 Estudos Ultraestruturais

Chama a atenção o fato de que parte considerável do espaço extracelular está preenchida por substância de aspecto granular e microfilamentoso, caracterizada como a “substância fundamental amorfa” descrita na Histologia Clássica. Esta substância está em estreita associação com as células miocárdicas, com os fibroblastos, com as células endoteliais, com as fibrilas de colágeno e com os elementos das fibras do sistema elástico da parede ventricular.

5.5.1 Arranjo e distribuição de diâmetros das fibrilas de colágeno

Imagens de corações de ratos das três linhagens foram obtidas de regiões do endomísio em áreas onde as fibrilas de colágeno apareciam cortadas transversalmente.

A Figura 19 corresponde a imagens representativas das que foram estudadas.

A análise qualitativa mostrou que as fibrilas de colágeno do endomísio de ratos WIS se apresentavam, na maior parte das imagens, como fibrilas finas frouxamente empacotadas, formando fibras finas compostas poucos elementos fibrilares, em um arranjo que as caracteriza como fibrilas de colágeno tipo III, formando “fibras reticulares”. Ao lado destas fibras, o endomomísio dos ratos WIS apresentava fibras elásticas finas e fibras oxitalânicas (Figura 19 A).

Já nos ratos WKY e SHR, as fibrilas de colágeno do endomísio se apresentavam mais grossas e se associavam formando fibras mais grossas; este perfil ultraestrutural corresponde a fibrilas de colágeno tipo I, formando “fibras colágenas”. Além disso, podiam ser visualizadas fibras oxitalânicas enquanto que as fibras elásticas propriamente ditas eram raramente encontradas nesta localização nestes animais (Figura 19 B).

Figura 19. Micrografias eletrônicas são representativas do endomísio do miocárdio de rato Wistar (A), e SHR (B). Em ambas se observam fibrilas de colágeno (setas pretas), cortadas transversalmente e fibras oxitalânicas (setas azuis). Observar que em B, as fibrilas de colágeno estão presentes em maior número, densamente empacotadas e são mais espessas que aquelas dos ratos Wistar. Notar a presença de uma fibra elástica fina (seta vermelha) em A; CM: Cardiomiócito; Barra: 500 nm

A média dos diâmetros medidos em cortes transversais das fibrilas de colágeno presentes no endomísio está apresentada na Tabela 5.

Tabela 5. Diâmetro de fibrilas de colágeno do endomísio do ventrículo esquerdo em de ratos Wistar, Wistar-Kyoto e SHR.

	WIS	WKY	SHR
Diâmetro das fibrilas de colágeno (nm)	39,12±1,51	49,44±2,91 [§]	55,17±6,59 [§]

Valores representam a média ± EPM. Anova: § = p<0,05 vs WIS

O Gráfico 7 mostra os resultados da distribuição de frequência das fibrilas de colágeno, segundo categorias de diâmetro.

Gráfico 7. Distribuição de freqüência, em porcentagem de fibrilas de colágeno do endomísio do ventrículo esquerdo de ratos Wistar, Wistar-Kyoto e SHR segundo classes de diâmetro.

5.5.2 Distribuição das fibras do sistema elástico

Na matriz extracelular do coração, todos os três tipos de fibras do sistema elástico puderam ser identificados, através da microscopia eletrônica, ao lado de populações de fibrilas de colágeno de diferentes diâmetros.

Tanto no endocárdio como no epicárdio do VE, a microscopia eletrônica revelou a presença de abundantes fibras elásticas propriamente ditas e frequentes fibras elaunínicas no tecido conjuntivo sub-endotelial. As fibras oxitalânicas, isoladas, eram mais raras. Nestes dois compartimentos, não foram observadas diferenças na distribuição e na frequência das fibras do sistema elástico entre as linhagens WIS, WKY e SHR (Figuras 20 a 23). No entanto, na região mais profunda do epicárdio dos animais SHR observou-se uma maior quantidade de colágeno fibrilar, sem o aumento correspondente de fibras do sistema elástico (Figura 23).

No perímio do miocárdio do VE dos animais da linhagem WIS e WKY, foi possível observar grande quantidade de fibras elaunínicas e oxitalânicas, sendo que as fibras elásticas propriamente ditas apareceram com menor frequência (Figuras 24 e 25). No entanto, nos animais SHR, as fibras elásticas e elaunínicas apareceram raramente, de modo que o sistema elástico no perímio destes animais era representado principalmente pelas fibras oxitalânicas, como mostram as Figuras 26 e 27. Nos animais SHR e, em menor escala, nos WKY apareceram quantidades abundantes de fibras colagênicas, o que contribui para o aumento da resistência tecidual.

No endomísio do VE de ratos WIS e, em menor frequência nos WKY, a matriz extracelular apresentou-se rica em fibras elásticas e elaunínicas ao lado de fibras finas de colágeno, formadas por poucas fibrilas finas (Figuras 28 e 29 e 30). Também é possível observar fibras oxitalânicas delgadas no endomísio de ratos WIS e WKY.

No miocárdio de animais SHR o endomísio se mostrou espessado e apresentou maior densidade de fibrilas de colágenas grossas quando comparado às duas outras linhagens; com relação às fibras do sistema elástico, no endomísio do VE de ratos SHR não foram encontradas fibras elásticas propriamente ditas, os perfis de fibras elaunínicas eram raros e havia grande quantidade de fibras oxitalânicas (Figura 31 e 32).

Estes achados, consistentemente observados em todos os corações estudados, estão resumidos na Tabela 6.

Tabela 6. Distribuição diferencial das fibras do sistema elástico no ventrículo esquerdo de ratos Wistar (WIS), Wistar-Kyoto (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR).

	Endocárdio e Epicárdio		Miocárdio			
			Perimísio		Endomísio	
	WIS e WKY	SHR	WIS e WKY	SHR	WIS e WKY	SHR
<i>Fibras oxitalânicas</i>	-	-	++	+++	++	++
<i>Fibras elaunínicas</i>	++	++	+++	+	++	+
<i>Fibras elásticas</i>	+++	+++	++	+	++	-

(-): ausentes; (+): raras; (++): freqüentes; (+++): abundantes.

Um aspecto ultra-estrutural comum a todas regiões de endomísio analisadas nas três linhagens foi a grande interação entre a matriz extracelular e a membrana dos cardiomiócitos e dos fibroblastos em toda sua extensão ou em estruturas especializadas de adesão célula-matriz, como as placas de adesão e os costâmeros dos cardiomiócitos. Estes achados são uma tradução morfológica dos fenômenos de transdução do sinal mecânico da matriz extracelular aos elementos do citoesqueleto e podem ser observados nas Figuras 25, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 34 e 35.

Figura 20 - Micrografia eletrônica do endocárdio de rato Wistar. A célula endotelial (seta rosa) reveste a cavidade ventricular e se apóia em um tecido conjuntivo rico em fibras elásticas (setas vermelhas) facilmente identificáveis pela presença de elastina (que se mostra muito eletrondensa devido ao acréscimo de ácido tânico no fixador). Observar ainda fibrilas de colágeno (C) formando fibras finas. Logo abaixo do endocárdio encontra-se um cardiomiócito (CM) tipicamente rico em mitocôndrias e filamentos contráteis organizados em sarcômeros. Este mesmo padrão estrutural foi observado no endocárdio do rato Wistar-Kyoto.
Barra de aumento = 2µm.

Figura 21 - Micrografia eletrônica do endocárdio de rato SHR. Observa-se o núcleo (N) e o delgado citoplasma da célula endotelial (seta rosa) que recobre o tecido conjuntivo subjacente, onde estão presentes fibras de colágeno (C) e fibras elásticas (setas vermelhas). Sob a célula endotelial observa-se uma espessa lâmina basal (LB). Notar a delaminação da lâmina basal (barra azul); este fenômeno apareceu em várias localizações do endocárdio dos animais SHR.
CM = célula muscular cardíaca. Barra de aumento = 2µm.

Figura 22 - Micrografia eletrônica do epicárdio de rato Wistar-Kyoto. Observa-se a célula mesotelial (Mes) recobrindo um tecido conjuntivo rico em fibrilas de colágeno (C) e por fibras elaunínicas (setas), constituídas por grumos de elastina espalhados por entre os feixes de microfibrilas. Este mesmo padrão ultra-estrutural foi observado no epicárdio dos ratos Wistar.
CM = cardiomiócito. Barra de aumento = 1µm.

Figura 23 – Micrografia eletrônica do epicárdio de rato SHR. Observa-se a célula mesotelial (Mes) revestindo o tecido conjuntivo subjacente. De maneira semelhante à micrografia anterior, a seta aponta uma fibra elaunínica. Chama a atenção a grande quantidade de fibrilas de colágeno (C) que se associam paralelamente formando uma fibra colágena grossa na região mais interna do epicárdio, que pode ser interpretada como a imagem ultra-estrutural da fibrose ventricular que acompanha a hipertensão.
CM = cardiomiócito. Barra de aumento = 1µm.

Figura 24 - Micrografia eletrônica do perimísio de rato Wistar. Trata-se de um tecido conjuntivo rico em fibras colágenas (C) e em fibras do sistema elástico (setas vermelhas). A maioria delas são fibras elaunínicas, constituídas por grumos de elastina em meio aos feixes de microfibrilas. Notar os prolongamentos de fibroblastos (setas azuis). O mesmo padrão ultra-estrutural pode ser observado no pericárdio dos animais Wistar-Kyoto.
Barra de aumento = 1µm.

Figura 25 - Micrografia eletrônica do perimísio de rato Wistar. A imagem mostra à esquerda parte de um fibroblasto (F) e à direita parte de um cardiomiócito (CM). Na matriz extracelular podem-se perceber as fibrilas de colágeno (C) agrupadas formando fibras de disposição aparentemente espiralada. Nota-se a presença de fibras oxitalânicas como feixes de microfibrilas do sistema elástico (setas vermelhas) desprovidos de elastina. Observar que a membrana do cardiomiócito apresenta áreas diferenciadas denominadas “placas de adesão focal” (setas azuis) que são estruturas especializadas para interação da célula com a matriz extracelular. Este arranjo das fibras da matriz extracelular confere menor elasticidade do que aquele mostrado na Figura 24. Assim sendo, no perimísio de animais Wistar e Wistar-Kyoto coexistem áreas de maior e de menor conteúdo elástico.
Barra de aumento = 0,5 µm.

Figura 26 - Micrografia eletrônica do perimísio de rato SHR. Na matriz extracelular, podem ser observados alguns perfis de finas fibras elásticas e elastínicas (setas) entre as fibras colágenas (C), porém em menor concentração quando se compara com o perimísio dos ratos Wistar, como mostrado na Figura 24.
CM = cardiomiócito; F = prolongamentos de fibroblastos.
Barra de aumento = 2 μ m.

Figura 27 - Micrografia eletrônica do perimísio de rato SHR. No centro da imagem observa-se o prolongamento de um fibroblasto (F). A região delimitada em vermelho corresponde a uma grossa fibra oxitalânica. A presença de fibras colágenas (C) e oxitalânicas confere maior capacidade de resistência a forças mecânicas. Observar a interação dos elementos da matriz com a membrana celular (setas azuis).
CM = cardiomiócito. Barra de aumento = 0,2 μ m.

Figura 28 - Micrografia eletrônica do endomísio de rato Wistar. No estreito espaço entre dois cardiomiócitos (CM), estão presentes vários perfis de finas fibras elásticas propriamente ditas (setas vermelhas), identificados pela massa eletrondensa de elastina rodeada por microfibrilas. Observar também algumas fibrilas delgadas de colágeno esparsas (setas azuis) na matriz extracelular. Este tipo de constituição e arranjo dos elementos fibrilares da matriz confere grande capacidade elástica ao endomísio. Notar a intensa interação dos elementos da matriz com a lâmina basal (asteriscos) dos cardiomiócitos. Barra de aumento = 0,5µm.

Figura 29 - Micrografia eletrônica do endomísio de rato Wistar. Nota-se os elementos fibrilares da matriz extracelular: um perfil de uma fibra elástica (seta vermelha) com grande quantidade de elastina e fibrilas finas de colágeno (setas azuis). Os elementos da matriz extracelular interagem extensamente com a lâmina basal (asteriscos) dos cardiomiócitos (CM). Barra de aumento = 0,2 µm.

Figura 30 - Micrografia eletrônica do endomísio de rato Wistar-Kyoto. Embora esta não seja uma imagem frequente, é possível encontrar nestes animais algumas regiões do endomísio semelhantes ao rato Wistar, ou seja, fibrilas de colágeno finas e esparsas (seta azul) ao lado de fibras ricas em elastina (seta vermelha) rodeadas por microfibrilas. Observar a intensa interação destes elementos entre si e com a lâmina basal (asterisco) do cardiomiócito (CM). Através desta interação molecular, os sinais mecânicos gerados no interstício são transmitidos à célula e vice-versa.
Barra de aumento = 0,2 μm .

Figura 31 – Micrografia eletrônica do endomísio de rato SHR. Notar a grande quantidade de fibrilas de colágeno (C) densamente empacotadas (que aqui aparecem, na sua maioria, cortadas transversalmente). Na periferia imediata do cardiomiócito (CM) encontra-se uma grande quantidade de microfibrilas na delimitada em vermelho. A seta azul aponta para o único ponto onde pode ser identificada a elastina. Assim sendo, nestes animais hipertensos, o endomísio dos animais SHR apresenta menor elasticidade (pela escassez de elastina) e menor complacência (pelo acúmulo de colágeno).
Barra de aumento: 0,5 μm .

Figura 32 – Micrografia eletrônica do endomísio de rato SHR. Notar que as fibrilas de colágeno (C) e as microfibrilas das fibras oxitalânicas (setas vermelhas) se inserem na lâmina basal (asterisco) do cardiomiócito (CM). Nesta imagem a lâmina basal aparece mais espessa, devido à incidência oblíqua do corte, o que facilita a sua observação.
Barra de aumento = 0,5 μ m.

Figura 33 – Micrografia eletrônica do endomísio de rato SHR. Notar que as microfibrilas das fibras oxitalânicas (setas vermelhas) interagem diretamente com a membrana celular de um fibroblasto (F) e que os filamentos do citoesqueleto formam feixes que se direcionam à face citoplasmática da membrana celular (seta amarela). Desta forma, as informações sobre as forças mecânicas que atuam localmente são percebidas pelo citoesqueleto desencadeando cascatas de sinalização que controlam a expressão gênica do fibroblasto.
Barra de aumento = 0,5 μ m.

Figura 34 - Micrografia eletrônica do endomísio de rato Wistar, mostrando estruturas especializadas de junção célula-matriz ao nível da linha Z (setas amarelas). Devido ao aspecto ondulado que confere a superfície celular, estas regiões recebem a denominação de costâmeros. Assim como as placas de adesão focal, os costâmeros estão envolvidos nos fenômenos de transdução de sinais mecânicos entre a matriz e a célula, através da conexão física entre os elementos da matriz e a cardiomiócito (seta azul).
CM = cardiomiócito; C = fibrilas de colágeno; End = célula endotelial de um capilar no endomísio; Barra = 0,5 μm .

Figura 35 - Micrografia eletrônica do endomísio de rato SHR. Notar as placas de adesão focal (setas azuis) na membrana plasmática do cardiomiócito (CM). Os filamentos do citoesqueleto (setas amarelas) do cardiomiócito se inserem na face citoplasmática da placa de adesão focal, enquanto que as estruturas da matriz extracelular se inserem na face externa. Os estímulos mecânicos são transmitidos pela densa rede de fibrilas colágenas (C) que, no animal SHR, substituiu a trama elástica e delicada que tipicamente ocupa o endomísio ventricular dos ratos normotensos.
Barra de aumento = 0,5 μm .

6 DISCUSSÃO

O estudo ultraestrutural do coração normal já foi revisto recentemente, porém a matriz extracelular foi analisada em microscopia de varredura e força atômica (Goldstein e Schroeter, 2002); porém com estas técnicas é difícil distinguir os componentes fibrilares entre si. Não havia na literatura estudos sistematizados, sob a luz dos conhecimentos atuais, sobre as alterações das fibras do sistema elástico na vigência da hipertensão. O presente trabalho, através da microscopia eletrônica, demonstrou de que uma das consequências da hipertrofia cardíaca é a diminuição da concentração de fibras do sistema elástico no miocárdio, particularmente no endomísio.

Nos animais SHR, como esperado, houve uma maior pressão arterial tanto sistólica como diastólica e média. Em humanos, os dados de Framingham Heart Study mostram a associação entre a massa do ventrículo esquerdo (analisada pelo ecocardiograma) e a média da pressão arterial sistólica e diastólica (Pimente, 2008). A hipertrofia pode ser explicada como resposta adaptativa que reduz o estresse da parede do ventrículo esquerdo como modo de manter a fração de ejeção em níveis adequados (Dougherty et al., 1984).

Na hipertensão, inicialmente, há uma fase de hipertrofia ventricular associada a um acúmulo progressivo de fibras colagênicas no ventrículo esquerdo. Este fenômeno de fibrose progressiva inicia-se mesmo na ausência de morte celular, sendo uma resposta adaptativa que preserva a

capacidade de geração de força contrátil. Mais tarde, se o estímulo pressórico persiste, surge a fibrose reparativa em resposta à morte celular. Porém, com ou sem perda celular, a fibrose leva ao enrijecimento tecidual, com menor complacência e geometria ventricular alterada (Weber, 1989; Rossi, 1998; Chancey et al., 2002). Finalmente, este processo acaba por prejudicar a função sistólica e diastólica, resultando em hipertrofia acompanhada de insuficiência cardíaca.

Nos ratos SHR utilizados neste estudo, a hipertrofia do ventrículo se estabeleceu como desejado, pois nestes, em comparação com os animais Wistar, encontraram-se significativamente maiores o volume do ventrículo esquerdo (25,5%), o volume absoluto de colágeno (389%) e a fração de volume de colágeno (263%). Que seja do nosso conhecimento, este é primeiro estudo que utiliza métodos estereológicos para avaliar as variações de volume nas linhagens Wistar-Kyoto e SHR.

Os dados eletrocardiográficos mostram que a disfunção sistólica aparece aos 2 meses de idade, nos animais SHR e a disfunção diastólica surge aos 3 meses (Kokubo et al., 2005). Estes autores relatam ainda que os animais SHR apresentam inicialmente uma hipertrofia excêntrica (aumento do índice de hipertrofia simultâneo a um valor normal da espessura relativa da parede) e, a partir das 6 semanas de idade, se instala uma hipertrofia concêntrica (índice de hipertrofia elevado associado a espessura relativa de parede também elevada). Os dados da literatura mostram que a fração de ejeção dos animais SHR é semelhante ao do rato Wistar (na idade estudada) e que a disfunção sistólica nos animais SHR é

identificada pelo menor valor do débito cardíaco e menor velocidade de encurtamento circunferencial nos SHR. A incapacidade de esvaziamento total da câmara cardíaca destes animais leva a um aumento de volume diastólico (que pode ser visto pelo aumento do diâmetro da cavidade de VE na diástole), da pressão diastólica e menor volume ejetado em cada sístole (volume sistólico); estes parâmetros em conjunto resultam em menor débito cardíaco nos animais SHR.

As alterações da capacidade volumétrica ventricular podem ser explicadas (pelo menos em parte) pela alteração na composição tecidual da parede ventricular dos animais SHR, como por exemplo, o menor conteúdo de elastina e o maior volume absoluto e maior fração de volume de colágeno aqui observados, que levam a um aumento de rigidez e diminuição da complacência tecidual. A literatura científica estabelece que os parâmetros diastólicos (tempo de relaxamento isovolumétrico e a velocidade de fluxo de enchimento rápido ventricular) são menores nos animais SHR, indicando a presença da disfunção diastólica (Brilla et al., 1991) devida ao aumento da espessura da parede ventricular e à fibrose, enquanto que os achados descritos aqui de diminuição de fibras elásticas e elastínicas no endomísio destes animais são inéditos.

Neste trabalho, os dados morfométricos principais (como massa e volume dos compartimentos de interesse) não foram calculados a partir dos valores de espessura das paredes e diâmetro ventricular obtidos pelo ecocardiograma, como, por exemplo, se calcula classicamente a massa ventricular, pela fórmula $1,047 \times [(ESIV + DVE + EPVE)^3 - DVE^3] \times 0,8 + 0,6$,

onde: 1,047 representa a densidade acústica do miocárdio, validada em ratos por Fard et al (2000) e os índices 0,8 e 0,6 são fatores de correção. Aqui optamos por obter valores morfométricos diretamente a partir do coração retirado do animal, no qual foi possível aplicar métodos estereológicos de cálculo do volume de cada compartimento de interesse a partir da contagem de pontos incidentes nas diferentes regiões. Certamente os valores obtidos pelos diferentes métodos não são iguais entre si e podem interferir nos resultados, como, por exemplo, no cálculo do volume absoluto de colágeno no ventrículo esquerdo, que depende certamente de uma avaliação precisa do volume deste compartimento. No entanto, as medidas diretas como fizemos aqui, são mais acuradas do que aquelas indiretas e devem ser aplicadas sempre que possível.

Uma análise crítica dos diferentes métodos para cálculo de massa e volume ventriculares faz pensar que o método que se utiliza dos dados obtidos através do ecocardiograma tem certo grau de imprecisão por ser um método não invasivo. Por sua vez, o método que se vale da dissecação e separação de cada ventrículo para posterior pesagem também implica certa imprecisão, pois as fibras cardíacas dos ventrículos são contínuas entre si e dificilmente se consegue definir exatamente o limite entre as duas paredes ventriculares. A aplicação do método estereológico usado neste trabalho pode ser considerado bastante precisa, pois em primeiro lugar faz a avaliação da fração de volume dos compartimentos e elementos de interesse (pela contagem de pontos incidentes) para, em seguida, se obter

os volumes absolutos (em cm^3) pela simples multiplicação de cada fração pelo volume do compartimento de interesse.

A fibrose miocárdica tem sido definida como um aumento significativo da concentração de colágeno ou de sua fração de volume acima. O aumento do volume absoluto de colágeno é um dado de fibrose menos acurado uma vez que, no caso do coração, há um aumento de massa ventricular. Tal definição de fibrose não inclui outros fatores importantes para o desempenho tecidual como as ligações cruzadas das moléculas de colágeno e a razão entre colágeno tipo I e tipo III (ambas variáveis que tem grande impacto sobre a função tecidual). Por isso, neste trabalho, além de se avaliar o volume de colágeno foi realizada a análise dos diâmetros das fibrilas como uma maneira de verificar a “qualidade do colágeno” que está sendo depositado.

A análise ultraestrutural da parede ventricular permitiu identificar também áreas de espessamento e reduplicação (ou delaminação) da lâmina basal subjacente ao endotélio tanto no epicárdio. O aumento de espessura e reduplicação da lâmina basal é um fenômeno comum em situações de falta de nutrientes e/ou oxigênio como ocorre nas isquemias e é a principal manifestação de microangiopatias.

No caso do diabetes, a disfunção dos pequenos vasos tem como principal manifestação estrutural o espessamento da lâmina basal de diferentes órgãos, incluindo pele, músculo esquelético, retina, glomérulos renais. Mais ainda, este fenômeno acontece também em estruturas não vasculares, como os túbulos renais, cápsula de Bowman, nervos periféricos.

As principais características do espessamento da lâmina basal é a organização concêntrica do material em estratos concêntricamente arranjados ao redor do capilar, deixando espaços irregulares entre os estratos. De modo geral, estes espaços contêm debris celulares. É interessante notar que em músculo esquelético de diabéticos é possível encontrar cilindros compostos apenas de destas camadas concêntricas de lâmina basal e representam capilares cujos elementos celulares sofreram degeneração (Vraco e Benditt, 1974).

Especificamente em relação a alterações de lâmina basal de pequenos vasos cardíacos, sabe-se que a literatura descreve a existência de reduplicação de lâmina basal em capilares de corações transplantados que apresentavam também outras alterações endoteliais e degeneração de cardiomiócitos (Hammond e Yowell, 1994), em casos de miocardite eosinofílica (Rossi et al., 1996), endomiocardiofibrose (Krishnaswami et al., 1984) e Doenças de Chagas (Sanches et al, 1993). É interessante observar que em todas estas condições estudadas, há sempre alterações fibróticas associadas.

Há várias evidências que apontam para hipótese de que as alterações de lâmina basal sejam acompanhadas de atividade aumentada das metaloproteinases MMP-2 e seu inibidor TIMP (Fleschmajer et al., 2000), podendo haver também um aumento na atividade da MMP-9. Sabendo que estas moléculas são também responsáveis pelo balanço no conteúdo de elastina tecidual e podem ter contribuído para diminuir a quantidade de elastina no tecido cardíaco dos animais SHR (como foi observado em nosso

estudo) não é de surpreender que a delaminação da lâmina basal e a diminuição da elastina tecidual possam ocorrer simultaneamente.

A caracterização dos diferentes tipos de fibras do sistema elástico no coração foi realizada facilmente devido à existência de critérios morfológicos e seletivos 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 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 Weess (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, no rato Wistar, existem fibras elásticas, elaunícas nesta localização. Existem também fibras oxitalânicas e/ou de suas microfibrilas arranjadas frouxamente, de modo a formar uma rede delicada que se estende por toda a matriz extracelular. 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 cemento 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 do sistema elástico que contem elastina indicam que estas são responsáveis pela capacidade de reverter a distensão a que o tecido conjuntivo é submetido fazendo-o voltar às condições mecânicas iniciais. Assim sendo, é de supor-se que, durante o movimento de relaxamento do miocárdio essas fibras são estiradas, armazenam energia potencial elástica para restaurar a sua configuração original ao final da diástole.

A hipertensão arterial provoca diferentes graus de hipertrofia cardíaca, com modificação no volume dos átrios e ventrículos, disfunção valvar e disfunção sistólica e diastólica. Os nossos achados, de menor conteúdo elástico no miocárdio dos animais SHR contribuem para entender a alteração do relaxamento ventricular esquerdo, por perda da capacidade elástica da parede que, no caso, se agrava mais ainda pelo acúmulo de fibrilas de colágeno mais grossas (como se demonstrou neste trabalho).

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 extracardíaco. 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 maneira interessante, aparentemente, os nossos achados sugerem que as alterações mecânicas da hipertrofia, não foram suficientes para promover alterações estruturais e/ou quantitativas das fibras elásticas e elaunínicas do epicárdio.

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. Durante o enchimento ventricular rápido ocorre novamente o estiramento do epicárdio (Jöbis 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 Jöbis 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. Os nossos achados estão de acordo com aqueles de Mujumdar e Tyagi (1999) ao verificarem, 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.

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 à 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 ultraestrutural 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 fibrilas de colágeno esparsas e fibras elásticas propriamente ditas se inserindo diretamente na lâmina basal, (como foi demonstrado aqui para o endomísio dos ratos normotensos) coincide com a descrição clássica da lâmina basal do epitélio bronquiolar que também recebe diretamente fibras do sistema elástico de modo a acomodar as variações de diâmetro da luz bronquiolar.

Nos animais hipertensos, provavelmente ocorreria a ruptura deste delicado equilíbrio mecânico à medida que a parede se enrijece com a deposição de colágeno. E, em resposta à nossa condição, as células passariam a depositar quantidades maiores de microfibrilas, como acontece fisiologicamente em tecidos que normalmente estão sujeitos a forças tenses importantes, como junção dermo-epidérmica, o peritendineum, o ligamento periodontal e o zônula ciliar do cristalino (Caldini et al., 1990).

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 co-existem 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 (Milewicz 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.

A análise ultraestrutural por microscopia eletrônica é trabalhosa e cara, e a prevalência de fibras do sistema elástico é de difícil quantificação.

Em órgãos como pulmão, pele, tendões, é possível a quantificação das fibras do sistema elástico pela microscopia de luz (em cortes corados com corantes seletivos). No caso do coração, a microscopia eletrônica mostrou que grande parte das fibras oxitalânicas e elaunínicas do miocárdio tem dimensões próximas ao limite de resolução do microscópio óptico (cerca de 0,2 μm , ou seja 200 nm). Considerando que as microfibrilas (com 10 nm de diâmetro) se associam em pequeno número para formar as fibras oxitalânicas do endomísio cardíaco, o uso do microscópio de luz também não é adequado para o estudo sistemático da distribuição das fibras do sistema elástico. Assim sendo, nossa proposta para a continuidade deste estudo é usar como ferramenta o microscópio confocal com identificação imunoistoquímica dos elementos constituintes do sistema elástico.

Nos últimos anos, estudos voltados para a organização supramolecular das microfibrilas levaram à suposição de que estas 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). Como apreciar esta nova possibilidade em um tecido tão rico de microfibrilas como é o coração?

Em várias micrografias eletrônicas mostradas neste trabalho foi possível observar a malha granular e microfilamentosa que ocupa o interstício cardíaco. Estes elementos correspondem à “substância fundamental amorfa” que adquire este aspecto devido à precipitação dos proteoglicanos, do ácido hialurônico e glicoproteínas da matriz extracelular quando se utilizam os métodos de fixação convencionais para microscopia eletrônica (como aqueles utilizados neste trabalho), conforme descrito por (Frank e Langer, 1974).

A relativamente grande extensão de “espaços vazios” e de material granulo-microfilamentoso observada no endomísio corresponde a regiões que “in vivo” contêm grande de água adsorvida nos proteoglicanos. Esta organização estrutural permite a hidratação do tecido, a manutenção de seu tônus, serve meio para difusão de macromoléculas e migração celular e tem uma função importante na absorção de choque (como pode ser visto, ao extremo, no joelho e no disco intervertebral). Esta malha de proteoglicanos altamente hidratada associada à delicada rede de colágeno do endomísio suporta adequadamente a contínua deformação estrutural durante o ciclo cardíaco, absorvendo as forças compressivas ao nível da matriz extracelular cardíaca (Robinson et al., 1983).

Sabe-se que os diferentes tipos de colágeno se associam diferencialmente a diferentes quantidades de proteoglicanos. Assim sendo, tecidos constituídos principalmente por colágeno tipo I possuem quantidades

menores de proteoglicanos que tecidos nos quais predomina o colágeno tipo III (Junqueira e Montes, 1983). Assim sendo, é lícito supor que a alteração do colágeno ventricular que leva a fibrose esteja associada a um acúmulo de colágeno I e, portanto, menor conteúdo de proteoglicanos, o que implica alterações biomecânicas e osmóticas no tecido.

Desta forma, deste trabalho deriva o propósito de realizar uma investigação pormenorizada para identificar a distribuição diferencial dos proteoglicanos e glicosaminoglicanos no coração em ratos normais e hipertensos, uma vez que a hipertensão, além de provocar alterações do colágeno (como amplamente demonstrado na literatura) e das fibras do sistema elástico (como foi visto neste trabalho), certamente também leva a alterações qualitativas e quantitativas nos proteoglicanos que necessitam ser investigadas para se compreender mais acuradamente o remodelamento ventricular. O estudo das alterações quali- e quantitativas dos proteoglicanos no coração de hipertensos ganha ainda mais importância quando se leva em consideração o estudo de Frank e Langer, utilizando técnicas de estereologia em microscopia eletrônica há 38 anos atrás (!!!), mostrou que a fração de volume ocupada por este material granular no miocárdio humano é 5,7% enquanto que a fração de volume ocupada pelo colágeno é 1%.

Outra informação valiosa que pode ser depreendida da análise das micrografias eletrônicas apresentadas nesta Tese 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 qual é o mecanismo interno 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.

Os maiores desafios propostos para o entendimento da biologia do sistema elástico são: conhecer como as microfibrilas e a elastina se polimerizam e como este repertório de moléculas associadas contribui para formar uma fibra elástica funcional. Deste modo, será possível entender as bases fisiopatológicas das doenças que apresentam descontrole dos elementos que compõem a fibra elástica. Outro tema importante é: como as fibras do sistema elástico regulam o comportamento celular? 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), esta é uma época de progresso substancial no entendimento da estrutura e função do miocárdio, 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 de estudos dos múltiplos níveis de organização biológica – das proteínas para as células, tecidos, órgãos e sistemas – para

que se entender a complexidade da interação entre forma e função que gera um comportamento específico (normal ou anormal) nos sistemas biológicos. Assim sendo, este trabalho pretendeu fazer a descrição da distribuição diferencial das fibras do sistema elástico em corações de ratos WIS e WKY normotensos e seu remodelamento nos ratos SHR hipertensos, associando com dados sobre o remodelamento do colágeno, de modo a gerar informação integrada para se compreender a interação entre forma e função no coração.

7 CONCLUSÕES

1. A fração de volume e o volume absoluto de colágeno fibrilar estão aumentados nos animais SHR e WKY, quando comparados aos animais WIS, o que implica cuidados adicionais para analisar resultados de experimentos que utilizam a linhagem WKY como controle para a linhagem SHR.
2. A população de fibrilas de colágeno no endomísio do ventrículo esquerdo de ratos SHR apresenta diâmetros maiores que nos animais normotensos.
3. O ventrículo esquerdo dos ratos WKY também exhibe uma população de fibrilas de colágeno com diâmetros superiores aos ratos WIS, apesar de serem normotensos.
4. As fibras do sistema elástico tem distribuição diferencial nos compartimentos cardíacos: no epicárdio e endocárdio há grandes quantidades de fibras elaunínicas e elásticas propriamente ditas; no perimísio há abundantes fibras elaunínicas e menor frequência de fibras elásticas; no endomísio há finas fibras elásticas, elaunínicas e oxitalânicas.
5. O remodelamento do colágeno no ventrículo esquerdo dos animais SHR é acompanhado pelo remodelamento do sistema elástico, de modo tal que a frequência de fibrilas com elastina (elásticas e elaunínicas) é menor do que nos animais normotensos tanto no perimísio como no endomísio. Além disso, há um aumento na frequência de fibras oxitalânicas (praticamente inelásticas) nestas localizações, o que leva a um comprometimento da capacidade elástica do tecido.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts B, Julian Lewis AJ, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 4ª edição. New York: Garland Science; 2002.
- Anversa P, Loud AV, Vitali-Mazza L. Morphometry and autoradiography of early hypertrophic changes in the ventricular myocardium of adult rat. An electron microscopic study. *Lab Invest*. 1976; 35: 475-83.
- Arribas SM, Hinek A, González MC. Elastic fibers and vascular structure in hypertension. *Pharmacology & Therapeutics*. 2006; 111: 771–91.
- 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*. 1999; 340 (Pt1): 171-81.
- Badeer HS. Biological significance of cardiac hypertrophy. *Am J Cardiol*. 1964; 14: 133-8.
- Battig CG, Low FN. The ultrastructure of human cardiac muscle and its associated tissue space. *American Journal of Anatomy*. 1961; 108 (2): 199-229.
- Bidouard JP, Duval N, Kapui Z, Herbert JM, O'Connor SE, Janiak P. An elastase inhibitor, reduces myocardial infarct size following ischemia-reperfusion injury. *Eur J Pharmacol*. 2003; 461(1): 49-52.
- Birk DE, Fitch JM, Babiarz JP, Doane KJ, Linsenmayer TF. Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. *J Cell Sci*. 1990; 95 (Pt 4):649-57.
- Böck P, Stockinger L. Light and electron microscopic identification of elastic, elaunin and oxytalan fibers in human tracheal and bronchial mucosa. *Anat Embryol (Berl)*. 1984; 170(2): 145-53.
- Böck P. Histochemical demonstration of disulfide-groups in the lamina propria of human seminiferous tubules. *Anat Embryol (Berl)*. 1978; 153(2): 157-66.
- Borg TK, Caulfield JB. The collagen matrix of the heart. *Fed Proc*. 1981; 40(7): 2037-41.
- Borg TK, Gay RE, Johnson LD. Changes in the distribution of fibronectin and collagen during development of the neonatal rat heart. *Coll Relat Res*. 1982; 2(3): 211-8.
- Bradamante Z, Svajger A. Pre-elastic (oxytalan) fibres in the developing elastic cartilage of the external ear of the rat. *J Anat*. 1977; 123(Pt 3): 735-43.
- Brasil. Ministério da Saúde. Vigilância de fatores de risco para doenças crônicas. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2012.
- Brilla CG, Janicki JS, Weber KT. Impaired diastolic function and coronary reserve in genetic hypertension. Role of interstitial fibrosis and medial thickening of intramyocardial coronary arteries. *Circ Res*. 1991; 69: 107-15.
- Brilla CG, Maisch B, Weber K. Myocardial collagen matrix remodelling in arterial hypertension. *Eur Heart J*. 1992; 13 Suppl D, 24-32.

- Briones AM, Arribas SM, Salaices M. Role of extracellular matrix in vascular remodeling of hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2010; 19(2): 187-94.
- Brooke BS, Bayes-Genis A, Li DY. New insights into elastin and vascular disease. *Trends Cardiovasc Med*. 2003; 13(5): 176-81.
- Brown MJ. The causes of essential hypertension. *Br J Clin Pharmacol*. 1996; 42(1):21-7.
- Burlew B, Weber KT. Connective tissue and the heart. Functional significance and regulatory mechanisms, *Cardiol. Clin*. 2000; 18: 435-42.
- 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*. 1990; 139: 341-48.
- Carvalho Filho ET, Carvalho CA, Souza RR. Age-related changes in elastic fibers of human heart. *Gerontology*. 1996; 42: 211-7.
- Caulfield JB, Bittner V. Cardiac matrix alterations induced by adriamycin. *Am J Pathol*. 1988; 133(2): 298-305.
- Caulfield JB, Borg TK. The collagen network of the heart. *Laboratory Investigation*. 1979; 40: 364-72.
- Chakraborty A, Eghbali M. Collagenase activity in the normal rat myocardium. An immunohistochemical method. *Histochemistry*. 1989; 92(5): 391-6.
- Chan TO, Rittenhouse SE, Tsichlis PN. Akt/PKB and other D3 phosphoinositides - regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu Rev Biochem*. 1999; 68: 965-1014.
- Chancey AL, Brower GL, Peterson JT, Janicki JS. Effects of matrix metalloproteinase inhibition on ventricular remodeling due to volume overload. *Circulation*. 2002; 105(16): 1983-8.
- Cheng XW, Obata K, Kuzuya M, Izawa H, Nakamura K, Asai E, Nagasaka T, Saka M, Kimata T, Noda A, Nagata K, Jin H, Shi GP, Iguchi A, Murohara T, Yokota M. Elastolytic cathepsin induction/activation system exists in myocardium and is upregulated in hypertensive heart failure. *Hypertension*. 2006; 48: 979-87.
- Chobanian AV, Hill M. National Heart, Lung, and Blood Institute Workshop on Sodium and Blood Pressure: a critical review of current scientific evidence. *Hypertension*. 2000; 35(4): 858-63.
- Corda S, Mebazaa A, Gandolfini MP, Fitting C, Marotte F, Peynet J, Charlemagne D, Cavaillon JM, Payen D, Rappaport L, Samuel JL. Trophic effect of human pericardial fluid on adult cardiac myocytes. Differential role of fibroblast growth factor-2 and factors related to ventricular hypertrophy. *Circ Res*. 1997; 81: 679-87.
- Corda S, Samuel JL, Rappaport L. Extracellular matrix and growth factors during heart growth. *Heart Fail Rev*. 2000; 5(2): 119-30.
- Cotta-Pereira G, Del-Caro LM, Montes GS. Distribution of elastic system fibers in hyaline and fibrous cartilages of the rat. *Acta Anat (Basel)*. 1984; 119(2): 80-5.
- Cotta-Pereira G, Guerra Rodrigo F, Bittencourt-Sampaio S. Oxytalan, elaunin, and elastic fibers in the human skin. *J Invest Dermatol*. 1976; 66(3): 143-8.

- Creemers EE, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen MJ. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ Res*. 2001; 89: 201-10.
- Dietz HC, Mecham RP. Mouse models of genetic diseases resulting from mutations in elastic fiber proteins. *Matrix Biology*. 2000; 19(6): 481-8.
- Díez J, Panizo A, Gil MJ, Monreal I, Hernández M, Pardo Mindán J. Serum markers of collagen type I metabolism in spontaneously hypertensive rats: relation to myocardial fibrosis. *Circulation*. 1996; 93: 1026-32.
- Doggrell SA, Brown L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res*. 1998; 39(1):89-105.
- Dougherty AH, Naccaretti GV, Gray EL, Hicks CH, Galdstan RA. Congestive heart failure with normal systolic function. *Am J Cardiol*. 1984; 54(7): 778-82.
- Eghbali M, Blumenfeld OO, Seifter S, Buttrick PM, Leinwand LA, Robinson TF, Zern MA, Giambrone MA. Localization of types I, III and IV collagen mRNAs in rat heart cells by in situ hybridization. *J Mol Cell Cardiol*. 1989; 21(1):103-13.
- Fard A, Wang CY, Takuma S, Skopicki HA, Pinsky DJ, Di Tullio MR, Homma S. Noninvasive assessment and necropsy validation of changes in left ventricular mass in ascending aortic banded mice. *J Am Soc Echocardiogr*. 2000; 13(6): 582-7.
- Farquharson C, Robins SP. The distribution of elastin in developing and adult rat organs using immunocytochemical techniques. *J Anat*. 1989; 165:225-36.
- Fawcett, DW. *Tratado de histologia Bloom-Fawcett*. Madrid:Interamericana-McGraw-Hill. 1987.
- Fedak PW, Verma S, Weisel RD, Skrtic M, Li RK. Cardiac remodeling and failure: from molecules to man (Part III). *Cardiovasc Pathol*. 2005; 14: 109-19.
- Fenoglio JJ Jr, Wagner BM. Studies in rheumatic fever. VI. Ultrastructure of chronic rheumatic heart disease. *Am J Pathol*. 1973; 73(3): 623-40.
- Ferraz-de-Carvalho CA, Liberti EA. The membranous part of the human interventricular cardiac septum. *Surg Radiol Anat*. 1998; 20: 13- 21.
- Ferreira JMC, Caldini EG, Montes GS. Distribution of elastic system fibers in the peripheral nerves of mammals. *Acta Anat*. 1987; 130: 168-73.
- Fidziańska A, Bilińska ZT, Walczak E, Witkowski A, Chojnowska L. Autophagy in transition from hypertrophic cardiomyopathy to heart failure. *J Electron Microsc (Tokyo)*. 2010; 59(2): 181-3.
- 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*. 1997; 272(36): 22817-23.
- Fleischmajer R, Kuroda K, Hazan R, Gordon RE, Lebwohl MG, Sapadin AN, Unda F, Iehara N, Yamada Y Basement membrane alterations in psoriasis are accompanied by epidermal overexpression of MMP-2 and its inhibitor TIMP-2. *J Invest Dermatol*. 2000; 115(5): 771-7.
- Franchini KG. Hipertrofia cardíaca: mecanismos moleculares. *Rev Bras Hipertens*. 2001; 8: 125-42.
- Frank JS, Langer GA. The myocardial interstitium: its structure and its role in ionic exchange. *The Journal of Cell Biology*. 1974; 60: 586-601.

- Frohlich ED, González A, Díez J. Hypertensive left ventricular hypertrophy risk: beyond adaptive cardiomyocytic hypertrophy. *J Hypertens*. 2011; 29(1): 17-26.
- Fullmer HM, Lillie RD. The oxytalan fiber: a previously undescribed connective tissue fiber. *J Histochem Cytochem*. 1958; 6(6): 425-30.
- Gerli R, Ibba L, Fruschelli C. A fibrillar elastic apparatus around human lymph capillaries. *Anat Embryol (Berl)*, 1990; 181(3): 281-6.
- Gibson MA, Cleary EG. The immunohistochemical localization of microfibril-associated glycoprotein (MAGP) in elastic and non-elastic tissues. *Immunol Cell Biol*. 1987; 65 (Pt 4): 345-56.
- 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*. 1998; 46(8): 871-86.
- 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*. 2008; 383: 1171-80.
- 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*. 1985; 17(4): 441-50.
- Goldstein MANN, Schroeter JP. Ultrastructure of the heart. In: *Handbook of Physiology - The Heart*. American Physiological Society. 2002
- Graham HK, Horn M, Trafford AW. Extracellular matrix profiles in the progression to heart failure. European Young Physiologists Symposium Keynote Lecture- Bratislava *Acta Physiol (Oxf)*. 2008; 194(1): 3-21.
- Grossman W, Jones D, McLaurin LP. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest*. 1975; 56(1): 56-64.
- Gundersen HJ. Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson. *J Microsc*. 1986, 143: 3-45.
- Gundersen HJ. The smooth fractionator. *J Microsc*. 2002; 207: 191-210.
- Hammond EH, Yowell RL. Ultrastructural findings in cardiac transplant recipients. *Ultrastruct Pathol*. 1994; 18(1-2): 213-20.
- Hsueh WA, Law RE, Do YS. Integrins, adhesion, and cardiac remodeling. *Hypertension*. 1998; 31: 176-80.
- Hunter P, Borg T. Integration from proteins to organs: the Physiome Project. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003; 4: 237-43.
- Jalil JE, Doering CW, Janicki JS, et al. Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle. *Circ Res*. 1989; 64: 1041-50.
- Jane-Lise S, Corda S, Chassagne C, Rappaport L. The Extracellular Matrix and the Cytoskeleton in Heart Hypertrophy and Failure. *Heart Failure Reviews*. 2000; 5: 239-50.
- Janicki JS, Brower GL. The role of myocardial fibrillar collagen in ventricular remodeling and function. *J Card Fail*. 2002; (6S): S319-25.

- Janicki JS. Myocardial collagen remodeling and left ventricular diastolic function. *Braz J Med Biol Res.* 1992;25(10):975-82.
- 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.* 2007; 293: 3379-87.
- Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J.* 1979; 11(4): 447-55.
- Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica* 11^a.edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.
- Junqueira LC, Montes GS. Biology of collagen-proteoglycan interaction. *Arch Histol Jpn.* 1983; 46(5):589-629.
- Kadler KE, Baldock C, Bella J, Boot-Handford RP. Collagens at a glance. *J Cell Sci.* 2007; 120(Pt12):1955-8.
- Kaplan NM. Primary hypertension: pathogenesis. In: Kaplan NM. *Clinical Hypertension*. Baltimore: Williams & Wilkins. 41-99, 1998.
- Khoshnoodi J, Pedchenko V, Hudson BG. Mammalian collagen IV. *Microsc Res Tech.* 2008; 71 (5): 357-70.
- 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.* 2002; 357(1418): 207-17.
- Knupp C, Pinali C, Munro PM, Gruber HE, Sherratt MJ, Baldock C, Squire JM. Structural correlation between collagen VI microfibrils and collagen VI banded aggregates. *J Struct Biol.* 2006; 154(3):312-26.
- Kokubo M, Uemura A, Matsubara T, Murohara T. Noninvasive evaluation of the time course of change in cardiac function in spontaneously hypertensive rats by echocardiography. *Hypertens Res.* 2005; 28(7): 601-9.
- Krishnaswami H, Date A, Bhaktaviziam A, Krishnaswami S, Cherian G. Electron microscopic changes in tropical endomyocardial fibrosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1984; 78(2): 205-8.
- Kurtz T, Montano M, Chan L, Kabra P. Molecular evidence of genetic heterogeneity in Wistar-Kyoto rats: implications for research with the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension.* 1989; 13: 188-92.
- Lee B, Godfrey M, Vitale E, Hori H, Mattei MG, Sarfarazi M, Tsipouras P, Ramirez F, Hollister DW. Linkage of Marfan Syndrome and a phenotypically related disorder to two different fibrillin genes. *Nature.* 1991; 25;352(6333): 330-4.
- Lee HY e Oh BH. Aging and arterial stiffness. *Circulation Journal.* 2010; 44(11): 2257-62.
- 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.* 2001; 34: 927-40.

- Macchiarelli G, Ohtani O, Nottola SA, Stallone T, Camboni A, Prado IM, Motta PM. A micro-anatomical model of the distribution of myocardial endomysial collagen. *Histol Histopathol.* 2002;17(3):699-706.
- MacKenna DA, Omens JH, Covell JW. Left ventricular perimysial collagen fibers uncoil rather than stretch during diastolic filling. *Basic Res Cardiol.* 1996; 91: 111-22.
- Mamuya WS, Brecher P. Fibronectin expression in the normal and hypertrophic rat heart. *J Clin Invest.* 1992; 89: 392-401.
- McLenachan JM, Dargie HJ. Ventricular arrhythmias in hypertensive left ventricular hypertrophy. Relationship to coronary artery disease, left ventricular dysfunction, and myocardial fibrosis. *Am J Hypertens.* 1990; 3(10): 735-40.
- Mecham RP, Heuser J. Three-dimensional organization of extracellular matrix in elastic cartilage as viewed by quick freeze, deep etch electron microscopy. *Connect Tissue Res.* 1990; 24(2): 83-93.
- Mendez J, Keys A. Density and composition of mammalian muscle. *Metabolism.* 1961; 9: 184-8.
- Messerli FH. TIMPs, MMPs and cardiovascular disease. *Eur Heart J.* 2004; 25(17):1475-6.
- Milewicz A, Mikulski E, Bidzińska B. Plasma insulin, cholecystokinin, galanin, neuropeptide Y and leptin levels in obese women with and without type 2 diabetes mellitus. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000; 24 Suppl 2:152-3.
- Mizuhira V, Futaesaku Y. New fixation method for biological membranes using tannic acids. *Acta Histochem. Cytochem.* 1972; 5: 233-6.
- Mizuno T, Mickle DA, Kiani CG, Li RK. Overexpression of elastin fragments in infarcted myocardium attenuates scar expansion and heart dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; 288(6): H2819-27.
- Montes GS. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol Int.* 1996; 20: 15-27.
- Monti RJ, Roy RR, Hodgson JA, Edgerton VR. Transmission of forces within mammalian skeletal muscles. *J Biomech.* 1999; 32: 371-80.
- Mori T, Chen YF, Feng JA, Hayashi T, Oparil S, Perry GJ. Volume overload results in exaggerated cardiac hypertrophy in the atrial natriuretic peptide knockout mouse. *Cardiovasc Res.* 2004; 61(4):771-9.
- Morita T, Shimada T, Kitamura H, Nakamura M. Demonstration of connective tissue sheaths surrounding working myocardial cells and Purkinje cells of the sheep moderator band. *Arch Histol Cytol.* 1991; 54: 539-50.
- Mujumdar VS, Tyagi SC. Temporal regulation of extracellular matrix components in transition from compensatory hypertrophy to decompensatory heart failure. *J Hypertens.* 1999; 17(2): 261-70.
- 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.* 2006; 290: 323-30.
- 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*. 2004; 287(1): H286-92
- Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rat. *Jap Circ J*. 1963; 27: 282-93.
- Organização Mundial da Saúde. Novos dados da incidência da hipertensão e diabetes. Genebra: OMS; 2012.
- Parry DAD, Craig AS. Collagen fibrils during development and maturation and their contribution to the mechanical attributes of connective tissue. In: Nomni ME. Collagen. Vol II. Boca-Raton, CRC Press, 1-23, 1988.
- Perkins OC, Miller AM. Elastic tissue of the heart in advancing age. *Am J Anat*. 1927, 39(2): 205-17.
- Pimenta E. Estímulos para o desenvolvimento da hipertrofia ventricular esquerda. *Rev Bras Hipertens*. 2008; 15(2): 66-70.
- Pinto YM, Paul M, Ganten D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovasc Res*. 1998; 39(1): 77-88.
- Pratt B., Curci J. Arterial elastic fiber structure. Function and potential roles in acute aortic dissection. *J. Cardiovasc. Surg*. 2010; 51(5): 647-56.
- Rabinowitz M, Zak R. Mitochondria and cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 1975; 36: 367-76.
- Ramirez F, Dietz HC. Fibrillin-rich microfibrils: Structural determinants of morphogenetic and homeostatic events. *J Cell Physiol*. 2007; 213(2): 326-30.
- Reynolds JJ, Meikle MC. The functional balance of metalloproteinases and inhibitors in tissue degradation: relevance to oral pathologies. *J R Coll Surg Edinb*. 1997; 42(3): 154-60.
- 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*. 1983; 49: 482-97.
- Robinson TF, Cohen-Gould L, Remily RM, Capasso JM, Factor SM. Extracellular structures in heart muscle *Adv. Myocardio*. 1985 5: 243-55.
- 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*. 1987; 49: 247-55.
- Ross R, Bornstein P. The elastic fiber. I. The separation and partial characterization of its macromolecular components. *J Cell Biol*. 1969; 40(2): 366-81.
- Ross R, Fialkow RJ, Altman LK. The morphogenesis of elastic fibers. *Adv Exp Med Biol*. 1977; 79: 7-17.
- Rossi M, Marin-Neto J, Uchida E, Ramos S. Basement membrane thickening in small intramyocardial vessels in eosinophilic myocarditis. *Acta Cardiol*. 1996; 51(3):271-7.
- Rossi MA. Pathologic fibrosis and connective tissue matrix in left ventricular hypertrophy due to chronic arterial hypertension in humans. *J Hypertens*. 1998; 16(7): 1031-41.
- Sage H, Gray WR. Studies on the evolution of elastin I. Phylogenetic distribution. *Comp Biochem Physiol B*. 1979; 64(4): 313-27.

- Sakai LY, Keene DR, Engvall E. Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. *J Cell Biol.* 1986; 103(6Pt1): 2499-509.
- Sakai T, Lund-Hansen T, Paborsky L, Pedersen AH, Kisiel W. Binding of human factors VII and VIIa to a human bladder carcinoma cell line (J82). Implications for the initiation of the extrinsic pathway of blood coagulation. *J Biol Chem.* 1989; 264(17):9980-8.
- Sanchez JA, Milei J, Yu ZX, Storino R, Wenthold R Jr, Ferrans VJ. Immunohistochemical localization of laminin in the hearts of patients with chronic chagasic cardiomyopathy: relationship to thickening of basement membranes. *Am Heart J.* 126(6): 1392-401, 1993.
- Scheinowitz M, Kotlyar A, Zimand S, Ohad D, Leibovitz I, Bloom N, Goldberg I, Nass D, Engelberg S, Savion N, Eldar M. Basic fibroblast growth factor induces myocardial hypertrophy following acute infarction in rats. *Exp Physiol.* 1998; 3: 585-93,.
- Shapiro SD, Campbell EJ, Welgus HG, Senior RM. Elastin degradation by mononuclear phagocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 1991; 624: 69-80.
- 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.* 2001; 32(2): 185-200.
- Shirwany A, Weber KT. Extracellular matrix remodeling in hypertensive heart disease. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 48(1):97-8.
- Sokabe M, Sachs F. Stretch-activated ion channels and membrane mechanics. *Neurosci Res Suppl.* 1990, 12: S1-4.
- Sonoda Y, Watanabe S, Matsumoto Y, Aizu-Yokota E, Kasahara T. FAK is the upstream signal protein of the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt survival pathway in hydrogen peroxide-induced apoptosis of a human glioblastoma cell line. *J Biol Chem.* 1999; 274(15): 10566-70.
- Souza A, Montes GS, Villela BT, 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 Otol Rhinol (Bord).* 1991; 112(1): 7-10.
- Souza RR. Aging of myocardial collagen. *Biogerontology.* 2002; 3: 325-35.
- Speiser B, Riess CF, Schaper J. The extracellular matrix in human myocardium: Part I: Collagens I, III, IV, and VI. *Cardioscience.* 1991; 2: 225-32.
- Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev.* 2007; 87: 1285-342.
- St Lezin E, Simonet L, Pravenec M, Kurtz T. Hypertensive strains and normotensive 'control' strains. How closely are they related? *Hypertension.* 1992; 19: 419-24.
- Streeten BW, Licari PA. The zonules and the elastic microfibrillar system in the ciliary body. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1983; 24(6): 667-81.
- Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev.* 1999; 79: 215-62.
- Thalman I. Collagen of accessory structures of organ of Corti. *Connect Tissue Res.* 1993; 29 (3): 191-201.

- Ushiki T. Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. *Arch Histol Cytol.* 2002; 65(2): 109-26.
- Varo N, Iraburu MJ, Varela M, López B, Etayo JC, Díez J. Chronic AT(1) blockade stimulates extracellular collagen type I degradation and reverses myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2000; 35: 1197-202.
- Vliegen HW, Eulderink F, Bruschke AV, van der Laarse A, Cornelisse CJ. Polyploidy of myocyte nuclei in pressure-overloaded human hearts: a flow cytometric study in left and right ventricular myocardium. *Am J Cardiovasc Pathol.* 1995; 5: 2731-42.
- Vracko R, Benditt EP. Manifestations of diabetes mellitus-their possible relationships to an underlying cell defect. A review. *Am J Pathol.* 1974; 75(1): 204-24.
- Weber KT, Brilla CG. Structural basis for pathologic left ventricular hypertrophy. *Clin Cardiol.* 1993; 16(5 Suppl 2):II10-4.
- Weber KT, Janicki JS, Shroff SG, Pick R, Chen RM, Bashey RI. Collagen remodeling of the pressure-overloaded, hypertrophied nonhuman primate myocardium. *Circ Res.* 1988; 62(4):757-65.
- Weber KT. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol.* 1989; 13(7):1637-52.
- Weber KT. Fibrosis and hypertensive heart disease. *Curr Opin Cardiol.* 2000; 15: 264-72.
- Weber KT. Targeting pathological remodeling: concepts of cardioprotection and reparation. *Circulation.* 2000; 102(12):1342-5.
- Wenstrup RJ, Florer JB, Davidson JM, Phillips CL, Pfeiffer BJ, Menezes DW, Chervoneva I, Birk DE. Murine model of the Ehlers-Danlos syndrome. col5a1 haploinsufficiency disrupts collagen fibril assembly at multiple stages. *J Biol Chem.* 2006; 281(18):12888-95.
- 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.* 2008; 135: 183-92.
- Wilson EM, Spinale FG. Myocardial remodeling and matrix metalloproteinases in heart failure: turmoil within the interstitium. *Ann Med.* 2001; 33: 623-34.
- Young MJ. Mechanisms of mineralocorticoid receptor-mediated cardiac fibrosis and vascular inflammation. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2008; 17: 174-80.