

Luciano de Figueiredo Borges

**Matriz extracelular na aorta ascendente humana:
quantificação morfométrica do colágeno em aortas
normais e análise topográfica da matrilisina,
estromelisina e plasmina em dissecções e aneurismas
não-inflamatórios**

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

Área de concentração: **Cardiologia**

Orientador: **Dr Paulo Sampaio Gutierrez**

São Paulo

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

"As pessoas que vencem neste mundo são as que procuram as circunstâncias de que precisam e, quando não as encontram, as criam."

George Bernard Shaw

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Paulo Sampaio Gutierrez, pela excelente orientação científica, pelo aprendizado em Patologia Cardiovascular e sobretudo pela amizade e respeito durante estes anos de convívio.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Jean-Baptiste Michel, diretor e chefe de pesquisa do INSERM U698 - Paris, grande cientista em Biologia Cardiovascular, que me proporcionou um grande aprendizado nessa área, meu muito obrigado pela excelente recepção em seu laboratório, pela amizade e por toda atenção a mim dedicada.

Ao Dr. Olivier Meilhac, pesquisador do INSERM U698 - Paris, pelo auxílio técnico-científico prestado ao desenvolvimento deste trabalho, mas sobretudo pela amizade e respeito.

Aos meus grandes amigos do INSERM U698 em Paris, Benoit Ho-Ti-Noe, Benjamin Richard, Silvana Mansilla e Ziad Touat, de fundamental importância em minha vida, por todo carinho, atenção, amizade e respeito.

À todos os colegas do *Institut de la Santé et de la Recherche Médicale* (INSERM) U698 – Paris – França por me acolherem de forma tão especial.

À equipe técnica do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Ambroise-Paré em Boulogne-Billancourt – França, pelo amparo durante o desenvolvimento desta pesquisa, meu muito obrigado a toda a equipe coordenada pela Profa. Dra. Brigitte Franc.

À coordenação de pós-graduação do Departamento de Cardiologia - HCFMUSP, Neusa, Juliana e Eva pelo profissionalismo, pelo carinho e disponibilidade.

À toda a equipe do Laboratório de Anatomia Patológica do InCor – HCFMUSP, coordenada pela Dra. Maria de Lourdes Higuchi, dela fazendo parte os médicos Mauro

Canzian, Léa Maria Macruz Ferreira Demarchi, Vera Demarchi Aiello, Jussara Bianchi Castelli e Luiz A. Benvenuti.

Às técnicas do LAP-InCor Solange Consorti e Adriana Psota, não somente pelo excelente auxílio técnico no preparo das lâminas histológicas mas sobretudo pela simpatia e amizade.

Ao Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a [Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior](#) (Capes) pelo suporte financeiro no desenvolvimento dessa tese.

À minha grande amiga e colega de doutorado Raquel Fagundes, pelos nossos momentos juntos ao longo desta trajetória, pela amizade, pelo companheirismo, pelo carinho e respeito.

À minha família, em especial aos meus pais, Rita e João Batista, meu eterno amor a eles que sempre com muito carinho e respeito me deram à oportunidade de ser eu.

Ao Miguel, companheiro, amigo em cada momento dessa jornada, obrigado pelo carinho, afeto e amor; minha eterna gratidão.

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização de mais uma etapa de minha vida.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. A aorta normal	01
1.1.1. A célula muscular lisa e sua matriz extracelular	02
1.1.2. Padrão fenotípico das células musculares lisas	04
1.2. Doenças da aorta	05
1.2.1. Aneurismas	05
1.2.2. Dissecções	06
1.2.3. Doenças associadas a aneurismas e dissecções	08
1.2.4. Alterações histopatológicas nos aneurismas e dissecções	11
1.3. A matriz extracelular	13
1.3.1. O sistema colágeno	14
1.3.1.1. Estrutura e biossíntese do colágeno	14
1.3.1.2. Heterogeneidade dos colágenos	15
1.3.2. O sistema elástico	17
1.3.2.1. Distribuição diferencial das fibras do sistema elástico	18
1.3.3. Glicosaminoglicanos e proteoglicanos	20
1.3.4. A degradação da matriz extracelular	22
1.3.4.1. As proteinases envolvidas na degradação e remodelação da matriz extracelular vascular	23
1.4. A matriz extracelular nas doenças da aorta	26
1.5. O acometimento preferencial da porção externa da túnica média	29
1.6. OBJETIVOS	31
2. CASUÍSTICA E MÉTODOS	32
2.1. Casuística	32
2.2. Métodos	33
2.2.1. Histoquímica	34
2.2.2. Imuno-histoquímica	34
2.2.3. Quantificação da área de colágeno na túnica média	36
3. RESULTADOS	37
3.1. A aorta normal	37
3.1.1. Histopatologia	37
3.1.2. Quantificação da área de colágeno na túnica média	37
3.1.3. Imuno-histoquímica	39
3.2. As aortas com aneurismas e dissecções	39
3.2.1. Histopatologia	39
3.2.2. Imuno-histoquímica	40

4. DISCUSSÃO	48
4.1. As proteases e a parede da aorta	48
4.2. O colágeno e a sua possível relação nas dissecções	52
5. CONCLUSÕES	54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ADENDO - Manuscrito	68

Summary

BORGES, LF. **Extracellular matrix in the human ascending aorta: morphometric quantification of collagen in normal aortas and topographic analysis of matrilysin, stromelysin and plasmin in dissections and non-inflammatory aneurysms.** São Paulo, 2006. [Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo].

Aneurysms and dissections of the ascending aorta are usually characterized by areas of smooth muscle cell disappearance and degradation of collagen and elastic fibers, both predominating in mucoid areas (cystic media degeneration), related to the accumulation of either isolated glycosaminoglycans or proteoglycans. In view of these morphological alterations, we explored the topography of matrix protease storage in these diseases. 5µm-thick sections of formalin-fixed, paraffin embedded human aortas were used to detect, by immunohistochemistry, the presence of MMP-3 (stromelysin), MMP-7 (matrilysin) and plasminogen/plasmin in the medial layer; in parallel, serial sections were stained with hematoxylin, eosin and Alcian blue (for mucoid material). Aortas from 8 patients with thoracic aortic aneurysms and 10 with acute dissection were analyzed. Cases particularly rich in mucoid content were selected. Additionally, 9 normal aortic fragments obtained at coronary artery bypass surgery were studied as controls. In all cases except controls, stromelysin and, most remarkably, matrilysin, accumulated in the areas of areas of mucoid degeneration, whereas plasmin/plasminogen was situated in the periphery of these regions. Outside these mucoid areas, MMP-3 was distributed throughout the media, mostly in the intercellular space. MMP-7 predominated in the external half of the media, presenting both an intra- and extracellular localization. The same pattern of distribution was seen in normal aortas, in the absence of mucoid areas. In contrast plasmin/plasminogen co-localized with remaining smooth muscle cells in the close vicinity of mucoid areas. Considering that matrilysin and stromelysin act on proteoglycans, and on other extracellular matrix molecules, these enzymes could be directly involved in aneurysms and dissections of the ascending aorta. Tissue cell-adsorbed plasminogen/plasmin could play a critical role in the conflict between the remaining smooth muscle cell compartment and the mucoid degeneration areas, participating in both smooth muscle disappearance and MMP activation.

Key words: aorta – aneurysms –extracellular matrix – metalloproteinases – plasmin – human - pathology

RESUMO

BORGES, LF. **Matriz extracelular na aorta ascendente humana: quantificação morfológica do colágeno em aortas normais e análise topográfica da matrilisina, estromelisina e plasmina em dissecções e aneurismas não-inflamatórios.** São Paulo, 2006. [Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo].

Aneurismas e dissecções da aorta ascendente são caracterizados por degradação das fibras elásticas e de colágeno e diminuição de células musculares lisas, predominantemente em áreas mucóides, as quais são relacionadas ao acúmulo de glicosaminoglicanos ou proteoglicanos. Tendo em vistas tais alterações, estudamos a topologia das metaloproteases nestas doenças. Cortes de 5µm de aortas, fixadas em fomol e embebidas em parafina, foram submetidos a reações imuno-histoquímicas para MMP-3 (estromelisina), MMP-7 (matrilisina) e plasminogênio/plasmina na camada média. Em paralelo, cortes de aortas foram submetidos a coloração pela hematoxilina e eosina e azul de Alcian (para material mucóide). Aortas de 8 pacientes com aneurisma de aorta torácica e 10 com dissecções agudas foram analisadas. Adicionalmente, 9 aortas normais foram estudadas como controle. Em todos os casos, MMP-3 e, mais expressivamente, MMP-7 apresentaram marcação dentro dos acúmulos mucóides. Em contrapartida, a marcação para plasmina/plasminogênio situou-se ao redor deles. Fora dessas áreas, a MMP-3 mostrou distribuição intra e extracelular, a MMP-7 apresentou marcação intra e extracelular predominante na segunda metade da túnica média, e plasmina/plasminogênio teve co-localização com células musculares lisas. Considerando que matrilisina e estromelisina atuam sobre os proteoglicanos e sobre outros componentes da matriz extracelular, estas enzimas poderiam estar envolvidas diretamente na gênese dos aneurismas e dissecções da aorta ascendente, com possível modulação por plasminogênio/plasmina.

Palavras-chaves: aorta – aneurismas – matriz extracelular – metaloproteases – plasmina – humana – patologia

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Aorta Normal

O Sistema Cardiovascular tem como função principal transportar, através da corrente sangüínea, substâncias metabólicas até as células, nutrindo-as. O sangue, impulsionado pelo coração, chega até o nível celular através de uma complexa rede formada por: artérias, veias e capilares (VEINOT et al., 2001).

A parede dos vasos sangüíneos, à exceção dos capilares, é formada basicamente por 3 túnicas arranjadas em camadas concêntricas; a **túnica íntima**, formada pelo revestimento endotelial e por uma faixa subendotelial com algumas células musculares lisas e abundante matriz extracelular (MEC); a **túnica média**, demarcada pela presença de fibras elásticas, é formada por células musculares lisas, fibras de colágeno e do sistema elástico e proteoglicanos e glicosaminoglicanos; e a **túnica adventícia**, com colágeno, fibroblastos e tecido adiposo, além de pequenos vasos e nervos nas artérias de grande calibre. A aorta é classificada como artéria *elástica*, por conter grande quantidade de fibras elásticas, em contraposição à maioria das artérias, chamadas *musculares* por terem células musculares lisas como seu mais abundante componente. As células musculares lisas, juntamente com a MEC que as circundam, são responsáveis pela integridade maior destas estruturas vasculares, permitindo que durante a sua distensão, devido à alta pressão com que o sangue sai do coração (sístole), ela possa retornar à sua posição inicial de relaxamento (diástole), sem sofrer danos em sua estrutura (ROBERT et al., 1995; RAINES, 2000; VEINOT et al., 2001).

A túnica média da aorta é formada por lamelas paralelas de lâminas elásticas, em meio às quais situam-se células musculares lisas, outros componentes

extracelulares do sistema elástico, colágeno e proteoglicanos. Os proteoglicanos, situados entre as lâminas elásticas, quase nunca ultrapassam a área delimitada pelas mesmas (DINGEMANS et al., 2000). WOLINSKY & GLACOV (1967) analisaram aortas de diversos mamíferos e mostraram haver relação entre o peso corpóreo e a tensão arterial das espécies, por um lado, e o número de lamelas por outro. Espécies com maior peso tendem a ter maior tensão arterial e maior número de lamelas. A tensão em cada unidade lamelar é relativamente constante e sua composição e espessura são aproximadamente uniformes. DINGEMANS e colaboradores (2000) observaram, em estudo de microscopia eletrônica de transmissão, que aortas humanas exibem cerca de 58 a 78 lamelas na túnica média, medindo aproximadamente 1,5 μ m de espessura cada e relataram uma aparente continuidade fibrilar entre essas lamelas atribuída por eles ao sistema elástico. No que tange à organização do colágeno, este se situa no espaço delimitado pelas lamelas, formando feixes de fibrilas orientados circunferencialmente e paralelamente ao maior eixo das células musculares lisas e lâminas elásticas.

Poucos trabalhos analisaram a ultra-estrutura tridimensional de aortas normais (McCULLAGH et al., 1980; SHIMADA et al., 1993; USHIKI & MURAKUMO, 1991) estes estudos não foram feitos em material humano.

1.1.1. A Célula Muscular Lisa e sua matriz extracelular

As células musculares lisas são tipicamente fusiformes. Dependendo da localização podem variar em tamanho, com comprimento de 20 μ m na parede dos vasos sanguíneos e de até 400-500 μ m no útero. O núcleo é centralizado e de forma alongada ou elíptica. Em cortes transversais apresentam perfil poligonal a arredondado, mas em secções longitudinais aparecem como feixes lineares.

Exceto nas junções comunicantes, as células musculares lisas são circundadas por uma lâmina basal. O espaço existente entre células musculares contíguas é preenchido por elementos da matriz extracelular.

A única capacidade funcional atribuída à célula muscular lisa durante muito tempo era sua habilidade de se contrair. No final da década de 60, começou-se a responsabilizar esse tipo de célula também pela síntese de compostos extracelulares (WISSLER, 1968).

Em torno às células musculares estão presentes *fibras de reticulina* (que contêm grandes quantidades de colágeno tipo III), algumas fibras do sistema elástico, proteoglicanos e glicoproteínas estruturais como a fibronectina e laminina. Tais elementos da matriz são sintetizados pelas próprias células musculares.

O componente colágeno da matriz extracelular de células musculares lisas intestinais foi estudado histologicamente usando os métodos da impregnação argêntica, da picrossírius-polarização e microscopia eletrônica. Os resultados mostram, quase que exclusivamente, a presença de fibras de colágeno finas, fracamente birrefringentes e esverdeadas (quando estudado pelo método da picrossírius-polarização) que correspondem às fibras argirofílicas na impregnação argêntica. A microscopia eletrônica mostrou que essas fibras de colágeno são formadas por pequena quantidade de fibrilas finas. O conjunto desses achados permitiu concluir que o colágeno presente ao redor das células musculares lisas é predominantemente do tipo III, correspondendo às clássicas fibras de reticulina (MONTES et al., 1980).

No estudo de MONTES e colaboradores (1980) verificou-se que o proteoglicano associado às fibras de reticulina contém como glicosaminoglicano o heparam-sulfato, mostrando-se ainda que o colágeno tipo III interage com

quantidades razoáveis desta molécula, a qual em última análise é responsável pela impregnação das fibras pela prata.

1.1.2. Padrão fenotípico das células musculares lisas

Diferentemente dos outros tipos de tecido muscular, as células musculares lisas podem sofrer hiperplasia, sendo capazes de proliferar para manter ou aumentar o seu número. Elas podem sofrer mitoses em situações de injúria ou em processos controlados hormonalmente, como o da proliferação celular uterina durante o ciclo menstrual normal e a gestação. Do mesmo modo, as células musculares lisas dos vasos sanguíneos também têm capacidade de divisão no indivíduo adulto, repondo células danificadas ou senis; além disso, a proliferação de células musculares lisas foi apontada como um dos primeiros passos do processo que culmina no depósito de grandes quantidades de matriz extracelular na aterosclerose (ROSS & KLEBANOFF, 1971).

Estudos da parede de vasos ateroscleróticos têm demonstrado a existência de dois tipos de padrões fenotípicos de células musculares lisas. Um deles é o tipo contrátil, que é a célula muscular lisa típica presente em vasos normais. A outra população tem fenótipo secretor, com retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi bem desenvolvidos; aparece em casos de aterosclerose espontânea como também em modelos experimentais de indução. Estas células são hiper-responsivas para fatores de crescimento e de produção de matriz extracelular, enquanto que as células de fenótipo contrátil são hipo-responsivas a esses fatores e apresentam baixa capacidade de síntese de macromoléculas da matriz (YOSHIDA et al., 1988). Além disso, as células com fenótipo sintético são capazes de produzir elas mesmas alguns de tais fatores, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), de modo a

estabelecer um círculo vicioso para a progressão da lesão (CHAMLEY-CAMPBELL et al., 1981; THYBERG et al., 1983).

1.2. Doenças da aorta

As principais doenças que acometem a aorta são: a aterosclerose, os aneurismas, as dissecções e as aortites. Neste estudo abordaremos as dissecções agudas e os aneurismas não-inflamatórios da porção ascendente da aorta. Cabe ressaltar que as dissecções, em sua quase totalidade, são também desprovidas de processo inflamatório significativo.

1.2.1. Aneurismas

Aneurismas são dilatações circunscritas das artérias ou das câmaras cardíacas. A grande maioria dos aneurismas é encontrada na aorta. Os **aneurismas aórticos** são caracterizados por progressiva dilatação da parede desse vaso, envolvendo as três túnicas, podendo evoluir para uma ruptura. Quanto à forma, os aneurismas podem ser saculares (com boca estreita) ou fusiformes (dilatação de toda a circunferência de um segmento). Todos parecem ser consequência de perda da resistência da parede. O processo inicia-se por alterações estruturais da camada média que resultam em redução da resistência do vaso, provocando alongamento e tortuosidade da parede e dilatação da luz (VIRMANI R & BURKE, 2001).

No início, a dilatação é geralmente fusiforme. Pelas leis físicas, o aumento do diâmetro do vaso aumenta a tensão na parede (mesmo com pressão arterial constante), o que contribui para mais dilatação. Dilatação progressiva resulta em danos maiores, em certos pontos da parede, o que por sua vez provoca uma dilatação local mais acentuada em forma de saco, formando o aneurisma sacular. Os

aneurismas crescem lentamente, atingem volume considerável e podem comprimir, deslocar e destruir estruturas vizinhas; além disso, tendem a aumentar de tamanho até se romperem, provocando hemorragias(VIRMANI R & BURKE, 2001).

Os aneurismas da aorta podem ainda ser classificados em inflamatórios (ligados ou não à aterosclerose), situados mais comumente na aorta abdominal, e não-inflamatórios, que aparecem com maior freqüência na aorta ascendente.

Os aneurismas não-inflamatórios da aorta são comumente categorizados com "degenerativos". Parte dos pacientes são portadores de doenças genéticas conhecidas, como síndrome de Marfan e Ehlers-Danlos. Nos últimos anos, cada vez mais vêm-se detectando defeitos genéticos nesses pacientes, inclusive variantes das referidas doenças (PEREIRA & GUTIERREZ, 2004).

1.2.2. Dissecções

A **dissecção da aorta** consiste na delaminação de sua parede no sentido longitudinal. Cria-se, portanto, uma falsa luz, paralela à verdadeira, com extensão variável. Pode tomar apenas alguns centímetros, ou prolongar-se por todo o vaso e mesmo por seus principais ramos. A delaminação das camadas ocorre quase sempre entre os terços médio e externo da túnica média (LARSON & EDWARDS, 1984). A falsa luz criada é delimitada por fora apenas pela adventícia e fina faixa da média, e internamente pela íntima e grande parte da média. Assim, no segmento lesado, a porção que separa a luz falsa da verdadeira costuma ser mais espessa que a que serve de parede externa.

Ao exame externo, a dissecção determina um aumento da circunferência vascular, causado pela expansão de uma parte da parede, não do todo. Assim, difere dos aneurismas verdadeiros, em que a artéria se dilata por inteiro, ou seja, são

tomadas a íntima, a média e a adventícia. Considerando tais características, próprias da dissecção, tem sido pouco usada a denominação, ainda indexada e presente na Classificação Internacional de Doenças, de *aneurismas dissecantes*, anteriormente aplicada a elas.

A classificação feita por DEBAKEY e colaboradores (1965) para as dissecções aórticas é de utilização quase universal e baseia-se no local de origem e na extensão da delaminação. O tipo **I** é o que tem início na aorta ascendente e continua até a descendente; o tipo **II** restringe-se à porção ascendente da artéria; e o **III** começa na aorta torácica descendente ou na abdominal, às quais toma total ou parcialmente, mas pode também acometer retrogradamente a porção ascendente. Entre as necrópsias do Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto do Coração (GUTIERREZ & LOPES, 1994) o tipo I prevalece como sendo o mais comum. Embora a dissecção mais comumente se inicie na aorta ascendente (72,34%, soma dos casos de tipos I e II com um que especificava apenas tipo A), no total a porção mais atingida é a descendente (82,27%, soma dos casos de tipo I e III).

A respeito do trajeto descrito pelo sangue até atingir a falsa luz, no interior da camada média, vários trabalhos como os de HIRST et al (1958) e GORE & SEIWERT (1952), referem que em alguns casos não se encontra trajeto algum. Porém, na imensa maioria dos casos identifica-se um orifício que faz essa ligação, o chamado *orifício de entrada* ou *de dissecção* (LARSON & EDWARDS, 1984; WILSON & HUTCHINS, 1982). Seu tamanho pode ser pequeno, da ordem de um centímetro, mas em geral mede de quatro a seis centímetros e pode chegar a tomar toda a circunferência da aorta. Costuma ter bordas irregulares e ser aproximadamente linear, situando-se em posição transversal ou oblíqua ao eixo do vaso. Ele aparece com maior frequência dois a três centímetros acima do plano valvar aórtico, na parede posterior

da artéria. Seguem-se como sítio do orifício de entrada mais comuns o arco aórtico, a aorta torácica descendente e a aorta abdominal, nesta ordem. Com pequenas variações, esta, que foi a distribuição estipulada por HIRST et al. (1958), repete-se nas diferentes casuísticas, como por exemplo, as de ANAGNOSTOPOULOS et al. (1975) e ROBERTS (1982), e corresponde à experiência acumulada na rotina do Instituto do Coração (GUTIERREZ & LOPES 1994). Esses trabalhos mencionam também relatam a presença, muitas vezes, de mais de um orifício de entrada, próximos ou mesmo distantes uns dos outros.

Quando ocorre a dissecção, o sangue pode se dirigir a vários caminhos: voltar para a luz principal, extravasar para fora da artéria, continuar pelos ramos aórticos ou permanecer na luz falsa, com a dissecção terminando em fundo cego; neste caso, em geral há coagulação e forma-se um hematoma na camada média.

Sendo a capa externa da dissecção mais fina que a interna, a ruptura da aorta é bastante comum na evolução natural da doença. Faz-se através do orifício *de ruptura* ou *de saída*. Muitas vezes não é identificado, perdendo-se em meio ao hematoma formado com o extravasamento. Quando, por outro lado, não ocorre ruptura e a delaminação termina, o orifício pelo qual o sangue vai da falsa à verdadeira luz da aorta, finalizando a dissecção, é chamado de orifício de *reentrada*. Esse orifício é em geral único e pequeno, e é precedido por um pregueamento da lâmina superficial da parede arterial.

1.2.3. Doenças associadas a aneurismas e dissecções

Aneurismas e dissecções aórticas ocorrem geralmente em pacientes com afecções prévias do sistema cardiovascular (FUSTER & HALPERIN, 1994). A hipertensão arterial sistêmica, mutações genéticas que causam defeitos ligados à

matriz extracelular (notadamente a síndrome de Marfan e Ehler-Danlos tipo IV), valva aórtica bicúspide, envelhecimento, algumas doenças cardiovasculares congênitas, são processos citados como correlacionados a estas doenças (ANAGNOSTOPOULOS et al 1975; FUSTER & HALPERIN, 1994; DESANCTIS et al, 1987; PEREIRA & GUTIERREZ, 2004).

No caso das dissecções, a maioria apresenta hipertensão arterial sistêmica. A porcentagem de hipertensos entre os pacientes com dissecção varia entre as diferentes séries relatadas. Na de GORE & SEIWERT (1952) corresponde a 58%; na de WILSON & HUTCHINS (1982) a 69%. DESANCTIS et al (1987) em sua revisão relata variação entre 70 a 90%. Nota-se uma tendência a maior valorização da hipertensão quando o trabalho refere resultados de necrópsias (HIRST et al., 1958; GUTIERREZ & LOPES, 1994; DAILY et al., 1970). Isso se deve a que muitos pacientes, quando vêm a ser atendidos, encontram-se em choque hipovolêmico; se não houver história pregressa, ou condições de que a informação chegue ao médico atendente, não há como se estabelecer o diagnóstico. Já com as necrópsias pode-se somar aos casos que dispõem de dados clínicos de medida pressórica os achados morfológicos, em particular a hipertrofia concêntrica do ventrículo esquerdo e a nefrosclerose. Assim, chega-se a uma incidência em redor de 90% [89,58% nas necrópsias do InCor (GUTIERREZ & LOPES, 1994), 92% para HIRST et al. (1958)] de pacientes com hipertensão entre os que sofreram dissecção. Vale lembrar que, apesar disso, apenas uma pequena porcentagem, inferior a um por cento do total de hipertensos, vêm a apresentar dissecção. Embora a hipertensão seja doença comum, a dissecção não o é. Todavia, a gravidade desta última faz com que seja uma importante complicação da outra entidade.

Na síndrome de Marfan as lesões cardiovasculares são muito importantes, e a principal causa de óbito (ROBERTS & HONING, 1982; MCKUSICK, 1991). No espectro de alterações, destacam-se a insuficiência mitral, os aneurismas e as dissecções da aorta. Ressaltando a importância da hipertensão na gênese destas últimas, ROBERTS & HONING (1982), estudando 18 casos de síndrome de Marfan, encontraram a delaminação apenas em três, dois dos quais hipertensos. Entre os casos de necrópsia do Incor (GUTIERREZ & LOPES, 1994), 4 (2,78%) tinham tal anomalia, sendo que um era hipertenso.

Algumas doenças congênitas do sistema cardiovascular podem também se acompanhar de aneurisma e/ou dissecção aórtica. São elas a valva aórtica bicúspide e a coarctação da aorta que, por sua vez, guardam relação entre si (BURCHELL, 1955). ROBERTS (1982) considera mais uma vez o fator hipertensão, neste caso secundária à coarctação, invocando o fato de que quando há concomitância destas lesões aórticas, a separação das camadas costuma situar-se na região da proximal à coarctação, ou seja, aquela que está submetida aos níveis pressóricos mais elevados.

Por vezes, na dissecção, a delaminação da aorta acontece como complicação iatrogênica de cateterismo cardíaco ou de cirurgias que envolvem essa artéria. Também nessa situação, grande parte dos pacientes são hipertensos.

Embora a hipertensão arterial sistêmica seja fator de risco tanto para aterosclerose quanto para aneurismas e dissecções, estas últimas e os aneurismas da aorta ascendente em geral atingem aortas sem placas ou com aterosclerose leve ou moderada, e menos comumente com aterosclerose grave (GUTIERREZ & LOPES, 1994). Quando esta existe, a dissecção costuma acometer as áreas menos comprometidas por ela. Não é raro ver-se a dissecção terminar exatamente em uma placa aterosclerótica. A explicação para isso pode ser a mesma aventada para

fenômeno semelhante encontrado nos casos de sífilis. WILSON & HUTCHINS (1982) acreditam que as dissecções têm maior prevalência em pacientes portadores dessas doenças, mas seus dados, além de mostrarem diferença pequena (ainda que estatisticamente significativa) entre os grupos, estão em contraste com a maioria dos demais, como os do Instituto do Coração (GUTIERREZ & LOPES, 1994) e os de HIRST et al.(1958), ANAGNOSTOPOULOS et al. (1975) e BURCHELL (1955). A fibrose das lesões luéticas e ateroscleróticas poderia enrijecer a parede da aorta, dificultando sua clivagem no interior da camada média.

1.2.4. Alterações histopatológicas nos aneurismas e dissecções

A despeito de sua descrição ser já antiga, a patogenia dos aneurismas e dissecções aórticas não está ainda elucidada. No caso da dissecção, desde o fim da década de 1920 e início da seguinte, vários autores postulam que para que ela ocorra é necessária a existência de condições que levem a uma fragilidade da túnica média, tornando a artéria propensa à rasgadura (WILSON & HUTCHINS, 1982). O mesmo provavelmente se passa com o desenvolvimento dos aneurismas. Entretanto, não se conhece qual seria o substrato dessa fragilidade em nenhuma das duas afecções. A busca dessa resposta é dificultada pela inexistência de um bom modelo experimental e na, dissecção, pelas abruptas mudanças determinadas pela doença em si.

Um dos primeiros e mais importantes métodos de que se lançou mão para tentar explicar por que ocorrem estas doenças foi o exame microscópico. Nas dissecções, as principais descrições observadas foram citadas, entre outros, por BECKER (1975) e por GORE (1952). Há três achados principais: fragmentação das fibras elásticas; diminuição da população de células musculares lisas; e acúmulo de material mucóide, muitas vezes formando "cistos". À somatória dos dois últimos

achados, foi dado o nome de *necrose mediocística*, ainda que, segundo HIRST & GORE (1976), o próprio Erdheim admitisse que raramente se encontravam células necróticas nestas lesões. Por outro lado, apoptose já foi detectada em aortas com aneurismas e dissecções (NATAATMADJA et al., 2003). Além disso, a diminuição das células poderia assim ser em parte relativa, frente à expansão da matriz. Também não há cistos, pois o acúmulo de material mucóide não tem revestimento.

Alterações iguais foram encontradas nos aneurismas não-inflamatórios da aorta ascendente. No entanto, há casos de aneurismas e dissecções nos quais elas não são encontradas. Por outro lado, elas também são achados secundários em outras situações, tais como certas fases da aortite luética (BECKER, 1975), cardiopatias congênitas e envelhecimento natural (BURMAN, 1960), e mesmo achados incidentais em necrópsias diversas (ROTTINO, 1939). SCHLATMANN & BECKER (1977), através de métodos morfométricos, demonstraram que as alterações descritas aparecem com o envelhecimento normal e também em aortas de pacientes hipertensos mas que nunca chegaram a sofrer a dissecção ou desenvolver aneurismas. De todo modo, nota-se que o acúmulo mucóide é visto mais freqüentemente em aortas com dissecção e aneurismas. Mais importante, porém, é que o aspecto mucóide pode na verdade ser até certo ponto inespecífico, correspondendo a processos diversos. Deve-se, no entanto, realçar que essa "inespecificidade" diz respeito apenas ao aspecto histológico, havendo indícios de que os componentes depositados nas doenças enfocadas no presente trabalho, ainda não bem identificados, sejam distintos dos que se acumulam em outros processos. (GUTIERREZ et al 1991; GUTIERREZ et al 1998).

Vale lembrar que aneurismas e dissecções da aorta ascendente, ao contrário das outras doenças arteriais, incluindo aterosclerose e aneurismas abdominais, não apresentam número significativo de células inflamatórias envolvidas

(a não ser posteriormente, como parte da reparação tecidual). Assim, essas doenças representam uma situação bastante particular, em que as alterações da matriz são possivelmente mediadas apenas pelas próprias células musculares lisas.

1.3. A matriz extracelular

Colágenos e elastina são os principais constituintes da parede dos vasos sangüíneos. As propriedades biomecânicas dos vasos, particularmente das grandes artérias e veias, são largamente dependentes da quantidade desses dois constituintes principais da matriz extracelular (MEC) (JACOB et al 2001). Esta é definida como uma reunião supramolecular dos componentes estruturais dos tecidos conjuntivos, compreendendo colágenos, elastina, outras glicoproteínas e os proteoglicanos (SCHUPPAN & RUHL, 1994), sendo que a organização e distribuição desses compostos, juntamente com os elementos celulares, são responsáveis pelas características fisiológicas e estruturais de cada tecido (JUNQUEIRA & MONTES, 1983).

Os componentes fibrilares, a saber colágeno e elastina, são sintetizados principalmente pelos fibroblastos (HAY, 1981; ALBERTS et al., 1994) como também pelas células musculares lisas (MECHAM & HEUSER, 1991). Os feixes de colágeno, pelas suas características estruturais, respondem pelas qualidades mecânicas como sustentação tecidual (LINSENMEYER, 1991; MONTES, 1996) e interagem com outros componentes da MEC (JUNQUEIRA et al., 1980a; JUNQUEIRA & MONTES, 1983; HEINEGARD & OLDEBERG, 1989). A elastina e os proteoglicanos, através de propriedades distintas, dão elasticidade aos tecidos (ROSENBLOOM et al., 1993; MONTES, 1996). A MEC atua também em processos como proliferação, migração, adesão celular, diferenciação e morfogênese (BRENTANI, 1991; TOOLE, 1991; WIGHT, et al., 1992).

1.3.1. O sistema colágeno

1.3.1.1. Estrutura e Biossíntese do Colágeno

Apesar de particularidades funcionais e estruturais, os diversos tipos de colágeno têm estrutura química e organizacional semelhantes.

As moléculas de colágeno são formadas pela associação em tripla-hélice de 3 cadeias polipeptídicas alfa formando homo ou heteropolímeros, a depender do tipo de colágeno. Cada cadeia contém repetições de uma seqüência característica de aminoácidos, formada por Gly-X-Y, onde X e Y podem ser qualquer aminoácido, mas X é, freqüentemente, uma prolina e Y, uma hidroxiprolina sendo ambas glicosiladas. O colágeno é sintetizado no retículo endoplasmático rugoso de vários tipos celulares, de onde se deslocam até o complexo de Golgi, sendo aí empacotadas em vesículas que, através da ação de microfilamentos e microtúbulos, são translocadas até a superfície das células e abrem-se no meio extracelular.

Estas cadeias polipeptídicas sofrem processamentos enzimáticos no interior das células, tanto no retículo como no complexo de Golgi. Após a secreção, os processamentos enzimáticos continuam permitindo que essas moléculas se associem no espaço extracelular, constituindo fibrilas e fibras, ou formarem estruturas de textura fina que se dispõem na periferia das células, como as lâminas basais.

Ultra-estruturalmente, as fibrilas de colágeno mostram um padrão com periodicidade típica, quando se utilizam "colorações" negativas e/ou positivas. A análise deste padrão mostra períodos regulares "d" de 64-67 nm, constituídos por zonas claras e outras com maior densidade eletrônica. As moléculas de colágeno têm um comprimento total de 4,4 "D" e a periodicidade sugere que cada molécula está deslocada em 1/4 de seu comprimento em relação à molécula vizinha. A periodicidade

resulta de zonas de superposição completa de várias moléculas em uma fibrila, intercalada por zonas de superposição parcial.

A estrutura triplo-helicoidal do colágeno (como numa corda trançada) e as ligações covalentes intermoleculares no interior das fibrilas são responsáveis pela resistência à tensão que é característica do colágeno.

1.3.1.2. Heterogeneidade dos colágenos

O termo "colágeno" refere-se, na realidade, a uma família de macromoléculas estruturalmente semelhantes, porém geneticamente distintas. São glicoproteínas encontradas em todos os organismos pluricelulares do reino animal, desde os seres invertebrados até os mamíferos superiores, nos quais representa 25% do total das proteínas do corpo. O colágeno está presente já nos grupos primitivos de metazoários: as esponjas (*Porifera*) possuem pelo menos três tipos de colágeno (GARRONE et al., 1975).

Organismos individuais possuem diferentes tipos genéticos de colágeno, que se distribuem segundo um padrão tecidual específico, aparecendo durante o desenvolvimento de acordo com uma seqüência temporal. As diferenças nesses tipos de colágeno residem na composição primária de suas moléculas, no tipo de agregação extracelular e na capacidade de formarem ou não estruturas fibrilares.

Cada cadeia alfa é produto de um único gene e apresenta uma seqüência específica de aminoácidos. Já foram identificados cerca de 20 tipos diferentes de colágeno. Dependendo dos tipos das cadeias alfa que os compõem, os colágenos são designados como de tipos I a XX. Alguns destes apenas começam a ser conhecidos, enquanto outros têm sua estrutura e distribuição bem estabelecidas.

Há uma tendência em agrupá-los segundo suas capacidades de formar estruturas fibrilares intersticiais, compor as lâminas basais, ou formar delicadas tramas pericelulares, sendo distribuídos dentre os seguintes tipos:

1. As fibrilas, encontradas na maioria dos tecidos conjuntivos e formadas por agregados de colágenos dos tipos I, II, III, V e XI;

2. As lâminas de colágeno que constituem as membranas basais (tipo IV), membranas de Descemet na córnea do globo ocular (tipo VIII) e cutícula da derme e exoesqueleto das esponjas;

3. Os colágenos com tripla hélice interrompida (tipo IX, XII, XIV, XVI e XX), associados às fibrilas que parecem conectar as fibrilas aos outros elementos da matriz;

4. O colágeno tipo VII que se reúne em fibrilas de ancoragem que ligam a membrana basal epitelial a fibrilas de colágeno do estroma mantendo-as juntas;

5. O colágeno tipo VI que forma filamentos finos em contos que podem interagir com fibrilas e células (LINSENMAYER, 1991).

Os colágenos dos tipos I, II e III são os principais constituintes de fibrilas e fibras intersticiais que contém colágeno.

O colágeno do tipo I é o principal componente dos ossos, tendões, fáscias, cartilagens fibrosas, cápsulas dos órgãos, pele e dentina, aparecendo em menor quantidade no interstício dos órgãos parenquimatosos. É constituído por duas cadeias alfa-1 (I) e uma cadeia alfa-2 (I); forma fibrilas com 70 a 100nm de diâmetro e com a estriação característica bem evidente. Estas fibrilas formam fibras de 2 a 10nm de diâmetro, correspondentes às clássicas fibras colágenas da microscopia de luz (que podem se associar formando feixes de fibras) e aparecem principalmente em localizações sujeitas à tensões.

O colágeno do tipo II é encontrado em cartilagens elásticas e hialinas, no humor vítreo e no estroma da córnea de embriões. Não forma fibras e suas fibrilas apresentam-se mais delgadas que as do colágeno do tipo I (medindo de 20 a 30 nm de diâmetro). Sua molécula é um homotrímero das cadeias alfa-1 (II) e interage intensamente com os proteoglicanos da matriz extracelular. Esta interação é responsável, nas cartilagens, por sua resistência à pressão.

O colágeno do tipo III forma fibrilas de 35 a 55 nm de diâmetro, que compõem fibras de 0,5 a 1,5µm de diâmetro. Corresponde às fibras de reticulina vistas na microscopia de luz; aparece sempre co-distribuído com o colágeno tipo I e está presente em órgãos e tecidos que necessitam de um arcabouço estrutural maleável, como a pele, **vasos sanguíneos**, intestinos, baço, útero, fígado, pulmões e tecido muscular.

Durante os processos de reparo e nas fibroses em geral, o colágeno III é o primeiro a ser depositado, podendo mais tarde ser substituído pelo colágeno do tipo I (MARTINEZ-HERNANDEZ, 1988).

1.3.2. O sistema elástico

O sistema elástico é composto por fibras elásticas, fibras elaunínicas e fibras oxitalânicas. Ultra-estruturalmente, as fibras elásticas dos mamíferos apresentam-se formadas por abundante material amorfo e homogêneo (identificado como elastina) envolvendo por microfibrilas (com 10-12 nm de diâmetro) que, em corte transversal, exibem um perfil tubular (ROSS & BORNSTEIN, 1969).

Durante o desenvolvimento de uma fibra elástica, um simples feixe de microfibrilas surge primeiramente, tendo-se em seguida a deposição gradual do

componente amorfo entre as microfibrilas até que as fibras elásticas atinjam a maturação completa (FAHRENBACH et al., 1966).

Em determinadas regiões anatomicamente definidas foram encontrados, ao nível ultra-estrutural, somente feixes de microfibrilas livres de material amorfo (atualmente conhecidos com fibras oxitalânicas) em tecidos que, mesmo no estado maduro, não contêm fibras elásticas completamente desenvolvidas. Em outras localizações, mesmo em espécimes adultos, todos os animais estudados sempre apresentaram feixes de microfibrilas entremeados com grupos de material amorfo (este padrão corresponde ao aspecto ultra-estrutural das fibras elaunínicas) e que nunca dão origem a fibras elásticas completamente maduras. Estas observações mostraram que nem todos os feixes de microfibrilas são destinados a servir como molde para a deposição de elastina dando origem às fibras elásticas.

Assim um feixe de microfibrilas pode ser tanto um simples estadió de desenvolvimento de uma fibra elástica completamente madura (em tecidos fetais) como pode ser uma entidade independente, própria do tecido conjuntivo (as assim chamadas fibras oxitalânicas).

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

1.3.2.1. Distribuição diferencial das fibras do sistema elástico

Com relação à distribuição das fibras do sistema elástico, os tecidos não são estruturas homogêneas. Como estes últimos possuem características funcionais diferentes, não é de se surpreender que os componentes do tecido conjuntivo que são

encontrados em compartimentos distintos de diversos órgãos difiram qualitativamente e quantitativamente.

Sabe-se que as propriedades elásticas das fibras elásticas nos mamíferos dependem do seu componente amorfo, a elastina (ROSS & BORNSTEIN, 1969). Demonstrou-se que as fibras oxitalânicas, sendo compostas somente por microfibrilas sem elastina, não se alongam sob tensão mecânica (ROSS, 1973) e, portanto, atuam no sentido de impedir um estiramento das estruturas presentes nas regiões onde elas ocorrem (EDWARDS, 1968). O componente microfibrilar pode ter uma função de ancorar a elastina amorfa à matriz circundante (GIBSON & CLEARY, 1987).

Já foi descrito que a distribuição diferencial das fibras do sistema elástico coincide com a segregação de tipos estruturais distintos de colágeno em diferentes compartimentos de vários órgãos, a saber: pele (COTTA-PEREIRA et al., 1976; JUNQUEIRA et al., 1983a), nervos (FERREIRA et al., 1987), cartilagem hialina (COTTA-PEREIRA et al., 1984) e tendões (CALDINI et al., 1990). Assim, fibras elásticas maduras aparecem como um dos principais constituintes de tecidos conjuntivos que possuem propriedades elásticas, tais como o pulmão, os ligamentos elásticos e as paredes das artérias (no último exemplo ocorrem também lâminas elásticas fenestradas além das fibras elásticas).

As fibras oxitalânicas estão presentes em regiões onde o tecido conjuntivo está sujeito a tensões mecânicas tais como: no periodonto humano (FULLMER & LILLIE, 1958), na junção dermo-epidérmica (COTTA-PEREIRA et al., 1976), na zona ciliar (STREETEN & LICARI, 1983), e também no endoneuro (FERREIRA et al., 1987), na membrana basal espessa da traquéia e da mucosa bronquiolar humanas (BÖCK & STOCKINGER, 1984), na matriz interterritorial da cartilagem hialina (COTTA-PEREIRA et al., 1984), nos filamentos de ancoragem dos capilares linfáticos (BÖCK, 1978a;

GERLI et al., 1990), na lâmina própria dos túbulos seminíferos (BÖCK, 1978b) e na túnica média da aorta humana (Sambiase, 1992).

As fibras elaunínicas foram localizadas na interface entre a derme papilar e reticular (COTTA-PEREIRA et al., 1976), na região intermediária do "tendão elástico" do músculo eretor do pêlo em humanos (RODRIGO et al., 1975), nos anéis que rodeiam a porção secretora das glândulas sudoríparas écrinas (COTTA-PEREIRA et al., 1975), na camada condrogênica do pericôndrio nas cartilagens hialinas (COTTA-PEREIRA, et al., 1984), no epineuro de todos os nervos estudados (FERREIRA et al., 1987), na camada subepitelial da traquéia e da mucosa bronquiolar em humanos (BÖCK & STOCKINGER, 1984), na região intermediária do ligamento anular da articulação entre o estribo e a janela oval (SOUZA et al., 1991) e na túnica média da aorta humana (Sambiase, 1992).

1.3.3. Glicosaminoglicanos e proteoglicanos

Os proteoglicanos (PGs) podem situar-se na célula, particularmente na membrana ou, mais comumente, na matriz extracelular, sendo tidos como um dos principais componentes desta última, da qual ocupam grande parte do volume. Por não apresentar um constituinte fibrilar, foram denominados de *substância fundamental amorfa*. Sua estrutura mostra um "esqueleto" proteico que tem lateralmente ligações covalentes com cadeias de um tipo específico de polissacárides, os *glicosaminoglicanos (GAGs)* (YANAGISHITA, 1993; HARDINGHAM & FOSANG, 1992). Estes, por sua vez, são polímeros de carboidratos constituídos por resíduos alternados de hexosamina e de ácido urônico. Podem ser de vários subtipos, sulfatados ou não; os que tomam parte na composição dos PGs são sulfatados. São classificados conforme o tipo de ácido urônico (glucurônico ou hidurônico) e de

hexosamina (glucosamina ou galactosamina), a posição relativa dos sulfatos, a configuração dos açúcares e a posição relativa e tipo de ligações glicosídicas (DIETRICH, 1984). Os principais GAGs presentes no sistema vascular são o condroitin-sulfato, o dermatan-sulfato e o heparan-sulfato (WIGHT, 1989). Os GAGs aparecem em número que varia entre os diversos proteoglicanos. No *agrecan*, por exemplo, PG de cartilagem, há numerosas cadeias laterais; na *decorina*, um pequeno PG de distribuição mais variada entre os tecidos, uma única cadeia de glicosaminoglicano compõe o proteoglicano conjuntamente com a proteína. Oligossacárides, cadeias de carboidratos de menor tamanho, também situam-se lateralmente a proteoglicanos. Estes são ainda usualmente unidos a outras moléculas. Entre outras, juntam-se a um outro tipo de glicosaminoglicano, não sulfatado, chamado *hialuronan* (ou *ácido hialurônico*) (TOOLE, 1990).

Os PGs e o hialuronan unem-se a diversos tipos de colágeno, ao sistema elástico e a diversos outros componentes da matriz. Atraem também moléculas de água. Constituem assim uma trama que é o arcabouço da membrana basal e de todo o compartimento extracelular. Mais ainda, ligam-se também a receptores ou outras moléculas de membrana, tomando parte fundamental na continuidade entre os compartimentos intra e extracelular (DIETRICH, 1984).

Além de seu papel estrutural, uma grande série de atividades biológicas tem sido imputada aos proteoglicanos. Algumas são bem conhecidas, outras são hipóteses inferidas com base em sua seqüência de aminoácidos ou de sacarídeos. Tanto a porção protéica quanto os glicosaminoglicanos podem ser biologicamente ativos (TEMPLETON, 1992). Para citar exemplos com interesse em biologia vascular, os PG facilitam a internalização de lipoproteínas por macrófagos e células musculares lisas (VIJAYAGOPAL et al, 1993; RADHAKRISHNAMURTHY et al. 1990), atuam na

adesão celular (WIGHT, 1989) e regulam a atividade de citocinas (NIETFELD, 1993) e de fatores de crescimento (RUOSLAHTI & YAMAGUCHI, 1991).

1.3.4. A degradação da matriz extracelular

A renovação metabólica das fibras dos sistemas colágeno e elástico é relativamente baixa nos animais adultos, sendo que a degradação fisiológica do colágeno é ainda mais lenta que a da maioria das outras proteínas da MEC. Sua vida média é longa, podendo durar de poucas semanas a meses, dependendo do órgão considerado. A relação colágeno-elementos parenquimatosos é variável em diferentes órgãos e tecidos, porém em condições normais permanece relativamente constante durante a vida dos organismos. A manutenção desta proporção resulta de um equilíbrio delicado entre síntese e degradação (PÉREZ-TAMAYO, 1982).

Em certas situações ocorre um desequilíbrio na equação síntese/degradação, resultando em predomínio da deposição ou da degradação de colágeno. Durante a embriogênese, na remodelação de tecidos em crescimento, na involução do útero após o parto e em processos de reparo, há evidências bioquímicas e morfológicas de um aumento da atividade colagenolítica (GRILLO & GROSS, 1967; TEN CATE & DEPORTER, 1975; GROSS, 1981; HENELL et al., 1983).

Parte do colágeno sintetizado pelas células sofre degradação intracelular antes de ser secretado no meio extracelular. Calcula-se que, dependendo das condições, 10% a 60% do colágeno pode ser degradado antes de ser secretado (RENNARD et al., 1982). Esta degradação intracelular funciona como um mecanismo de modulação da deposição de colágeno e evita a secreção de moléculas defeituosas (isso é indicado pelo fato de que a indução experimental de formação de moléculas anômalas resulta em maior degradação intracelular) (TEN CATE & SYRBU, 1974).

Agentes que aumentam a concentração intracelular de AMPc induzem também um aumento da colagenólise intracelular, principalmente do colágeno do tipo I, regulando, de certa forma, a qualidade da matriz extracelular. A colagenólise intracelular ocorre, portanto, de um modo basal e fisiológico, porém pode ser aumentada por estímulos extracelulares, ou por drogas que bloqueiam os mecanismos de secreção de proteínas, como a colchicina e a citocalasina B (BIENKOWSKI, 1984). A degradação, nestas circunstâncias, envolve a participação dos lisossomos, com liberação de proteases (TEN CATE & SYRBU, 1974; HAY, 1991).

O colágeno é extremamente estável. Seu "turnover", necessário ao crescimento e remodelação dos tecidos, requer enzimas específicas para iniciar a degradação. Estas enzimas, conhecidas como colagenases, cortam a cadeia alfa em local bastante específico e limitado, promovendo a desnaturação da proteína. Uma vez que isso ocorra, enzimas proteolíticas não-específicas começam a agir e rapidamente a hidrolizam.

A elastina é muito estável e resiste à ação de proteases não-específicas como a tripsina (ela também resiste à fervura e à hidrólise por ácidos fracos ou bases). O "turnover" de elastina é muito lento na grande maioria dos órgãos, com período aproximadamente igual ao da própria vida do animal (SHAPIRO et al., 1991). Assim, sob condições normais, muito pouca substituição de fibras do sistema elástico ocorre em adultos (JACOB et al., 2001).

1.3.4.1. As proteinases envolvidas na degradação e remodelação da matriz extracelular vascular

As informações que se seguem podem ser encontradas na seguinte bibliografia: WILSON & MATRISIAN (1996); VISSE & NAGASE (2003); GALIS &

KHATRI (2002); MASSOVA et al. (1998); DOLLERY et al. (1995); NAGASE & WOESSNER (1999); JACOB et a. (2001); BIETH et al. (2001).

As enzimas que participam no processo de degradação e remodelação da matriz extracelular vascular são principalmente metaloproteinases (MMPs) e serinoproteinases. As metaloproteinases são uma família de proteases dependentes de cálcio e zinco.

Atualmente 28 metaloproteinases foram identificadas em humanos e agrupadas de acordo com o seu substrato em: *colagenases*, *gelatinases*, *estromelisinases*, *matrilisinases*, *metaloproteinases de membrana* e *outras metaloproteinases*; há ainda subgrupos que vêm sendo descritos mais recentemente, como as ADAMS (de "a desintegrin and metalloproteinase") e ADAMTS (família de ADAMS contendo seqüências polipeptídicas similares a de trombospondina).

As *colagenases* são assim denominadas pela sua capacidade de degradar a tripla hélice da molécula de colágenos intersticiais como os tipos I, II e III. Fazem parte deste grupo a MMP-1 (expressa em células endoteliais e células musculares lisas, sendo a principal enzima deste grupo), a MMP-8 (estocadas em grânulos dos neutrófilos) e MMP-13. As colagenases aparecem difusamente distribuídas nos tecidos e em áreas de contato entre as células e os elementos matriciais (GROSS, 1981), mesmo quando não há evidências de degradação da matriz, porém desaparecem progressivamente nos processos de fibrose evolutiva, indicando sua importância no equilíbrio entre síntese e degradação. A concepção amplamente aceita preconiza interações complexas entre as colagenases e seus inibidores e ativadores específicos (GROSS, 1981; MURPHY et al., 1985), que serão abordados em seguida.

As *gelatinases* atuam, sobretudo, em fragmentos já degradados pelas colagenases bem como sobre o colágeno tipo IV e elastina. Fazem parte deste grupo a

MMP-2 (expressa em células vasculares) e MMP-9 (expressa em macrófagos, polimorfonucleares e células vasculares).

As *estromelisin* degradam proteoglicanos como o agrecano, proteínas de ligação, fibronectina, laminina e os colágenos tipo III e IV. O nome *estromelisina* denota serem tais enzimas derivadas de células do estroma; hidrolizam a matriz extracelular e podem ser expressas em fibroblastos, condrócitos, células endoteliais, macrófagos e células musculares lisas vasculares. Fazem parte deste grupo a MMP-3 (estromelisina 1) e MMP-10 (estromelisina 2). Ambas têm especificidade de substrato semelhante, porém a MMP-3 apresenta uma eficiência proteolítica mais alta. Além de digerir componentes da MEC a MMP-3 também ativa outras metaloproteinases que se encontram ainda na forma inativa.

As *matrilisin* degradam versican, elastina, fibronectina, colágeno tipo IV entre outros. O nome matrilisina denota "lise" da MEC. Fazem parte deste grupo a MMP-7 (matrilisina 1) e MMP-26 (matrilisina 2). A MMP-7 é expressa principalmente em células epiteliais glandulares, mas também em monócitos e células da parede vascular. A MMP-26 é sintetizada durante a diferenciação do macrófago.

As *metaloproteinases de membrana* estão envolvidas na degradação de colágenos do tipo I, II e III, e são capazes de ativar algumas outras metaloproteinases da matriz, mas não apresentam referida atuação na parede vascular. Fazem parte deste grupo as MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 e MMP-25 sendo expressas em células do cerebelo, leucócitos do sangue periférico e células tumorais.

Sete são as metaloproteinases que não se classificam nestas categorias acima citadas. A principal delas é a MMP-12 (metaloelastase) expressa em macrófagos e responsável por digerir, sobretudo, a elastina, além de outras proteínas da MEC. As

outras metaloproteinases deste grupo são: MMP-19, MMP-20, MMP-22, MMP-23 e MMP-28.

Entre as serinoproteinases destacam-se a elastase de célula muscular lisa e a elastase leucocitária cujos inibidores são respectivamente elafina e alfa-2-macroglobulina. Outra serinoproteinase de alta importância é a plasmina, que será abordada em seguida, uma vez que toma importante função como ativador das MMPs.

A atividade proteolítica das MMPs pode ser regulada em 3 níveis: pelo controle da expressão gênica (regulação da transcrição), ativação das pro-enzimas e inibição direta por inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) ou outros inibidores como a α 2-macroglobulina.

Todas as metaloproteinases são sintetizadas na forma inativa sendo ativadas posteriormente, seja intra ou extracelularmente, sendo esta última situação a mais comum para todas as enzimas descritas até o momento.

A principal via de ativação *in vivo* das MMPs é o sistema do plasminogênio. A ativação das pró-MMPs se faz diretamente pela plasmina. O plasminogênio é convertido em plasmina (enzima ativa) pelo ativador de plasminogênio do tipo tecidual (t-PA) ou pelo ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (u-PA) que se encontram ligados a um receptor na membrana celular, receptor u-PA (u-PAR). As principais MMPs ativadas pela plasmina são proMMP-1, proMMP-3, proMMP-7, proMMP-9, proMMP-10 e proMMP-13. Uma vez ativadas elas podem participar da ativação de outras MMPs (COLLEN, 2001).

1.4. A matriz extracelular nas doenças da aorta

Não é inesperado que muitas modificações dos aneurismas e dissecções atinjam a MEC, visto que o espaço extracelular corresponde à maior parte da parede

aórtica. Cada um dos três maiores componentes que o ocupam desempenha um papel fisiológico relacionado à tensão arterial intermitente (pulsante): o colágeno dá sustentação mecânica (MAYNE, 1986; HAY, 1999); o sistema elástico a propriedade que seu nome indica (JACOB, 1993) e os grandes proteoglicanos, como o versican, respondem pela absorção das tensões sofridas durante a sístole, uma vez que estes funcionam com uma esponja diminuindo e aumentando seu volume (YANAGISHITA, 1993). Todos são sintetizados pelas células musculares lisas, principal tipo celular presente nas túnicas íntima e média.

As principais alterações histopatológicas observadas em aortas com aneurisma e dissecção envolvem componentes da matriz extracelular (MEC) - fragmentação das fibras elásticas e acúmulo extracelular de material mucóide, possivelmente constituído por proteoglicanos, talvez acompanhados por diminuição da população de células musculares lisas (GUTIERREZ & LOPES, 1994). Quanto ao colágeno – o outro componente da MEC presente em grande quantidade na aorta – chama atenção a presença de uma forma anômala, de conformação espiralada (ISHII & ASUWA, 2000). Este colágeno espiralado vem sendo ocasionalmente reportado na parede de vasos sanguíneos, sobretudo das grandes veias (ISHII & ASUWA, 1996; DINGEMANS *et al*, 2000). Em outras doenças vasculares como aterosclerose, síndrome de Marfan e arterite, este colágeno também está presente (GHADIALLY, 1997).

Tanto a fragmentação das fibras elásticas quanto a presença do colágeno espiralado foram atribuídas à ação de MMPs.

Recentemente, um aumento da expressão de algumas metaloproteinases foi relatado na porção ascendente de aortas com dissecção e aneurisma, quando comparadas àquelas normais. Na túnica média dessas aortas, a expressão das MMP-1, MMP-2 e MMP-9 encontravam-se aumentadas (ISHII & ASUWA, 2000; LESAUKAITE *et*

al, 2001; KOULLIAS et al, 2004). Em aneurismas de aorta ascendente já é bem conhecido o aumento da expressão de algumas metaloproteinases como MMP-2, MMP-9 e MMP-12 (JACOB et al, 2001; CURCI et al, 1998).

Em aneurismas da aorta torácica decorrentes da síndrome de Marfan foi verificado um aumento da expressão da MMP-2, bem como um aumento no processo de apoptose em células musculares lisas vasculares (NATAATMADJA et al, 2003). Já aqueles associados a valva aórtica bicúspide apresentaram também um aumento da expressão e atividade da MMP-9, além da MMP-2 (BOYUM et al., 2004). Tais fatos podem ter relação com a predisposição destes pacientes ao desenvolvimento de aneurismas. Nas regiões de acúmulo mucóide, nesta mesma condição patológica, Segura e colaboradores (1998) não encontraram aumento de nenhuma das metaloproteinases estudadas, sendo elas as MMP-1, MMP-2, MMP-3 e MMP-9; os autores, porém, verificaram aumento da expressão da MMP-2 e MMP-9 nas áreas ao redor das regiões de acúmulo mucóide.

Entretanto, não há nenhum estudo que tenha verificado a expressão da MMP-7 bem como das serinoproteinases (elastases) na parede da aorta em sua porção ascendente, de fundamental importância nos processos que envolvem remodelação vascular, uma vez que estas enzimas possuem ação direta sobre os proteoglicanos e as fibras elásticas.

Vários trabalhos têm demonstrado a ação da MMP-7 sobre os proteoglicanos, sobretudo o versican, principal tipo presente na parede dos vasos sanguíneos (THEOCHARIS et al., 2001; 2003; HALPERT et al., 1996). Halpert e colaboradores (1996) mostraram em lesões ateroscleróticas a co-localização da MMP-7 em sítios ricos em versican e verificaram que esta metaloproteinase tem a capacidade de degradar com maior eficiência esse proteoglicano que outras metaloproteinases

presentes na aorta, principalmente a MMP-3. Embora o versican não seja um proteoglicano formado por heparan-sulfato, um estudo feito em úteros mostrou uma ligação entre MMP-7 e este glicosaminoglicano, sugerindo que o heparan-sulfato possa servir como um sítio de ligação para esta metaloproteinase (YU et al., 2000).

Aneurismas de aorta abdominal apresentaram uma diminuição de 90% na concentração de versican em comparação à concentração total em aortas normais (THEOCHARIS et al., 2001; 2003), e aortas com dissecção aguda também exibiram diminuição na concentração de GAGs em sua parede (GUTIERREZ et al., 1991).

Fato interessante é que GUTIERREZ e colaboradores (1998) não encontraram, em regiões de acúmulos mucóides de aortas com dissecção, marcação para hialuronan nem para nenhum dos proteoglicanos estudados, sendo eles: versican, decorin e biglican. No mesmo estudo, notou-se que o hialuronan e principalmente o versican apresentam uma localização preferencial na segunda metade da túnica média, próxima à adventícia, onde ocorrem as dissecções.

Embora ainda não se saiba o verdadeiro papel da hipertensão no desenvolvimento dos aneurismas e dissecções da aorta ascendente, cabe ressaltar que células musculares lisas vasculares em cultura apresentaram uma maior sulfatação dos seus proteoglicanos sintetizados, frente a mudanças mecânicas. Este fato sugere que as células musculares lisas podem modificar seu padrão de comportamento frente a injúrias mecânicas, alterando o seu ambiente.

1.5. O acometimento preferencial da porção externa da túnica média

Embora seja um aspecto bem reconhecido nas dissecções da aorta, o fato da delaminação com grande frequência tomar a parte externa das artérias é poucas

vezes considerado na tentativa de elucidação da patogênese dessa doença. O sangue atravessa, a partir do orifício de entrada, dois terços da parede, para só aí iniciar-se a delaminação. Isso levanta a questão de se a estrutura da parede é diferente nessa região, em contraste com a porção interna, de modo a facilitar a dissecação.

São poucos porém os trabalhos que enfocam possíveis diferenças na composição nas porções próximas e distantes da adventícia, quer em microscopia de luz comum, quer em microscopia eletrônica. BERRY e colaboradores (1993) estudaram aortas de ratos e viram que as fibras elásticas são mais espessas e há mais junções intercelulares nos dois terços da túnica média, onde acreditam se exerça grande parte da tensão sobre a parede. A clivagem, segundo esses autores, aconteceria na transição com a zona menos capacitada à resistência à tensão, o terço externo. GUTIERREZ e colaboradores (1998) mostraram, em aortas humanas normais, que há mais versican e hialuronan na mesma região. Quanto ao colágeno, que tem papel proeminente na resistência dos tecidos, nem mesmo o artigo mais importante de SARIOLA e colaboradores (1986) analisa essa questão.

OBJETIVO

Sendo assim, os objetivos do presente trabalho foram:

1) Quantificar o colágeno presente nas duas metades da túnica média (porção interna e externa) para ver se há diferenças que ajudem a explicar porque as dissecções ocorrem nesta.

2) Verificar a expressão da matrilisina, estromelisinina e da plasmina (principal ativador das enzimas matriciais), em aneurismas e dissecções da aorta ascendente humana, visando a levantar a possibilidade de que suas ações possam ter papel na patogênese dessas doenças.

2. CASUÍSTICA E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelas Comissões Científicas e de Ética do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e do Centre Hospitalier Universitaire Bichat-Claude Bernard - Faculte de Médecine - Université de Paris VII – Paris, França.

2.1. Casuística

Foram colhidos fragmentos de aorta ascendente durante cirurgias para correção de dissecção aórtica aguda (grupo com dissecção n=10); como controle, foram colhidos fragmentos de aorta ascendente em cirurgias de revascularização do miocárdio por interposição de ponte de veia safena. (grupo controle n=9). Tais operações foram realizadas no Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. No grupo controle, aortas com espessamento intimal discreto ou estrias lipóidicas foram aceitas, mas espécimes com qualquer outra lesão, caracterizada macro ou microscopicamente, tais como aterosclerose moderada ou grave, foram excluídas. As aortas com aneurismas crônicos foram provenientes da coleção do Laboratório de “*Remodelação Cardiovascular*” do *Institut de la Santé et de la Recherche Médicale* (INSERM) Unidade 698, do Hospital Bichat-Claude Bernard em Paris – França (grupo com aneurisma, n= 8). Dados clínicos dos pacientes são apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Dados clínicos dos pacientes incluídos no estudo.

Caso	Grupo	Método	Idade	Sexo	HAS
1	Normal	PS-QC	43	M	SR
2	Normal	PS-QC	57	M	S
3	Normal	PS-QC	70	F	S
4	Normal	PS-QC	71	F	SR
5	Normal	PS-QC	72	M	N
6	Normal	PS-QC + IHQ	66	M	S
7	Normal	PS-QC + IHQ	68	F	S
8	Normal	PS-QC + IHQ	71	M	SR
9	Normal	PS-QC + IHQ	SR	F	SR
10	Normal	IHQ	60	M	N
11	Normal	IHQ	64	M	N
12	Normal	IHQ	66	M	N
13	Normal	IHQ	69	F	SR
14	Normal	IHQ	78	M	S
15	Dissecção	IHQ	42	M	SR
16	Dissecção	IHQ	44	M	S
17	Dissecção	IHQ	48	M	S
18	Dissecção	IHQ	62	M	S
19	Dissecção	IHQ	65	M	S
20	Dissecção	IHQ	73	M	S
21	Dissecção	IHQ	75	M	S
22	Dissecção	IHQ	77	F	S
23	Dissecção	IHQ	77	M	S
24	Dissecção	IHQ	81	F	S
25	Aneurisma	IHQ	18	M	N
26	Aneurisma	IHQ	27	F	N
27	Aneurisma	IHQ	51	M	S
28	Aneurisma	IHQ	57	M	S
29	Aneurisma	IHQ	59	M	S
30	Aneurisma	IHQ	60	M	S
31	Aneurisma	IHQ	71	M	N
32	Aneurisma	IHQ	74	M	S
33	Aneurisma	IHQ	76	F	N
34	Aneurisma	IHQ	SR	M	SR
35	Aneurisma	IHQ	SR	M	SR

HAS- hipertensão arterial sistêmica; PS-QC- quantificação de colágeno em lâminas coradas pelo picrossírius; IHQ- imuno-histoquímica; SR- sem registro

2.2. Métodos

Fragmentos de aorta dos 4 grupos foram lavados com solução salina, fixados em solução de formol tamponado 10% por 24 a 72 horas, desidratados em série alcoólica crescente, clarificados em xilol e incluídos em parafina a 57°C. Cortes de

5µm de espessura foram distendidos em lâminas de vidro, desparafinizados, reidratados e submetidos à coloração usual pela hematoxilina e eosina para visão geral do órgão e avaliação quanto à aterosclerose e presença de infiltrado leucocitário (avaliação da inflamação).

2.2.1. Histoquímica

Cortes de 5µm de espessura foram desparafinizados, reidratados e submetidos às seguintes reações histoquímicas:

-Azul de Alcian pH 2,5 para visualização dos glicosaminoglicanos (SCOTT, 1996)

-Picrossírius-hematoxilina, para visualização das fibras de colágeno (MONTES, 1996)

-Picrossírius-fluorescência, para visualização de fibras de colágeno e elástica simultaneamente (BORGES et al., 2005)

-Orceína, para visualização das fibras elásticas maduras (BEHMER *et al.*, 1976)

2.2.2. Imuno-histoquímica

Cortes em parafina, de 5µm de espessura, foram submetidos a reações imuno-histoquímicas (imunoperoxidase) para as seguintes proteases da matriz extracelular:

- MMP-3 (Anticorpo policlonal – CHEMICON – AB 810)
- MMP-7 (Anticorpo policlonal – CHEMICON – AB 8118)
- Plasmina (Anticorpo monoclonal TECHNOCLONE – CAT. No. 21113)

Os cortes foram desparafinizados, hidratados e em seguida submetidos à recuperação do epitopo, como segue tabela abaixo:

Protease	Recuperação do epitopo
MMP-3	Tampão TRIS-Citrato pH 7,2 – 40 minutos em banho-maria a 90°C
MMP-7	Tampão Citrato 10mM pH 6 – 40 minutos em banho-maria a 90°C
Plasmina	Tampão TRIS-Citrato pH 7,2 – 40 minutos em banho-maria a 90°C
Observação	Os cortes submetidos ao banho-maria devem esfriar por 20 minutos após o término desta etapa.

Em seguida os cortes foram lavados em PBS, submetidos ao bloqueio com peróxido de hidrogênio 3%, lavados com solução de TBS-TC e incubados com soro de cavalo 2% (exceto para plasmina). Seguiu-se incubação com anticorpo primário diluído em TBS-TC durante toda a noite a 4°C, sendo as diluições: MMP-3 (40µg/ml) e MMP-7 (20µg/ml). Os cortes foram lavados em PBS e TBS/TC, incubados com anticorpo secundário biotilado (1:200) diluído em TBS-TC (KIT LSAB 2 System-HRP - DAKO) e em seguida lavados e incubados com o complexo streptavidina-biotina (KIT LSAB 2 System-HRP – DAKO). A revelação dos cortes se deu pela utilização da diaminobenzidina e os núcleos celulares contracolorados com hematoxilina de Mayer. Em seguida os cortes foram lavados, desidratados, diafanizados e montados.

Os controles negativos foram feitos aplicando como anticorpo primário IgG monoclonal de mesmo isotipo.

Avaliação da quantidade das metaloproteinases 3 e 7 foi realizada na túnica média das aortas de todos os grupos, de forma semi-quantitativa, considerando-se a primeira metade próxima à íntima e a segunda metade próxima à adventícia e a

marcação dentro dos acúmulos mucóides. A marcação foi classificada como forte, moderado ou fraca.

2.2.3. Quantificação da área de colágeno na túnica média

A quantificação das fibras de colágeno foi realizada em nove cortes de aortas normais corados pelo Picrossíus. A análise foi feita separadamente, subdividindo a túnica média em duas metades, a primeira metade próxima à íntima e a segunda metade próxima à adventícia. Foi feita uma comparação da quantidade de fibras de colágeno presente na primeira metade em relação à segunda metade. As imagens foram analisadas em microscópio de luz comum, utilizando a objetiva de 20x, associado a um analisador de imagens (Quantimet 500) LEICA. Com a utilização da objetiva de 20x foi possível à visualização de toda a túnica média dentro do campo de imagem do microscópio, sendo desconsiderados aqueles que não apresentavam toda a camada média presente, ou seja, as duas metades. Assim, foi possível obter uma quantidade igual de campos medidos nas duas metades da túnica média. Portanto, a comparação da área ocupada por colágeno reflete diretamente a da fração de área. Após verificação de adesão à distribuição normal dos resultados, estes foram comparados pelo teste *t* de Student.

3. RESULTADOS

3.1. A Aorta Normal

3.1.1. Histopatologia

As figuras 1A, 1B e 1C mostram cortes de aortas normais. Quando corados com hematoxilina e eosina, evidenciou-se arranjo normal na histoarquitetura de sua parede. A túnica íntima não apresentou espessamento e a túnica média mostrou um rearranjo típico onde células musculares lisas alternam-se com lâminas elásticas.

A coloração pela orceína confirmou a presença de lâminas elásticas dispostas paralelamente umas às outras. A coloração pelo Picrossírius permitiu observar uma trama formada por fibras de colágeno que se interpunham entre as lâminas elásticas (figura 1B). Quando analisadas pelo método da Picrossírius-fluorescência pode-se observar a exata disposição das fibras de colágeno entre as lâminas elásticas (figura 1C). A coloração pelo azul de Alcian evidenciou polissacarídeos ácidos (glicosaminoglicanos e proteoglicanos) uniformemente distribuídos entre estas lâminas (figura 1A).

A adventícia apresentou-se formada principalmente por fibroblastos mas também marcado pela presença de adipócitos. A matriz extracelular era formada por fibras de colágeno e do sistema elástico, com presença de pequenas artérias e vênulas.

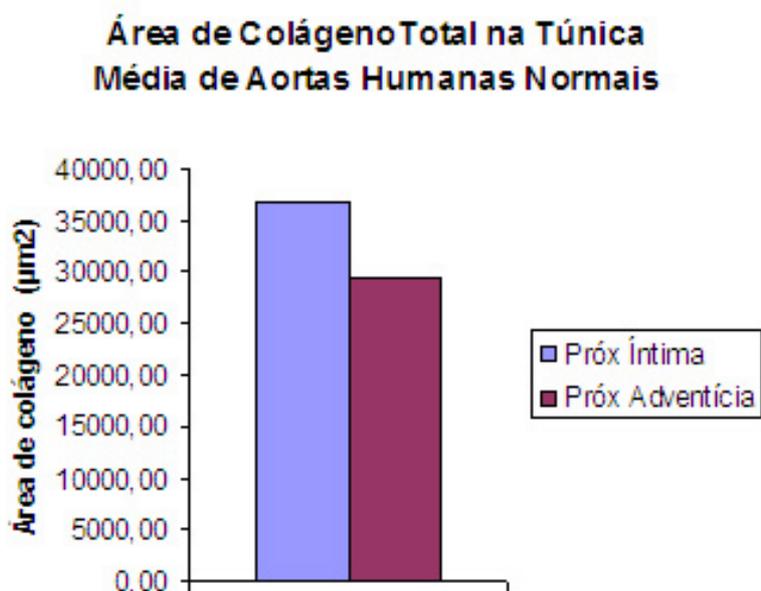
3.1.2. Quantificação da área de colágeno na túnica média

Os resultados concernentes à quantidade de colágeno na camada média das aortas encontram-se na tabela e gráfico abaixo apresentados. A área ocupada

pelo colágeno na segunda metade da aorta é menor em comparação à primeira metade, próxima à íntima.

Tabela 2. Área de colágeno (μm^2) das porções próxima da íntima e próxima da adventícia, de aortas humanas normais.

Caso	Próxima íntima	Próxima adventícia
9	43520,89	28780,61
16	22661,84	25480,19
17	43606,37	28463,26
12	41403,17	36829,74
18	33381,26	19575,35
19	48552,42	32440,39
20	39040,20	37151,21
10	36105,23	24291,69
21	22071,56	31127,89
Média	36704,77	29348,93
p=0,042		



3.1.3. Imuno-histoquímica

Aortas normais mostraram imunorreatividade moderada para MMP-3 e MMP-7 nas camadas íntima e adventícia; e fraca e difusa na média (figuras 2A e 2B). Entretanto nota-se que a marcação para MMP-7 foi mais proeminente na segunda metade externa da túnica média (figura 2B) como mostra os valores expressos na tabela 3. Imunomarcação para MMP-3 e MMP-7 foi sobretudo intracelular, porém a MMP-7 mostrou marcação extracelular na segunda metade da túnica média e na camada subendotelial.

Plasmina/plasminogênio apresentaram imunomarcação nas células endoteliais (íntima) e nas células musculares lisas da túnica média (figura 3A), sendo que nestas últimas de forma difusa e uniforme.

3.2. As Aortas com Aneurisma e Dissecção

Como os achados nesses grupos foram semelhantes, serão apresentados em conjunto.

3.2.1. Histopatologia

Quinze dos 18 cortes de aorta com aneurismas e dissecções corados pela hematoxilina e eosina apresentaram extensas áreas de acúmulo basofílico e uma aparente redução no número de células musculares lisas. Estes acúmulos foram confirmados através da coloração pelo azul de Alcian, específico para componentes aniônicos dos tecidos (figuras 1D). O acúmulo de material basofílico (zonas de degeneração mucóide) foi grande e ultrapassava o espaço situado entre as lâminas elásticas adjacentes, formando estruturas semelhantes a lagos, de tamanhos variados.

A coloração pelo Picrossírius-hematoxilina evidenciou uma desorganização das fibras de colágeno (figura 1E). A trama fibrilar que se interpõe entre as lâminas elásticas encontrava-se fragmentada e descontínua. Quando analisados pela técnica da Picrossírius-fluorescência, pôde-se constatar a fragmentação das lâminas elásticas bem como das fibras de colágeno situadas principalmente ao redor das zonas de degeneração mucóide (figura 1F). As fibras de colágeno apresentaram-se como fragmentos espessados e a trama de fibras do sistema elástico que se interconectam entre as lâminas de elastina estavam ausentes em muitas áreas.

Em alguns casos pôde-se observar na adventícia um número pequeno de células inflamatórias, incluindo neutrófilos e eosinófilos.

3.2.2. Imuno-histoquímica

Quinze dos 18 cortes de aortas de pacientes com aneurismas e dissecção apresentaram grande positividade para MMP-7 nas áreas de depósitos mucóides (figura 2D) como evidenciado na tabela 3. Foi possível observar uma co-localização da MMP-3 nestas mesmas áreas, porém com uma positividade menos acentuada, quando comparada à da MMP-7 (figura 2F e tabela 3). Nas áreas adjacentes, a imunomarcção para MMP-7 e MMP-3 foi moderada nas células musculares lisas. A MMP-7, porém, apresentou intensa imunomarcção na matriz extracelular e mais evidente na segunda metade da média, acompanhando a expressão verificada nas aortas controles, como mostra a tabela 3.

Tabela 3 – Expressão semi-quantitativa de MMP-3 e MMP-7 na túnica média de aortas humanas; detecção por imuno-histoquímica.

	CONTROLE (n=9)		ANEURISMAS	E (n=18)	DISSECÇÕES
	Média Interna	Média Externa	Média Interna	Média Externa	Acúmulos Mucóides (AC)
MMP-3	1/8/0	1/8/0	2/14/2	1/11/6	3/12/0 (3 sem AC)
MMP-7	0/8/1	0/1/8	10/8/0	2/10/6	0/3/12 (3 sem AC)

Os três números separados por barras correspondem às quantidades de casos com marcação fraca, moderada e forte respectivamente

Quanto à plasmina/plasminogênio, houve forte positividade nas células musculares lisas e no espaço extracelular situados ao redor das zonas de acúmulos mucóides (figura 3B). Grupos de células musculares lisas que permaneciam isolados em meio aos acúmulos mucóides também apresentaram positividade para essa enzima (figura 3C e 3D). Nas regiões da túnica média onde não havia a presença de material mucóide, a imunoreatividade para plasmina/plasminogênio observada nas células musculares lisas foi semelhante àquela observada no tecido normal.

Figura 1. Fotomicrografias de cortes de aortas humanas, observados em microscópio de luz comum ou microscópio de fluorescência. A,B e C aortas controle; D, E e F aortas com aneurisma ou dissecção. Túnica íntima, parte superior; túnica adventícia, parte inferior. Objetiva de 20x.

A) Corte histológico corado pelo azul de alcian e contracorado pelo vermelho nuclear. Observa-se a coloração em azul dos glicosaminoglicanos presentes entre as lâminas elásticas, que aparecem como imagem negativa (seta), contra um fundo de coloração vermelha referente aos outros componentes da parede da aorta (células musculares lisas e fibras). **B)** Corte histológico corado pelo picrossírius. Observa-se a intensa coloração avermelhada das fibras de colágeno na túnica média. Nota-se a presença de fibras de colágeno grossas e finas. **C)** Imagem referente à figura B, vista em microscópio de fluorescência. Observa-se em verde as lâminas elásticas paralelamente dispostas na túnica média. Entre estas pode-se notar, em vermelho, as fibras de colágeno formando uma trama reticular. **D)** Corte histológico de uma aorta com aneurisma corado pelo azul de alcian. Observa-se em azul, as típicas regiões de acúmulos mucóides (estrela) na túnica média; contra um fundo de coloração vermelha referente aos outros componentes da parede da aorta (células musculares lisas e MEC). **E)** Corte histológico de aorta humana com dissecção corado pelo picrossírius-hematoxilina. Observa-se a intensa coloração avermelhada das fibras de colágeno na túnica média, que se encontram fragmentadas e espessadas (seta fina), principalmente nas regiões de acúmulos mucóides (estrela). Lâminas elásticas aparecem sutilmente como imagem negativa (seta larga). **F)** Imagem referente à figura E, vista em microscópio de fluorescência. Observa-se em verde as lâminas elásticas fragmentadas (seta larga). Nota-se a ausência de lâminas elásticas dentro dos acúmulos mucóides bem como em sua periferia (estrela). Em vermelho, observam-se as fibras de colágeno fragmentadas e espessadas (seta fina).

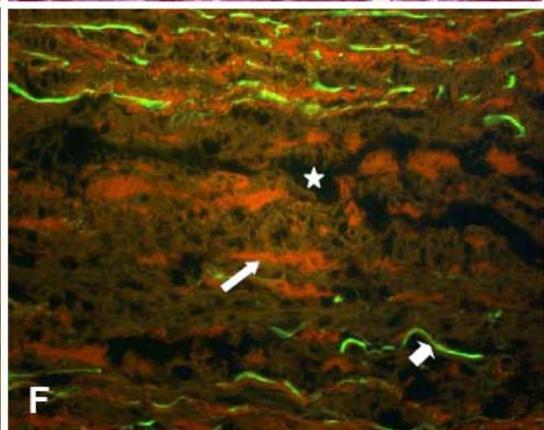
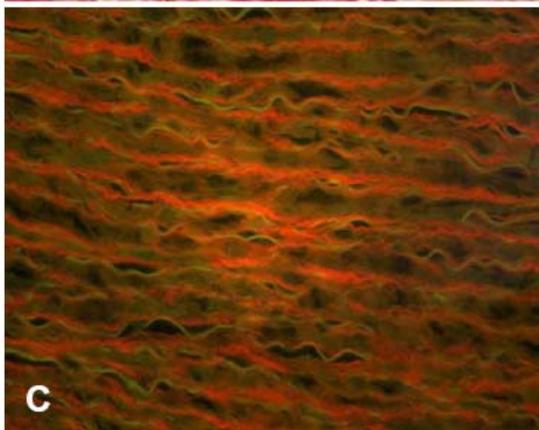
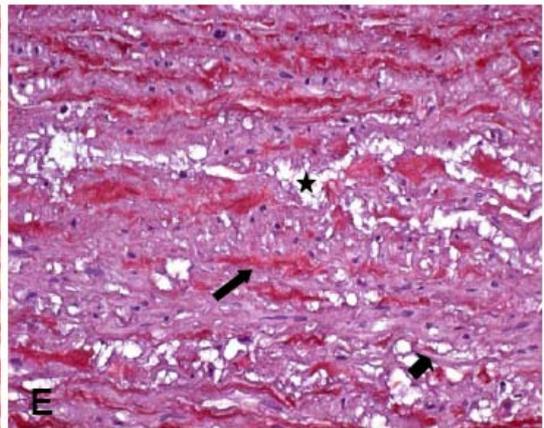
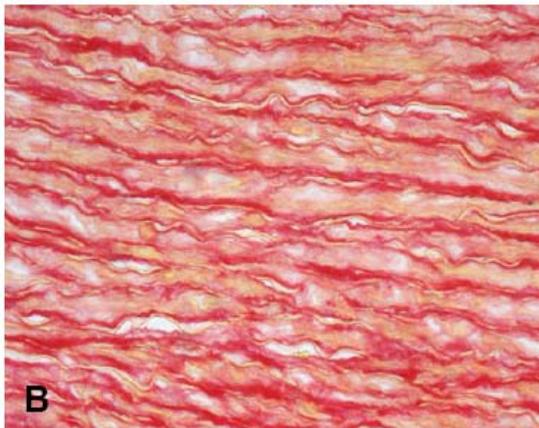
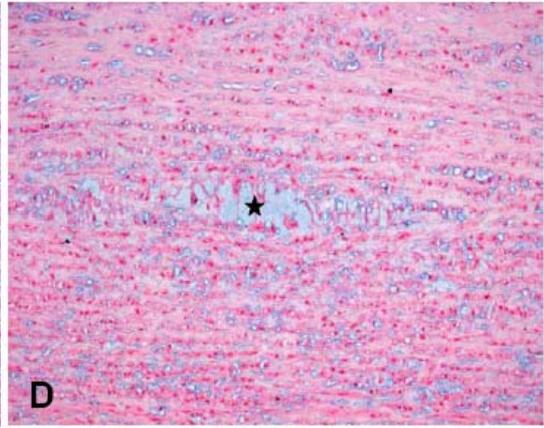
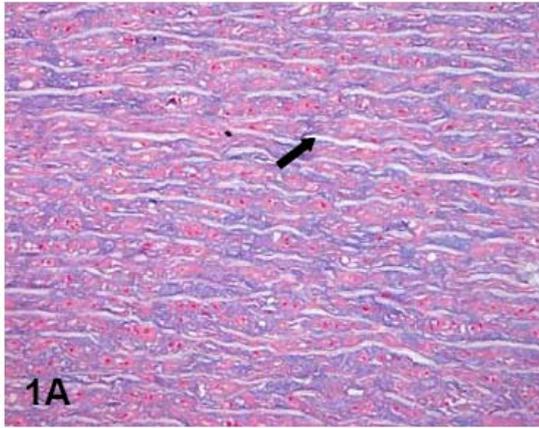


Figura 2. Fotomicrografias de cortes de aortas humanas normais, com dissecção ou aneurisma, observados em microscópio de luz comum. Túnica íntima, parte superior; túnica adventícia, parte inferior. Objetiva de 20x.

A) Corte histológico de aorta normal submetido à reação de imunoperoxidase para MMP-3. Nota-se uma positividade, em cor acastanha, uniforme em toda a túnica média e com imunomarcção, sobretudo, intracelular (setas). **B)** Corte histológico de aorta normal submetido à reação de imunoperoxidase para MMP-7. Nota-se uma intensa positividade, em coloração acastanhada, intra e extracelularmente na segunda metade da aorta. Pode-se observar que a imunomarcção da primeira metade é quase que exclusivamente intracelular. **C e D)** Cortes histológicos seriados de aorta humana com dissecção. Na figura C, coloração pelo azul de alcian, observa-se em azul, as típicas regiões de acúmulos mucóides (estrelas) na túnica média, contra um fundo de coloração vermelha referente aos outros componentes da parede da aorta (células musculares lisas e MEC). Na figura D, referente ao corte adjacente, observa-se a imunomarcção para MMP-7. Nota-se uma intensa positividade, em coloração acastanhada, dentro dos acúmulos mucóides (estrelas). **E e F)** Cortes histológicos seriados de aorta humana com aneurisma. Na figura E, coloração pelo azul de alcian, observa-se em azul, as típicas regiões de acúmulos mucóides (estrela) na túnica média, contra um fundo de coloração vermelha referente aos outros componentes da parede da aorta (células musculares lisas e MEC). Na figura F, referente ao corte adjacente, observa-se reação de imunoperoxidase para MMP-3. Nota-se uma positividade menos acentuada, dessa metaloproteinase, dentro dos acúmulos mucóides e uma co-localização com a MMP-7.

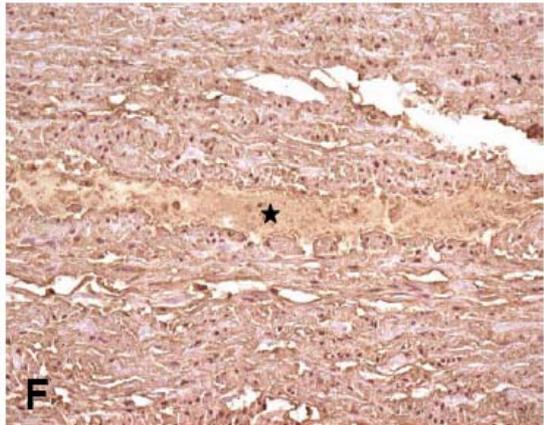
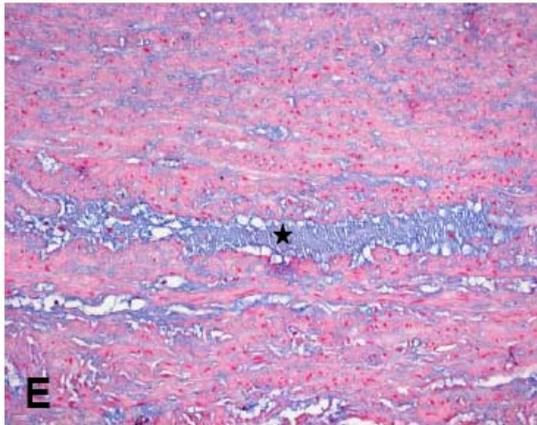
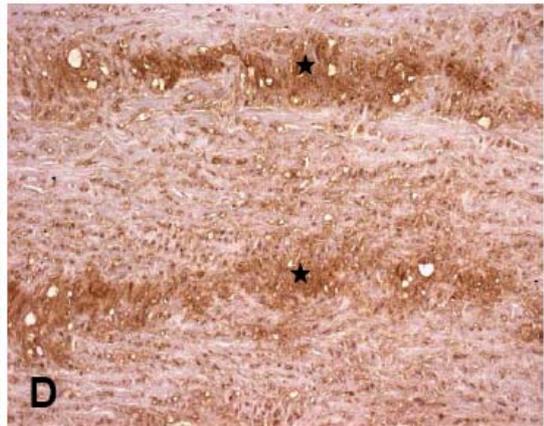
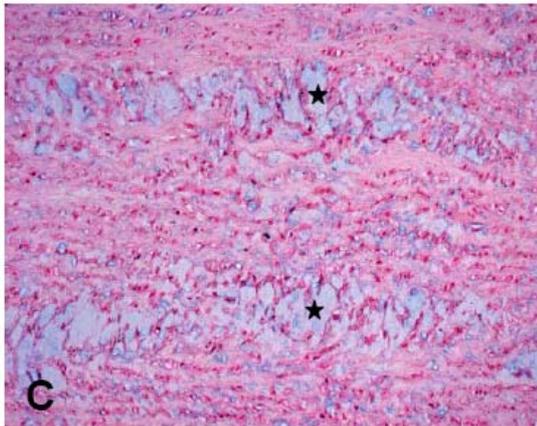
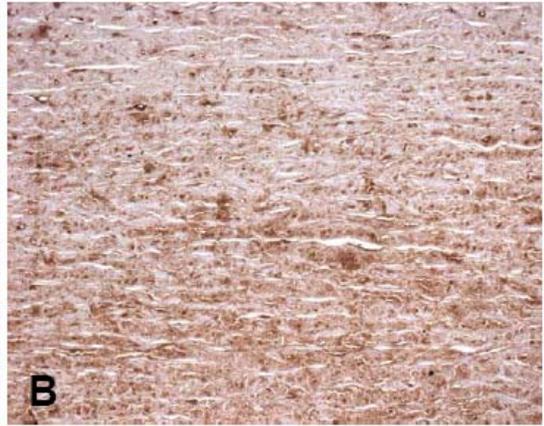
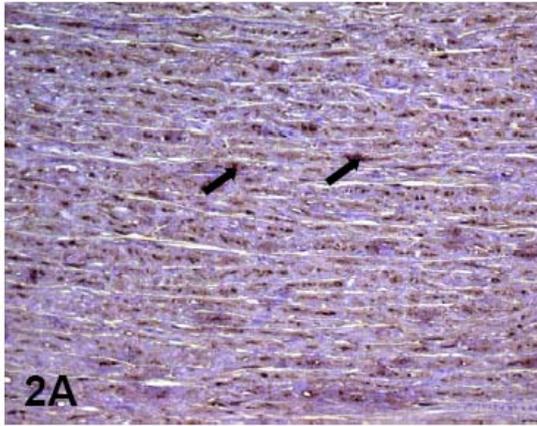
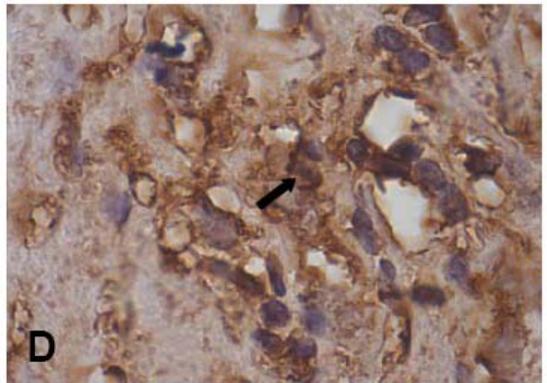
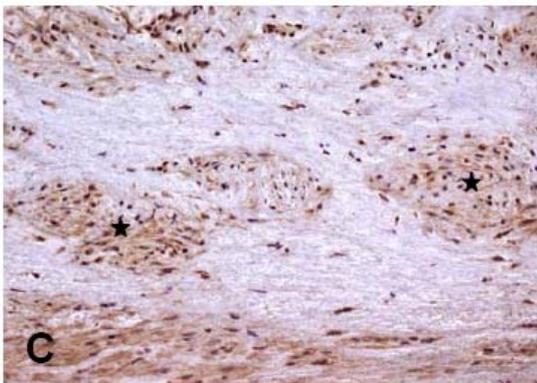
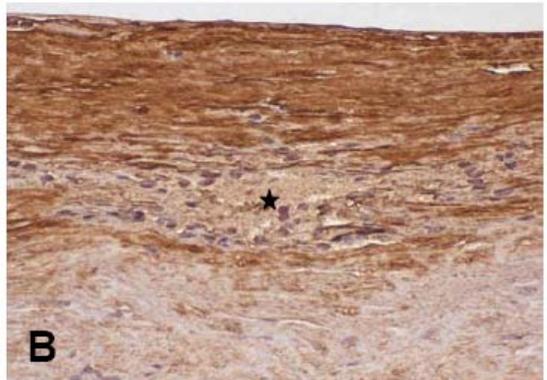


Figura 3. Fotomicrografias de cortes de aortas humanas normais, com dissecção ou aneurisma, submetidos à reação de imunohistoquímica para plasmina/plasminogênio e observados em microscópio de luz comum. Túnica íntima, parte superior; túnica adventícia, parte inferior. A, B e C objetiva de 20x e D objetiva de 100x.

A) Corte histológico de aorta humana normal. Observa-se uma alta positividade da túnica íntima bem como uma imunomarcação intracelular nas células musculares lisas da média. Pode-se observar um gradiente da marcação da plasmina/plasminogênio da luz em direção à média. **B)** Corte histológico de aorta humana com aneurisma. Nota-se ausência de plasmina/plasminogênio dentro das regiões de acúmulos mucóides (estrela) , entretanto, é possível observar uma positividade das células musculares lisas ao redor. **C)** Corte histológico de aorta humana com dissecção. Observam-se grupos de células musculares lisas com intensa imunomarcação (estrelas) e ao redor ausência de plasmina/plasminogênio nas regiões de acúmulos mucóides. **D)** Corte histológico de aorta humana com aneurisma. Observa-se em um maior aumento a região de acúmulo mucóide apresentando células musculares lisas positivas para plasmina/plasminogênio (seta).



4. DISCUSSÃO

4.1. As proteases e a parede da aorta

Existem muitas diferenças entre dissecção e aneurisma da aorta ascendente. Os aneurismas estão freqüentemente associados a uma desordem genética, sendo uma afecção crônica, enquanto as dissecções são lesões agudas e comumente associadas à hipertensão arterial sistêmica. A principal diferença consiste no fato de que as dissecções são marcadas pela delaminação da parede da aorta, que não acontece nos aneurismas. Entretanto, o grande interesse de estudar conjuntamente estas duas doenças consiste no fato de que elas apresentam em comum características histopatológicas na túnica média, a saber: acúmulo de material mucóide, fragmentação das fibras elásticas, aparente diminuição do número de células musculares lisas e o fato de não apresentarem inflamação significativa. Cabe acrescentar que há pacientes com aneurismas que podem sofrer dissecção, porém correspondem a uma minoria. Adicionalmente, há condições associadas às duas entidades, tais como as síndromes de Marfan e de Ehlers-Danlos e a valva aórtica bicúspide.

Estudos vêm demonstrando o papel das MMPs nas doenças da aorta (LESAUSKAITE et al., 2001; BOYUM et al., 2004; KOULLIAS et al., 2004; ISHII & ASUWA, 2000; NATAATMADJA et al., 2003), mas o presente trabalho representa a primeira avaliação da presença das enzimas MMP-7 e MMP-3 sobre os proteoglicanos em dissecções aórticas e aneurismas de aorta ascendente (DA/AAAsc)

Recentes publicações mostraram que outras MMPs não estão presentes nas áreas de acúmulos mucóides nessas doenças. Nós entretanto demonstramos que

a MMP-7 e MMP-3 estão preferencialmente localizadas nestas regiões, além de estarem também presentes em outras regiões, bem como nas aortas normais.

A MMP-3 e MMP-7 são capazes de degradar uma série de proteínas, como fibronectina, laminina, tenascina, bem como alguns tipos de colágeno; elas podem também ativar algumas pro-MMPs e principalmente clivar proteoglicanos. Porém, o que chama a atenção é o fato da MMP-7 degradar o versican. A ação desta enzima sobre este proteoglicano parece ser muito mais eficiente que a exercida por outras MMPs também capazes de degradá-lo, como MMP-1, MMP-3 e MMP-9 (HALPERT et al., 1996; THEOCARIS et al., 2003).

O versican é o principal proteoglicano presente na parede da aorta. Esse composto, as fibras de colágeno e do sistema elástico, e ainda hialuronan e pequenos proteoglicanos como decorin, biglican e perlecan, preenchem grande parte do espaço extracelular. Estes proteoglicanos são importantes na integridade estrutural da parede da aorta e também na participação da regulação de muitos eventos biológicos. Sendo assim, pode-se inferir que uma alteração na estrutura física do versican esteja relacionada com DA/AAAsc. Cabe ressaltar que Gutierrez e colaboradores (1998) não detectaram nenhuma imunomarcação dentro dos acúmulos mucóides quando estudando os principais PGs presentes na parede da aorta.

Nossos resultados sugerem uma ação direta da MMP-7 na gênese das zonas de acúmulo mucóide. Uma ação contínua dessa enzima sobre os proteoglicanos existentes na aorta, principalmente versican, juntamente com um processo de reparação tecidual, poderia ser responsável pela formação dessas áreas. Os depósitos mucóides vistos na túnica média das aortas com aneurismas e dissecções da porção ascendente poderiam desse modo conter fragmentos de proteoglicanos, principalmente de versican, resultantes da degradação, sobretudo pela matrilisina

(MMP-7). Esse material, constituído assim por pequenos peptídios enriquecidos por GAGs sulfatados, não seria detectável por imuno-histoquímica devido ao fato de já não incluírem os domínios usados no preparo dos anticorpos, mas, uma vez que conteriam grupamentos aniônicos, sulfato e carboxílicos, seriam coráveis por corantes catiônicos como o azul de Alcian e mesmo pela hematoxilina. Esta idéia é reforçada pelo fato de que resultados similares foram encontrados em aneurismas de aorta abdominal (AAA) utilizando técnicas bioquímicas (extração e caracterização do PG), biologia molecular (RT-PCR) e de imunomarcação (THEOCHARIS et al., 2001; 2003).

Quanto à fragmentação das fibras elásticas, outro importante aspecto em aneurismas e dissecções da aorta refere-se ao fato de que MMP-3 e MMP-7 podem causar elastólise não somente por ação direta mas também por exibir atividade serpinase, uma via complexa através da qual ocorre inativação dos inibidores das serinoproteinases, como por exemplo da elastase. A MMP-7 também possui a capacidade de degradar a fibronectina, uma glicoproteína importante na adesão célula-matriz extracelular, em cuja ausência a célula pode entrar em um processo de apoptose, evento este já demonstrado nas doenças dilatativas da aorta ascendente.

Considerando nossos resultados sobre MMP-7 e MMP-3, que apresentaram imunomarcação dentro das áreas de acúmulos mucóides na média das aortas, nós focamos no mecanismo de ativação destas enzimas. Elas podem estar presentes em um dado tecido, mas na forma inativa, devendo então ser ativadas para que exerçam a sua atividade, fato este que justifica a marcação destas enzimas nos casos-controles. Por isso, avaliamos também a presença da plasmina. Esta, resultante da degradação do plasminogênio, é a principal via de ativação das metaloproteinases. A ativação se dá através da clivagem do pro-peptídeo dessas enzimas, desta forma podendo participar inclusive da ativação de outras metaloproteinases. Estudos têm

demonstrado que a MMP-3 é um ativador efetivo da pro-MMP-7 e que a interação e ação conjunta entre MMP-3 e MMP-7 podem ativar as pro-MMP-1 e pro-MMP-9 (IMAI et al., 1995).

Nossos resultados mostram a presença de plasmina extracelular nas regiões com acúmulos mucóides, bem como marcação citoplasmática e de membrana extracelular, sendo que nas aortas normais a imunomarcação se deu apenas nos dois últimos locais. A plasmina pode estar envolvida na ativação da pro-MMP-3 e pro-MMP-7. Uma vez ativadas, estas metaloproteinases iniciariam um processo de degradação dos componentes da parede da aorta. MMP-7 e MMP-3 degradariam mais efetivamente o versican que, juntamente com um processo de reparação tecidual e um conseqüente desequilíbrio entre síntese e degradação, resultaria na formação dos acúmulos mucóides. MMP-3 também degradaria a elastina, o colágeno do tipo III (presente nas *fibras de reticulina*) e fibronectina, sendo que a degradação desta última poderia explicar a presença de apoptose nestas doenças. Estas duas enzimas ainda seriam responsáveis pela ativação da pro-MMP-1 que por sua vez ativada iniciaria uma degradação mais efetiva dos componentes colagênicos da parede da aorta, seu principal substrato.

Este conjunto de eventos degradativos, na parede da aorta, causariam então um enfraquecimento tecidual com perda de suas propriedades físicas. Isto poderia assim resultar seja na dilatação da parede como um todo (aneurisma), ou em casos mais agudos, na ruptura da túnica média (dissecção).

Ainda em relação à ação das metaloproteinases cabe ressaltar que os nossos resultados mostraram, em uma análise semi-quantitativa, uma marcação mais acentuada da MMP-7 dentro dos lagos mucóides em comparação à MMP-3. Porém estes resultados não refletem uma maior atividade enzimática da MMP-7 dentro dos

lagos mucóides em comparação à MMP-3, uma vez que estas enzimas podem estar em um estado inativo ou mesmo em sua forma ativa porém inibidas por inibidores teciduais das metaloproteínas, as TIMPs. Sendo assim, somente testes que mostrem efetivamente a ação dessas enzimas, como a zimografia *in situ*, poderiam dizer o real estado funcional das mesmas.

Desta forma, os nossos resultados mostram a real localização e distribuição dessas metaloproteinases na parede das aortas com aneurismas e dissecções, refletindo a morfologia funcional dessas proteases parietais neste segmento vascular.

4.2. O colágeno e a sua possível relação nas dissecções

O colágeno é uma proteína que confere resistência aos tecidos. Na aorta as fibras que o contém asseguram a integridade física da parede desse vaso, cuja pressão é alta.

Outro aspecto relevante se trata do local onde ocorre a ruptura da parede nas dissecções. A delaminação se dá, na grande maioria das vezes, no terço externo da túnica média.

O presente estudo demonstrou, em aortas normais, que a MMP-7 localiza-se preferencialmente na segunda metade da média e que a quantidade de fibras de colágeno nesta mesma região é significativamente menor que na primeira metade, próxima à túnica íntima. Estes dados sugerem que na segunda metade da média pode estar ocorrendo, nas aortas que sofrem dissecção, uma degradação mais efetiva dos componentes da MEC pela MMP-7, sobretudo do versican, responsável pelo amortecimento dos impactos promovidos pela pressão arterial. O componente colagênico por sua vez, responsável pela resistência física da parede, também sofreria

degradação sobretudo pela MMP-1. O fato deste componente fibrilar encontrar-se em menor quantidade nesta região poderia explicar uma maior facilidade para o enfraquecimento da parede da aorta nesta região. A pressão sanguínea constante exercida nessa parede, já fragilizada e conseqüentemente apresentando uma menor resistências às forças mecânicas, poderia ter como conseqüência a sua rasgadura.

5. CONCLUSÕES

1. Possivelmente a ação da MMP-7 e MMP-3, ativadas pela plasmina, têm papel na patogênese dos aneurismas e dissecções da aorta ascendente, sendo responsáveis pela degradação do versican e conseqüente formação dos lagos mucóides.

2. Os lagos mucóides conteriam fragmentos de versican degradado (não detectados por imuno-histoquímica) e poderiam corresponder a um desequilíbrio entre os processos de síntese e degradação desse proteoglicano durante a evolução dessas doenças.

3. Na segunda metade da camada média, onde as dissecções ocorrem, há menos colágeno e maior expressão de MMP-7, indicando a possibilidade de haver maior fragilidade da parede arterial nessa região.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANAGNOSTOPOULOS CE, ATHANASULEAS CL, GARRICK TR, PAULISSAN R. Acute aortic dissections. 1st ed. Baltimore: University Park Press, 1975.

BECKER AE. Medionecrosis aortae. *Pathol Microbiol* 1975; 43: 124-128.

BERRY CL, SOSA-MELGAREJO JA, GREENWALD SE. The relationship between wall tension, lamellar thickness, and intercellular junctions in the fetal and adult aorta: its relevance to the pathology of dissecting aneurysm. *J Pathol* 1993; 169: 15-20.

BIENKOWSKI R. Intracellular degradation of newly synthesized collagen. *Collagen Rel Res* 1984;4: 399-412.

BIETH JG. The elastase. *J Soc Biol.* 2001;195(2):173-9.

BÖCK P. Histochemical staining of lymphatic anchoring filaments. *Histochemistry* 1978a; 58: 343-345.

BÖCK P. Histochemical demonstration of disulphide-groups in the lamina propria of human seminiferous tubules. *Anat Embryol* 1978b; 153: 157-166.

BÖCK P, STOCKINGER L. Light and electron microscopic identification of elastic, elauinin and oxytalan fibers in human tracheal and bronchial mucosa. *Anat Embryol* 1984; 170: 145-153.

BORGES LF, TABOGA SR, GUTIERREZ PS. Simultaneous observation of collagen and elastin in normal and pathological tissues: analysis of Sirius-red-stained sections by fluorescence microscopy. *Cell Tissue Res.* 2005, 320(3):551-2.

BOYUM J, FELLINGER EK, SCHMOKER JD, TROMBLEY L, MCPARTLAND K, ITTLEMAN FP, HOWARD AB. Matrix metalloproteinase activity in thoracic aortic aneurysms

associated with bicuspid and tricuspid aortic valves. [J Thorac Cardiovasc Surg.](#) 2004, 127(3):686-91.

BURCHELL HB. Aortic dissection (dissecting hematoma; dissecting aneurysm of the aorta). *Circulation* 1955; 12: 1068-1079.

BURMAN SO. Medial degeneration and its relation to dissecting aneurysms. *Int Abstracts Surg* 1960; 110: 1-8.

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: 341-348.

CATTELL, M.A., HASLETON, P.S., ANDERSON, J.C. Glycosaminoglycan content is increased in dissecting aneurysms of human thoracic aorta. *Clin Chem Acta* 1994; 226: 29-46.

CHAMLEY-CAMPBELL JH, CAMPBELL GR, ROSS R. Phenotype-dependent response of cultured aortic smooth muscle to serum mitogens. *J Cell Biol* 1981; 89: 379-383.

COLLEN D. Ham-Wasserman lecture: role of the plasminogen system in fibrin-homeostasis and tissue remodeling. *Hematology*. 2001:1-9.

COTTA-PEREIRA G, RODRIGO FG, BITTENCOURT-SAMPAIO S. Ultrastructural study of elaunin fibers in the secretory coil of human eccrine sweat glands. *Br. J Dermatol* 1975; 93: 623-629.

COTTA-PEREIRA G, RODRIGO FG, BITTENCOURT-SAMPAIO S. Ultrastructural study of elaunin fibers in the secretory coil human eccrine sweat glands. *J. Invest Dermatol* 1976;66: 143-148.

COTTA-PEREIRA G, DEL-CARO LM, MONTES GS. Distribution of elastic system fibers in hyaline and fibrous cartilages of the rat. *Acta anat* 1984; 119: 80-85.

CURCI JA, LIAO S, HUFFMAN MD, SHAPIRO SD, THOMPSON RW. Expression and localization of macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) in abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest.* 1998 Dec 1;102(11):1900-10.

DAILY PO, TRUEBLOOD HW, STINSON EB, WUERFLEIN RD, SHUMWAY NE. Management of acute aortic dissection. *Ann Thorac Surg* 1970; 10: 237-247.

DEBAKEY ME, COOLEY DA, CREECH O. Surgical management of dissecting aneurysm of the aorta. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1965; 49: 130-149.

DESANCTIS RW, DOROGHAZI RM, AUSTEN G, BUCKLEY MJ. Aortic dissection. *New Engl J Med* 1987; 317: 1060-1067.

DIETRICH CP. A model for cell-cell recognition and control of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycans. *Brazil J Med Biol Res* 1984; 17: 5-15.

DINGEMANS KP, TEELING P, LAGENDIJK JH, BECKER AE. Extracellular matrix of the human aortic media: an ultrastructural histochemical and immunohistochemical study of the adult aortic media. *Anat Rec* 2000; 258: 1-14.

DOLLERY CM, McEWAN JR, HENNEY AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res.* 1995 Nov; 77(5):863-8.

EDWARDS JG. A study of the periodontium during orthodontic rotation of teeth. *Am J Orthodontics* 1968; 54: 441-461.

ELLIOTT DP, ROE BB. Aortic dissection during cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1965; 50: 357-364.

FAHRENBACH WH, SANDBERG LB, CLEARY EG. Ultrastructural studies on early elastogenesis. *Acta Rec* 1966; 155: 536-576.

FERREIRA JMC, CALDINI EG, MONTES GS. Distribution of elastic system fibers in the peripheral nerves of mammals. *Acta anat* 1987; 130: 168-173.

FULLMER HM, LILLIE, RD. The oxytalan fiber: a previously undescribed connective tissue fibers. *J Histochem Cytochem* 1958; 6: 425-430.

FUSTER V, HALPERIN JL. Aortic dissection: a medical perspective. *J Card Surg* 1994; 9: 713-28.

GALIS ZS, KHATRI JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res.* 2002 Feb 22;90(3):251-62.

GARRONE R, HUC A, JUNQUA S. Fine structure and physicochemical studies on the collagen of the marine sponge *Chondrosia reniformis* Nardo. *J Ultrastruct Res* 1975; 52: 261-275.

GHADIALLY FN. Spiraled collagen (poorly packed collagen and frayed collagen). In: *The Ultrastructural Pathology of the Cell and Matrix*, 4 Ed., London, Butterworth, 1997; 1348-1351.

GIBSON GJ, CLEARY EG. The immunohistochemical localization of microfibril-associated glycoprotein (MAGP) in elastic and non-elastic tissues. *Immunol Cell Biol* 1987; 65: 345-356.

GORE I, SEIWERT VJ. Dissecting aneurysm of the aorta. *Arch Pathol* 1952; 53: 121-141.

GORE I. Pathogenesis of dissecting aneurysm of the aorta. *Arch Pathol* 1952; 53: 142-153.

GRILLO HC, GROSS J. Collagenolytic activity during mammalian wound repair. *Dev Biol* 1967; 15: 300-317.

GROSS J. An essay on biological degradation of collagen. In: Hay, E.D. (Ed.). Cell Biology of Extracellular Matrix. New York: Plenum Press, 1981; 217-258.

GUTIERREZ PS, DE ALMEIDA IC, NADER HB, HIGUCHI ML, STOLF N, DIETRICH CP. Decrease in sulphated glycosaminoglycans in aortic dissection--possible role in the pathogenesis. *Cardiovasc Res.* 1991 Sep;25(9):742-8.

GUTIERREZ PS, LOPES EA. Patologia das dissecções aórticas. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 1994; 5: 413-421.

GUTIERREZ PS, REIS MM, AIELLO VD, HIGUCHI ML, STOLF NAG, LOPES EA. Distribution of hyaluronan and dermatan/chondroitin sulphate proteoglycans in human aortic dissection. *Connective Tissue Research* 1998; 7 (3-4): 151-161.

HALPERT I, SIREN UI, ROBY JD, POTTER-PERIGO S, WIGHT TN, SHAPIRO SD, WELGUS HG, WICKLINE SA, PARKS WC. Matrilysin is expressed by lipid-laden macrophages at sites of potential rupture in atherosclerotic lesions and localizes to areas of versican deposition, a proteoglycan substrate for the enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:9748-53.

HARDINGHAM TE, FOSANG AJ. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J* 1992; 6: 861-870

HAY ED. Biogenesis and organization of extracellular matrix. *FASEB J.* 1999 Dec;13 Suppl 2:S281-3.

HEINEGARD D. & OLDBERG A. Structure and Biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB JOURNAL* 1989; 3: 2042-2051.

HENELL F, ERICSSON JLE, GLAUMANN, H. An electron microscopy study of the post-partum involution of the rat uterus. *Virchows Arch B (Cell Pathol.)* 1983; 42: 271-287.

HIRST AE, GORE I. Is cystic medionecrosis the cause of dissecting aneurysm of the aorta? *Circulation* 1976; 53: 915-916.

HIRST AE Jr, JOHNS VJ Jr, KIME SW Jr. Dissecting aneurysm of the aorta: a review of 505 cases. *Medicine* 1958; 37: 217-280.

ISHII T, ASUWA N. Collagen and elastin degradation by matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in aortic dissection. *Hum Pathol.* 2000 Jun; 31(6):640-6.

ISHII, T.; ASUWA, N. Spiraled collagen in the major blood vessels. *Mod Pathol.* 1996; 9(8):843-8.

JACOB, M.P. Élastine: préparation, caractérisation, structure, biosynthèse et catabolisme. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1993;187(2):166-80.

JACOB MP, BADIÉ-COMMANDER C, FONTAINE V, BÉNAZZOUG Y, FELDMAN L, MICHEL JB. Extracellular matrix remodeling in the vascular wall. *Pathol Biol (Paris).* 2001 May;49(4):326-32.

JACOB, M.P. Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomed Pharmacother.* 2003;57(5-6):195-202.

JUNQUEIRA LCU, BIGNOLAS G, MOURÃO PAS, BONETTI SS. Quantitation of collagen-proteoglycan interaction in tissue sections. *Connect. Tiss Res* 1980a;7: 91-96.

JUNQUEIRA LCU, MONTES GS. Biology of Collagen-Proteoglycan Interaction. *Arch Histol jap* 1983; 46 (5): 589-629.

JUNQUEIRA LCU, MONTES GS, MARTINS JEC, JOAZEIRO PP. Dermal collagen distribution. A histochemical and ultrastructural study. *Histochemistry* 1983a; 79: 397-403.

KOULLIAS GJ, RAVICHANDRAN P, KORKOLIS DP, RIMM DL, ELEFTERIADES JA. Increased tissue microarray matrix metalloproteinase expression favors proteolysis in thoracic aortic aneurysms and dissections. *Ann Thorac Surg*. 2004;78:2106-10.

LARSON EW, EDWARDS WD. Risk factors for aortic dissection: a necropsy study of 161 cases. *Am J Cardiol* 1984; 53: 849-855.

LESAUSKAITE V, TANGANELLI P, SASSI C, NERI E, DICIOLLA F, IVANOVIENE L, EPISTOLATO MC, LALINGA AV, ALESSANDRINI C, SPINA D. Smooth muscle cells of the media in the dilatative pathology of ascending thoracic aorta: morphology, immunoreactivity for osteopontin, matrix metalloproteinases, and their inhibitors. *Hum Pathol*. 2001;32:1003-11.

LINSENMAYER TF. Collagen. In: HAY ED. (Ed.). *Cell Biology of Extracellular Matrix*, 2. ed. New York: Plenum Press, 1991; 7-40.

MARTINEZ-HERNANDEZ A. Repair, regeneration and fibrosis. In: RUBIN, E. & FABER, J.L. (Ed.). *Pathology*. Philadelphia, Lippincott, 1988; 66-95.

MASSOVA I, KOTRA LP, FRIDMAN R, MOBASHERY S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB J*. 1998 Sep;12(12):1075-95.

MAYNE, R. Collagenous proteins of blood vessels. *Arteriosclerosis*, v. 6, p. 585-593, 1986.

MCCULLAGH KG, DUANCE VC, BISHOP KA. The distribution of collagen types I, III and V (AB) in normal and atherosclerotic human aorta. *J. Pathol* 1980; 130: 45-55

MCKUSICK VA. The defect in the Marfan syndrome. *Nature* 1991; 352: 279-281

MACSWEENEY ST, POWELL JT, GREENHALGH R. Pathogenesis of abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg* 1994; 81:935-41.

MECHAM RP, HEUSER JE. The Elastic Fiber. In: HAY, E.D. (Ed.), Cell Biology of Extracellular Matrix, 2 ed. New York: Plenum Press, 1991; 79-106.

MONTES GS, KRISZTAN RM, SHIGIHARA KM, TOKORO R, MOURÃO PAS, JUNQUEIRA LCU. Histochemical and morphological characterizations of reticular fibers. *Histochemistry* 1980; 65: 131-141.

MONTES GS. Structural Biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol International* 1996; 20 (1): 15-27.

MURPHY G, REYNOLDS JJ, WERB Z. Biosynthesis of tissue inhibitor of metalloproteinases by human fibroblasts in culture. Stimulation by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate and interleukin 1 in parallel with collagenase. *J Biol Chem.* 1985 Mar 10;260(5):3079-83.

MURRAY CA, EDWARDS JE. Spontaneous laceration of ascending aorta. *Circulation* 1973; 47: 848-858.

NAGASE H, WOESSNER JF JR. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999 Jul 30;274(31):21491-4.

NAKASHIMA Y, SHIOKAWA Y, SUEISHI K Alterations of elastic architecture in human aortic dissecting aneurysm. *Lab Invest.* 1990;62(6):751-60.

NATAATMADJA M, WEST M, WEST J, SUMMERS K, WALKER P, NAGATA M, WATANABE T. Abnormal extracellular matrix protein transport associated with increased apoptosis of vascular smooth muscle cells in marfan syndrome and bicuspid aortic valve thoracic aortic aneurysm. *Circulation.* 2003;108:II329-34.

NIETFELD JJ. Cytokines and proteoglycans. *Experientia* 1993; 49: 456-469.

PEREIRA LV, GUTIERREZ PS. Aspectos genéticos envolvidos em doenças da aorta. Rev Soc Cardiol Est S. Paulo 2004; 14: 488-98.

PÉREZ-TAMAYO R. Degradation of collagen: pathology. In: WEISS JB, JAYSON MIV. (Ed). Collagen in health and disease. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1982; 34-64.

RADHAKRISHNAMURTHY B, SRINIVASAN SR, VIJAYAGOPAL P, BERENSON GS. Arterial wall proteoglycans - biological properties related to pathogenesis of atherosclerosis. Eur Heart J 1990; 11 (Suppl E): 148-157.

RAINES, E.W. The extracellular matrix can regulate vascular cell migration, proliferation, and survival: relationships to vascular disease. Int J Exp Pathol. 2000;81(3):173-82.

RENNARD SI, STIER LE, CRISTAL R. Intracellular degradation of newly synthesized collagen. J. Invest. Dermatol 1982; 79: 77s-82s.

ROBERTS L, JACOB MP, FULOP T. Elastin in blood vessels. Ciba Found Symp 1995; 192: 286-299.

ROBERTS WC. Aortic dissection: anatomy, consequences, and causes. Am Heart J 1982; 101: 195-214.

ROBERTS WC, HONING HS. The spectrum of cardiovascular disease in the Marfan syndrome: a clinico-morphologic study of 18 necropsy patients and comparison to 151 previously reported necropsy patients. Am Heart J 1982; 104: 115-135

RODRIGO FG, COTTA-PEREIRA G, DAVID-FERREIRA JF. The fine structure of the elastic tendons in the human arrector pili muscle. Br J Dermatol 1975; 93: 631-637.

ROSENBLOOM J, ABRAMS WR, MECHAM R. The elastic fiber. FASEB J 1993; 7: 1208-1218.

ROSENMAN E, YAROM R. Dissecting aneurysm of the aorta and hypothyroidism. *Isr J Med Sci* 1994; 30: 510-513

ROSS R, BORNSTEIN P. The elastic fiber. I. The separation and partial characterization of its macromolecular components. *J Cell Biol* 1969; 40: 366-381.

ROSS R, KLEBANOFF SJ. The smooth muscle cell: In vivo synthesis of connective tissue proteins. *The J Cell Biology* 1971; 50: 159-171.

ROSS R. The elastic fiber. A review. *J Histochem Cytochem* 1973; 21: 199-208.

ROTTINO A. Medial degeneration of the aorta: a study of two hundred and ten routine autopsy specimens by a serial block method. *Arch Pathol* 1939; 28: 377-385.

RUOSLAHTI E, YAMAGUCHI Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* 1991; 64: 867-869.

SAMBIASE NV. Estudo do sistema elástico em artéria aorta torácica ascendente humana. Tese Mestrado. Escola Paulista de Medicina. São Paulo, 1992. 86p..

SARIOLA H, VILJANEN T, LUOSTO R. Histological pattern and changes in extracellular matrix in aortic dissections. *J. Clin. Pathol* 1986; 39: 1074-1081.

SCHLATMANN TJM, BECKER AE. Histologic changes in the normal aging aorta: implications for dissecting aneurysms. *Am J Cardiol* 1977; 39: 13-20.

SCHUPPAN D, RÜHL M. Matrix in signal transduction and growth factor modulation. *Brazilian J Med Biol Res* 1994; 27: 2125-2141.

SHAPIRO SD, ENDICOTT SK, PROVINCE MA, PIERCE JA, CAMPBELL EJ. Marked longevity of human lung parenchymal elastic fibers deduced from prevalence of D-aspartate and nuclear weapons-related radiocarbon. *J Clin Invest* 1991; 87: 1828-1834.

SHENNAN T. Dissecting aneurysms. Special Report, Medical Research Council, His majesty's Stationery Office, London, 1934. apud HIRST, A.E., Jr.; JOHNS, V.J., Jr.; KIME, S.W.; Dissecting aneurysm of the aorta: a review of 505 cases. *Medicine* 1958; 37: 217-280

SHIMADA T, SATO F, ZHANG L, INA K, KITAMURA H. Three-dimensional visualization of the aorta and elastic cartilage after removal of extracellular ground substance with a modified NaOH maceration method. *J Electron Microsc* 1993; 42: 328-333.

SHLATMANN TJM, BECKER AE. Pathogenesis of dissecting aneurysm of aorta: comparative histopathologic study of significance of medial changes. *Am J Cardiol* 1977; 39: 21-26.

STREETEN BW, LICARI PA. The zonules and the elastic microfibrillar system in the ciliary body. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983; 24: 667-681.

TEMPLETON DM. Proteoglycans in cell regulation. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1992; 29: 141-184.

TEN CATE AR, SYRBU S. A relationship between alkaline phosphatase and the phagocytosis and degradation of collagen by fibroblasts. *J Anat* 1974; 117: 351-359.

TEN CATE AR, DEPORTER DA. The degradative role of the fibroblast in the remodelling and turnover of collagen in soft tissue. *Anat Rec* 1975; 182: 1-14.

THEOCHARIS AD, TSOLAKIS I, HJERPE A, KARAMANOS NK. Human abdominal aortic aneurysm is characterized by decreased versican concentration and specific downregulation of versican isoform V(0). *Atherosclerosis*. 2001;154:367-76.

THEOCHARIS AD, TSOLAKIS I, HJERPE A, KARAMANOS NK. Versican undergoes specific alterations in the fine molecular structure and organization in human aneurysmal abdominal aortas. *Biomed Chromatogr*. 2003;17:411-6.

THYBERG J, PALMBERG L, NILSSON J, KSIAZEK T, SJOLUND M. Phenotype modulation in primary cultures of arterial smooth muscle cell: on the role of platelet derived growth factor. *Differentiation* 1983; 25: 156-167.

TOOLE BP. Hyaluronan and its binding proteins, the hyaladherins. *Curr Op Cell Biol* 1990; 2: 839-844.

TOOLE BP. Proteoglycans and hyaluronan in morphogenesis and differentiation. In: Hay, E.D. (Ed.), *Cell Biology of Extracellular Matrix*, 2 ed. New York: Plenum Press, 1991; 305-334.

USHIKI T, MURAKUMO M. Scanning electron microscopic studies of tissue elastin components exposed by a KOH-collagenase or simple KOH digestion method. *Arch Histol Cytol* 1991; 54(4): 427-436.

VEINOT JP, GHADIALLY FN, WALLEY VM. Light microscopy and ultrastructure of the blood vessels and heart. In: SILVER MD, GOTLIEB AI, SCHOEN FJ. (Ed). *Cardiovascular Pathology*, 3.ed. Churchill Livingstone, 2001, 30-53.

VIJAYAGOPAL P, SRINIVASAN SR, XU JH, DALFERES ER, RHADAKRISHNAMURTHY B, BERENSON GS. Lipoprotein-proteoglycan complexes induce continued cholesteryl ester accumulation in foam cells from rabbit atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1993; 91: 1011-1018.

VIRMANI R, BURKE, AP. Nonatherosclerotic diseases of the aorta and miscellaneous diseases of the mains pulmonary arteries and larges veins. In: SILVER MD, GOTLIEB AI, SCHOEN FJ. (Ed). *Cardiovascular Pathology*, 3.ed. Churchill Livingstone, 2001, 107-137.

VISSE R, NAGASE H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003;92:827-39.

WHITTLE MA, HASLETON PS, ANDERSON JC, GIBBS AC. Collagen in dissecting aneurysms of the human thoracic aorta. Increased collagen content and decreased

collagen concentration may be predisposing factors in dissecting aneurysms. *Am J Cardiovasc Pathol* 1990; 3(4): 311-9.

WIGHT TN. Cell biology of arterial proteoglycans. *Arteriosclerosis* 1989; 9: 1-20.

WIGHT TN, KINSELA MG, QWARNSTRÖM EE. The role of proteoglycans in cell adhesion, migration and proliferation. *Current Opinion in Cell Biol* 1992; 4: 793-801.

WILSON SK, HUTCHINS GM. Aortic dissecting aneurysms. Causative factors in 204 subjects. *Arch Pathol Lab Med* 1982; 106: 175-180.

WILSON CL, MATRISIAN LM. Matrilysin: an epithelial matrix metalloproteinase with potentially novel functions. *Int J Biochem Cell Biol*. 1996;28:123-36.

WISSELER RW. The arterial medial cell smooth muscle or multifunctional mesenchyme? *J Atheroscler Res* 1968; 8: 201-213.

WOLINSKY H, GLACOV S. A lamellar unit of aortic medial structure and function in mammals. *Cir Res* 1967; 20: 99-111.

YANAGISHITA, M. Function of the proteoglycans in the extracellular matrix. *Acta Pathol Jpn* 1993; 7: 1208-1218.

YOSHIDA Y, MITSUMATA M, YAMANE T, TOMIKAWA M, NISHIDA K. Morphology and increased growth rate of Atherosclerotic intimal smooth-muscle cells. *Arch Pathol Lab Med* 1988; 112: 987-996.

YU WH, WOESSNER JF JR. Heparan sulfate proteoglycans as extracellular docking molecules for matrilysin (matrix metalloproteinase 7). *J Biol Chem*. 2000 Feb 11;275(6):4183-91.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)