

1 UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DE MASTÓCITOS NA AORTA
17 DE PACIENTES AUTOPSIADOS

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

LUCIANA SANTOS RAMALHO

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

UBERABA- MG

40

Junho//2010

41

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43

LUCIANA SANTOS RAMALHO

**ANÁLISE MORFOMÉTRICA DE MASTÓCITOS NA AORTA
DE PACIENTES AUTOPSIADOS**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre na Área de Concentração 'Patologia Geral'.

Orientadora: Sanivia Aparecida Pereira Lima
Co-Orientadora: Mara Lúcia da Fonseca Ferraz

UBERABA - MG
Junho/2010

1
2

UFTM – 2010	Luciana Santos Ramalho	Mestrado
-------------	------------------------	----------

R135a Ramalho, Luciana Santos
Análise morfométrica de mastócitos na aorta de indivíduos autopsiados /
Luciana Santos Ramalho. - - 2010.
69 f. : tab. ; graf. ; fig.

Dissertação (Mestrado em Patologia Geral) - Universidade Federal do
Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2010.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sanívia Aparecida de Lima Pereira
Co-orientadora: Prof. Dr^a. Mara Lúcia Fonseca Ferraz

1. Aterosclerose. 2. Mastócitos. 3. Triptases. 4. Quimase. 5. Autopsia. I.
Título. II. Pereira, Sanívia Aparecida de Lima. III. Ferraz, Mara Lúcia
Fonseca.

CDU 616.13-

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39

40 AOs meus pais, Pedro Henrique e Antônia de Lourdes (*in memoriam*), pelo amor e carinho
41 a mim dedicados e exemplo de vida a ser seguido.
42

AGRADECIMENTOS

1
2
3 *A Deus...*
4 *Por me dar saúde e forças para continuar, mesmo quando as dificuldades pareciam*
5 *infindáveis... Por me dar oportunidades para crescer espiritualmente e*
6 *intelectualmente... E, por colocar em meu caminho pessoas tão especiais e*
7 *indispensáveis...*
8 *À minha co-orientadora Mara Lúcia...*
9 *Pela orientação, pelo carinho, pela confiança, pelas preciosas oportunidades oferecidas,*
10 *conselhos bem vindos e pela amizade construída...*
11 *À minha orientadora Sanívia...*
12 *Pelos ensinamentos transmitidos, confiança e cobrança que me fizeram melhorar a cada*
13 *dia...*
14 *Ao Professor Vicente...*
15 *Pelo carinho, ajuda contínua que me ofereceu, e confiança em mim depositada,*
16 *oportunidades oferecidas...*
17 *Aos professores e funcionários da Disciplina de Patologia Geral...*
18 *Pelo agradável convívio, por todos os ensinamentos, pelos auxílios, apoio e pela*
19 *amizade...*
20 *À banca examinadora desta tese...*
21 *Pela gentileza de avaliar este trabalho e contribuir de forma tão importante para*
22 *sua melhoria...*
23 *Aos colegas da pós-graduação...*
24 *Que compartilharam comigo momentos importantes de aprendizado...*
25 *À todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Patologia...*
26 *Pelos indispensáveis conhecimentos adquiridos durante o curso de mestrado.*
27 *Ao meu companheiro Jessênio pela compreensão, amor, e principalmente apoio em todos*
28 *os momentos;*
29 *À minha família pelo apoio incondicional;*
30 *Ao meu pai Pedro, sem o qual não chegaria até este dia, pelo amor, respeito, apoio, por*
31 *infinitamente tudo, e pelo que eu sou hoje.*
32
33 *Muito obrigada!*
34
35

APOIO FINANCEIRO

1
2
3
4
5
6
7
8
9

O presente trabalho foi desenvolvido com os recursos financeiros da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Ensino e Pesquisa de Uberaba (FUNEPU), Fundação de Amparo e Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46

47 *“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,*
48 *qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim...”*

49 *(Francisco Cândido Xavier)*
50

SUMÁRIO

1		
2		
3		
4	Lista de abreviaturas.....	10
5	Lista de figuras.....	11
6	Lista de tabelas.....	12
7	Introdução.....	13
8	1. Artéria aorta.....	13
9	2. Aterosclerose.....	13
10	3. Células inflamatórias na aterosclerose.....	16
11	4. Mastócitos na aterosclerose.....	16
12	Hipótese.....	21
13	Objetivos.....	22
14	Materiais e métodos.....	22
15	1. Avaliação macroscópica do grau de aterosclerose nas aortas.....	22
16	2. Coleta e processamento dos fragmentos.....	25
17	3. Avaliação dos mastócitos corados pelo Giemsa.....	27
18	4. Quantificação do depósito lipídico.....	28
19	5. Quantificação do colágeno.....	29
20	6. Realização da imunohistoquímica Anti-quimase e Anti-triptase.....	31
21	7. Determinação da densidade de mastócitos imunomarcados.....	31
22	8. Análise estatística.....	33
23	Resultados.....	34
24	Discussão.....	39
25	Conclusão.....	43
26	Resumo.....	44
27	Abstract.....	45
28	Referências bibliográficas.....	46
29		

LISTA DE ABREVIATURAS

- 1
- 2
- 3 CT: Colesterol total
- 4 CE: Células endoteliais
- 5 CML: Células musculares lisas
- 6 DAB: Diaminobenzidina
- 7 EC: Células espumosas
- 8 HDC: Histidina descarboxilase
- 9 HDL: Colesterol de lipoproteína de alta densidade
- 10 IL-4: Interleucina 4
- 11 IL-5: Interleucina 5
- 12 IL-10: Interleucina 10
- 13 IL-2: Interleucina 2
- 14 IFN- α : Interferon α
- 15 LDL: Colesterol de lipoproteína de baixa densidade
- 16 MMP: Metaloproteinases
- 17 NK: Natural Killers
- 18 PBS: *Phosphate Buffered Saline* (Tampão Fosfato Salino)
- 19 SCF: *Stromal Cells Factor* (Fator de células estromais)
- 20 Th1: Linfócito T Help 1
- 21 Th 2: Linfócito T Help 2
- 22 Th 3: Linfócito T Help 3
- 23 TGF- β : *Transforming Growth Factor* (Fator de crescimento transformante- β)
- 24 TG: Triglicérides
- 25 TNF- α : Fator de necrose tumoral α
- 26 TNF- β : Fator de necrose tumoral β
- 27

LISTA DE FIGURAS

1		
2		
3	Figura 1. Análise macroscópica das aortas de pacientes autopsiados.....	12
4	Figura 2. Processamento histológico dos fragmentos coletados.....	14
5	Figura 3. Mastócitos em aortas coradas pelo Giemsa.....	15
6	Figura 4. Aorta coradas pelo Sudan Vermelho.....	16
7	Figura 5. Quantificação do colágeno.....	18
8	Figura 6. Mastócitos imunomarcados.....	20
9	Figura 7. Determinação da área dos fragmentos utilizando o programa Image J.....	20
10	Figura 8. Correlação entre a idade e a densidade de mastócitos corados pelo Giemsa.....	24
11	Figura 9. Correlação entre densidade de mastócitos corados pelo Giemsa e intensidade da	
12	lesão aterosclerótica da aorta.....	24
13	Figura 10. Correlação entre densidade de mastócitos quimase e intensidade da lesão	
14	aterosclerótica da aorta.	25
15	Figura 11. Correlação entre a densidade de mastócitos quimase e a porcentagem de	
16	colágeno.....	25
17	Figura 12. Correlação entre a densidade de mastócitos triptase e a porcentagem de	
18	colágeno.....	26
19	Figura 13. Correlação entre a densidade de mastócitos triptase e a porcentagem de depósito	
20	lipídico.....	26
21		

LISTA DE TABELAS

1
2
3
4
5
6
7
8

Tabela 1. Distribuição das características demográficas dos 141 pacientes autopsiados, cujas aortas foram avaliadas.....	22
Tabela 2. Densidade de mastócitos em relação ao gênero, a cor e a causa de morte analisada em aortas de pacientes autopsiados.....	23

1 INTRODUÇÃO

2

3 1. Artéria aorta

4

5 A aorta é a principal artéria sistêmica do corpo humano (RICE, et al., 2007). Como
6 os demais vasos sanguíneos, a aorta apresenta origem mesodérmica e inicia sua formação
7 na terceira semana do desenvolvimento do organismo. A aorta emerge do coração e pode
8 ser dividida em raiz da aorta, aorta ascendente, arco da aorta e aorta descendente
9 (GARDNER, 1999). É formada por três camadas: a túnica íntima formada por epitélio
10 sustentado por pequena quantidade de tecido conjuntivo frouxo, a túnica média que
11 consiste em porções variáveis de músculo liso e tecido elástico e a túnica externa ou túnica
12 adventícia, que é composta tanto de fibras colágenas quanto de fibras elásticas. Esta artéria
13 pode ser acometida por estrias lipídicas que podem evoluir a longo prazo para as placas
14 ateroscleróticas originando a doença aterosclerose (GARDNER, 1999).

15

16 2. Aterosclerose

17

18 Etimologicamente, a palavra aterosclerose vem do grego *athero* - papa, mingau - e
19 *sclerosis* – endurecimento. O termo foi criado por Marchand, em 1904, para descrever a
20 esclerose vasal que era acompanhada de depósitos gordurosos (DUQUE, 1998). A
21 aterosclerose é uma doença crônica que atinge vasos sanguíneos periféricos e centrais,
22 podendo ser considerada um estado inflamatório ativo, cujas lesões têm evolução longa e
23 gradual (KRAUSE, et al., 2007). Os precursores primordiais de lesões obstrutivas são
24 descritos como pequenos depósitos lipídicos na íntima de recém nascidos. Segmentos de
25 espessamento intimal, que tendem a conter acúmulos de lipídeos, estão também presentes
26 desde o nascimento, particularmente, em bifurcações. Assim a aterogênese é um processo
27 que se inicia nas fases precoces da vida. Estudos anátomo-patológicos demonstraram
28 lesões iniciais da aterosclerose na parede arterial de pacientes já no seu primeiro ano de
29 vida. Com o tempo, principalmente nas três primeiras décadas, mais lipídeos tendem a se
30 acumular nessas regiões, o que pode transformar o espessamento adaptativo em
31 obstruções, as quais podem causar sintomas. Esse processo é acentuado pela presença de
32 fatores de risco cardiovasculares como tabagismo, etilismo, sedentarismo e consumo
33 excessivo de gorduras (STARY et al., 1994).

1 A doença aterosclerótica é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em
2 adultos de todo o mundo, com tendência a acometer pessoas mais jovens nos países em
3 desenvolvimento (GIULIANO, et al., 2005), contribuindo para uma taxa de mortalidade e
4 morbidade no mundo ocidental que ultrapassa a de qualquer outra doença (SCHOEN e
5 COTRAN, 2000). Na aterosclerose, o baixo peso ao nascimento está associado à
6 disfunção endotelial em adultos jovens (25 a 35 anos), que mesmo com baixa incidência de
7 fatores de risco podem ser importantes na patogênese da aterosclerose ao longo do
8 envelhecimento do paciente (LESSON et al., 2001). Em populações diferentes, as lesões
9 ateromatosas progridem com a idade nos dois gêneros. A prevalência e a progressão das
10 lesões da aterosclerose revela variações geográficas expressivas entre as populações das
11 América, Europa e África. Esse fato está relacionado às diferenças raciais ou às mudanças
12 genéticas nos fatores de risco e estilo de vida das pessoas (BRASILEIRO FILHO et al.,
13 2004; TAKEI et al., 2005).

14

15 *Patofisiologia da aterosclerose*

16

17 Têm sido descritos vários fatores de risco para o desenvolvimento aterogênico,
18 como o aumento dos níveis de triglicerídeos (TG), de colesterol total (CT) e de colesterol
19 de lipoproteína de baixa densidade (LDL-colesterol); a diminuição do colesterol de
20 lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol); a hipertensão; a diabetes; o tabagismo e a
21 inatividade física. Dentre esses fatores, o perfil lipídico tem sido amplamente estudado pela
22 sua elevada associação com a aterogênese (KRAUSE et al., 2007).

23

24 A aterosclerose é uma doença que se inicia na camada íntima das artérias, região
25 que carece de capilares, vasos linfáticos e nervos. No entanto, nas fases finais de
26 desenvolvimento da lesão a camada adventícia também contribui para o desenvolvimento
27 da doença, transformando a íntima em uma camada espessada com formações
28 neovasculares originários da *vasa vasorum* (pequenos vasos sanguíneos que irrigam a
29 adventícia das artérias) (KOVANEN et al., 2007; Barger, et al., 1984). A hipótese de que a
30 oxidação da LDL é o evento inicial na aterogênese, ao invés de entrada de monócitos do
31 sangue, tem recebido apoio através de estudos em fetos humanos que demonstraram sinais
32 de oxidação da LDL na ausência da íntima e de macrófagos nas mesmas áreas (NAPOLI,
33 et al., 1997). Nessa fase muito precoce da vida, quando as partículas de LDL entram na
34 íntima arterial, encontram células endoteliais (CE) e células musculares lisas (CML), que
devem ser as responsáveis pela oxidação das LDL locais. Mais tarde, monócitos do sangue

1 também participam do processo, se convertendo em macrófagos e fagocitando as partículas
2 de LDL oxidadas (UPSTON, et al. 2002).

3 Na camada íntima subendotelial as partículas de LDL se vinculam aos
4 proteoglicanos subendoteliais permanecendo imóveis dentro da matriz extracelular por
5 longo período (HEVONOJA et al., 2000). Enquanto permanecer na matriz extracelular
6 subendotelial as partículas de LDL ficam expostas não só a agentes oxidantes, mas também
7 à uma variedade de enzimas hidrolíticas secretadas pelas CEs, SMLs, e macrófagos
8 (HAKALA et al., 2003). A modificação das partículas de LDL por oxidação ou por
9 enzimas induz inflamação local, induzindo à produção de citocinas quimiotática de
10 macrófagos secretada por CEs ativadas e CMLs e pelos próprios macrófagos (HANSSON,
11 2005).

12 Os macrófagos fagocitam as gotículas lipídicas, ficando o citoplasma cheio de
13 gotículas de éster de colesterol, assemelhando-se à 'espuma', quando examinadas por
14 microscopia eletrônica ou por microscopia de luz, sendo chamadas de células espumosas
15 (EC) (UPSTON, et al., 2002). As ECs repousam sob a transparente camada de CE e dão à
16 superfície interna do vaso uma aparência amarelada. Essas áreas amareladas são chamadas
17 estrias gordurosas, que não chegam a obstruir e nem provocar formação de trombos no
18 vaso. São clinicamente silenciosas (STARY et al., 1995) e são as precursoras das
19 verdadeiras lesões da aterosclerose, ou ateromas, também chamadas de placas
20 ateroscleróticas. Nos ateromas, os ésteres de colesterol estão acumulados, não apenas em
21 EC, mas também no espaço extracelular da íntima, que juntamente de derivados lipídicos
22 LDL-derivados e uma fração oriunda de EC necrosadas formam um núcleo lipídico
23 extracelular macio (STARY, 2000). O núcleo lipídico necrótico é separado da circulação
24 por uma cápsula de colágeno. A cápsula é composta por densa matriz extracelular rica em
25 colágeno tipo I (DUQUE, 2003).

26 As placas ateroscleróticas avançadas variam na arquitetura. A lesão pode ser sólida
27 fibrosa com pequeno núcleo lipídico e uma cápsula espessa ou grande núcleo lipídico rico
28 em lipídios moles e uma fina cápsula. Uma placa com cápsula espessa é essencialmente
29 estável, enquanto que uma placa com uma fina cápsula é propensa à ruptura (LIBBY,
30 1995). No local da ruptura, torna-se exposto o tecido subendotelial trombogênico,
31 originando trombos ricos em plaquetas. Tal placa trombo-coberta é chamada de placa
32 complicada, podendo causar complicações clínicas, tais como angina instável e infarto do
33 miocárdio (FUSTER et al., 2005). Se uma placa complicada é rompida, pode cair na

1 circulação e chegar por exemplo a uma árvore arterial intra-cerebral e finalmente causar
2 obstrução e acidente vascular cerebral isquêmico (KOVANEN, et al., 2000).

3 Células inflamatórias estão envolvidas na patogênese da ruptura das placas
4 ateroscleróticas, através do enfraquecimento da placa fibrótica devido a alta atividade das
5 enzimas produzidas por estas células, que degradam a matriz extracelular. (ATIKNSON et
6 al., 1994; BOT et al., 2007; TSURUDA et al., 2006).

7

8 **3. Células inflamatórias na aterosclerose**

9

10 A lesão aterosclerótica contém grande número de células imunológicas,
11 particularmente macrófagos e células T, que são recrutadas para a parede vascular no início
12 da aterosclerose através da expressão de moléculas de adesão no endotélio. Muitos
13 experimentos em ratos e em humanos têm sustentado a hipótese de que mecanismos
14 imunológicos estão envolvidos na aterosclerose (HANSSON, 2006).

15 Os macrófagos representam o componente inflamatório mais importante na
16 aterosclerose sendo encontrados em lesões discretas e avançadas (LINDSTEDT, et al.,
17 2004). Os macrófagos são os protagonistas da inflamação e da resposta imune inata. Sua
18 ação depende da capacidade de produção de radicais livres de oxigênio, proteases, fatores
19 complemento e citocinas. Os macrófagos podem ainda iniciarem a resposta imune
20 adaptativa apresentando antígenos para os linfócitos T. Todas estas atividades são
21 importantes na aterogênese (HANSSON, 2001).

22 Dentre os linfócitos T, muitos subtipos são encontrados na lesão aterosclerótica:
23 CD3, CD4, CD8, T help , B e Natural Killers (NK). Muitos deles são T help1 (Th1) que
24 secretam IFN- α , IL-2, TNF α e β , causando ativação de macrófagos, ativação vascular e
25 inflamação. Já as citocinas dos linfócitos Th 2 (IL-4, IL-5, IL-10) são menos abundantes
26 no estágio final das lesões que as do linfócito Th1. O linfócito Th3 produz TGF- β que
27 estimula a síntese de colágeno e fibrose (HANSSON, 2001).

28 Dentre as células inflamatórias os mastócitos também tem participação importante
29 na patogênese da placa aterosclerótica e suas complicações (BOT et al., 2007).

30

31 **4. Mastócitos na aterosclerose**

32

33 A característica mais marcante dos mastócitos é que o seu citoplasma é preenchido
34 com grânulos metacromáticos densos que se coram de vermelho ou violeta quando tratados

1 com corantes básicos à base de anilina. Usando esta “metacromasia”, Ehrlich em 1878, foi
2 o primeiro a descrever morfologicamente os mastócitos denominando-os de *mast cells* ou
3 *mastzellen* (*maestung* - a raiz da palavra mastigação em inglês cuja forma ativa *Measten*
4 ainda está em uso) por acreditar que estes grânulos eram o produto de superalimentação.
5 Ehrlich também observou a tendência de mastócitos se associarem aos vasos sanguíneos,
6 nervos e ductos glandulares. Estas observações contribuíram para o Prêmio Nobel de
7 Ehrlich em Medicina em 1908. Em 1894, Unna descreveu que as lesões cutâneas
8 denominado urticária pigmentosa (UP) estavam associadas ao aumento de mastócitos logo
9 abaixo de cada lesão. A partir daí ficou definido que os mastócitos podem ser encontrados
10 tanto em tecidos normais como naqueles com inflamação (METCALFE, 2008).

11 Os mastócitos são originados de células multipotentes da medula óssea
12 hematopoética que caem na circulação sanguínea, migram para o tecido onde se
13 proliferam, diferenciam-se e tornam-se residentes (FILIPPIS, et al., 2008; METCALFE,
14 2008). São distribuídos em todos os órgãos e tecidos vascularizados do corpo, como pele,
15 trato gastrointestinal, vias aéreas, cérebro, peritônio e folículos do cabelo. Essa diversidade
16 de distribuição é associada à heterogeneidade dos mastócitos (KINET, 2007).

17 Seus grânulos contém principalmente histamina, proteases neutras e proteoglicanos
18 da heparina. A histamina pode estar envolvida nas mudanças da permeabilidade associada
19 a aterosclerose, pois anti-histamínicos demonstraram efeitos anti-aterogênicos
20 (ATIKNSON, et al., 1994). Os mastócitos são as primeiras células imunes que
21 consideravelmente estimulam o processo inflamatório com rápida liberação de mediadores
22 pró-inflamatórios e vasodilatadores como histamina, TNF- α e fatores quimiotáticos de
23 eosinófilos, neutrófilos e basófilos (FILIPPIS, et al., 2008).

24 Estudos *in vivo* e *in vitro* sugerem que os mastócitos têm papel importante de
25 recrutamento de células inflamatórias na placa aterosclerótica através da liberação de
26 quimiocinas que atraem leucócitos. Mediadores como triptase, TNF- α e histamina,
27 estimulam ainda as células endoteliais a expressarem moléculas de adesão responsáveis
28 pelo recrutamento (SUN, et al., 2007). Os mastócitos exercem também efeitos fibrogênicos
29 por liberação de histamina, triptase (TSURUDA, et al., 2006) e quimase (DOGGRELL, et
30 al., 2004). A produção de TGF- β pelos mastócitos juntamente com TNF- α tem potencial
31 de induzir a infiltração de monócitos na placa aterosclerótica. Os mastócitos também
32 regulam o funcionamento de várias células dos vasos sanguíneos como as células
33 musculares lisas e endoteliais (LINDSTEDT, et al., 2004; KINOSHITA, et al., 2005).

1 Quando estimulados, os mastócitos migram para o local da lesão inflamatória,
2 sendo que a quimiocina responsável por essa migração é o *Stromal Cells Factor* (SCF)
3 produzido por células mesenquimais do tecido, como os fibroblastos. Este fator foi
4 detectado em células endoteliais e musculares lisas da íntima das artérias humanas
5 sugerindo ser responsável pela migração de mastócitos para a íntima das artérias aorta e
6 coronárias (KOVANEN, 2007).

7 8 *Proteases quimase e triptase*

9
10 Originalmente, os mastócitos foram divididos fenotipicamente em dois tipos de
11 acordo com as proteases neutras citoplasmáticas: os que contém triptase e os que contém
12 triptase e quimase. Os mastócitos que contém triptase e um pouco ou nenhuma quimase
13 são mais encontrados nas mucosas, principalmente das vias aéreas e trato gastrointestinal.
14 Os mastócitos que contém triptase, quimase, carbossipeptidase e catepsina G estão
15 presentes nos tecidos conjuntivos da pele, do peritônio, dos tecidos perivasculares e das
16 membranas sinoviais. Porém outro subtipo tem sido identificado, sendo aqueles mastócitos
17 que para alguns autores contém quimase e carbossipeptidase (FILIPPIS et al., 2008) e para
18 outro autor esses mastócitos contém quimase e catepsina G (METCALFE, 2008), podendo
19 ser encontrados em diferentes localizações. Na íntima da aorta humana e da artéria
20 coronária, a maior parte dos mastócitos contém triptase e quimase simultaneamente
21 (KOVANEN, et. al, 2007).

22 O papel fisiológico da quimase e da triptase ainda é incerto e suas atividades não
23 são observadas em tecidos normais e sim em tecidos com lesão como por exemplo a
24 aterosclerose (TAKAI, et al., 2004). Nos macrófagos, o efluxo de HDL previne o acúmulo
25 de colesterol. Mas as proteases neutras dos mastócitos degradam as HDL, tornando-o
26 incapaz de remover o colesterol de dentro dos macrófagos espumosos (DOGGRELL, et al.,
27 2004; LEE, et al., 2002). A quimase participa da síntese da angiotensina II, que nesse caso
28 não está envolvida na regulação da pressão sanguínea. Provavelmente está envolvida no
29 remodelamento estrutural associado a doenças do sistema cardiovascular (DOGGRELL, et
30 al. 2004). A quimase, além disso, pode modificar a proteína LDL em LDL oxidada,
31 facilitando o acúmulo dessas proteínas no interior dos macrófagos (PAANAMEN, et al.,
32 1994).

33 A quimase e a triptase parecem estar envolvidas também no processo de ruptura e
34 erosão da placa aterosclerótica. Os sítios com placa aterosclerótica contém elevado número

1 de mastócitos ativados em degranulação. As proteases liberadas em presença de TNF-
2 α levam à apoptose de células musculares lisas, epiteliais e miócitos. Também degradam a
3 fibronectina e vibronectina, que compõe a matriz extracelular e são necessárias para a
4 adesão das células, ou então ativam metaloproteinases (MMPs), que por sua vez degradam
5 a matriz extracelular (HEIKKILÄ, et al., 2008). Estas proteases podem ativar também o
6 TGF- β , que inibe o crescimento de células musculares lisas nas artérias, (DOGGRELL, et
7 al., 2004; DELIARGYRIS et al., 2005; LESKINEN, et al., 2003; LINDSTEDT, et al.,
8 2004), e inibe a produção de fibronectina que mantém as CMLs aderidas entre si,
9 facilitando a migração dessas células para a íntima e média (WANG, et al., 2001).

10 Estudos *in vitro* mostraram que quando adicionado SCF em cultura contendo
11 precursores de mastócitos, existe forte expressão de mastócitos triptase e pouca expressão
12 de mastócitos quimase. O desenvolvimento de mastócitos em quantidades significativas
13 somente acontece quando em presença de camada de células estromais. O que sugere que
14 além do SCF alguns cofatores produzidos pelas células da íntima são necessários para a
15 expressão da quimase, o que sugere que as CE podem modificar o fenótipo dos mastócitos.
16 Além disso a IL-4 juntamente com SCF promove a conversão de mastócitos triptase em
17 mastócitos triptase/quimase (KOVANEN, 2007).

18 Estudos demonstram mastócitos em áreas com lesão aterosclerótica avançada
19 (TSURUDA et al., 2006). Os mastócitos ativados têm sido encontrados abundantemente na
20 adventícia durante a progressão da placa ateromatosa, e também na íntima das artérias,
21 influenciando na vulnerabilidade das placas ateroscleróticas e colaborando para a ruptura e
22 erosão da placa (BOT et al., 2007). Portanto, os mastócitos são instrumentos importantes
23 na reação inflamatória presente na placa aterosclerótica, participando ativamente deste
24 processo (KINET, 2007). A triptase, juntamente com TNF- α e histamina, pode ativar as
25 CE a expressar moléculas de adesão que vão recrutar outras células inflamatórias
26 (LINDSTEDT, et al., 2004). A triptase estimula a formação de MCP-1, proteína
27 quimiotática de monócitos produzida pelas células endoteliais e de IL-8, potente
28 quimiotático de neutrófilos (KINOSHITA et al., 2005).

29 Os mastócitos podem ser ativados por meio de IgE, por fatores e histamina
30 liberados por macrófagos ou linfócitos T vizinhos, ou por componentes do sistema
31 complemento (C3a, C5a). Quando ativados iniciam a degranulação que é o processo de
32 exocitose dos componentes dos seus grânulos. Existem mais mastócitos ativados e

1 degranulados em áreas com placa aterosclerótica e cápsula fibrosa quando comparadas
2 com íntimas normais (LESKINEN, et al., 2003).

3 Estudo realizado em aortas de ratos, que por mutação genética não desenvolvem
4 mastócitos, demonstrou menor lesão aterosclerótica após ingestão de dieta rica em gordura.
5 As lesões ateroscleróticas apresentaram menor número de macrófagos, de linfócitos T
6 CD4⁺, de células proliferativas Ki67 e de células em apoptose o que sugere que os
7 mastócitos e seus mediadoras regulam diretamente os tipos de células envolvidas na
8 aterogênese (SUN et al., 2007).

9 Assim, os mastócitos exercem papel fundamental na fisiopatogênese da
10 aterosclerose, contribuindo ativamente para sua evolução. Podem até agravar a
11 aterosclerose de acordo com a quantidade de mastócitos envolvidos e também o tipo de
12 mastócito presente no tecido (KINET, 2007).

13 Portanto, os processos envolvidos na aterogênese e formação de fibroateromas
14 ainda não são totalmente conhecidos, assim como a função exata das proteases produzidas
15 pelos mastócitos. Daí a necessidade de estudos que avaliem os mastócitos nas placas
16 ateroscleróticas, o que funcionaria como mais um método para avaliar a evolução,
17 prognóstico e prevenção da aterosclerose e suas consequências.

18

1 **HIPÓTESE**

2

3 Existe o aumento da quantidade de mastócitos em aortas de pacientes com causa de
4 morte cardiovascular e com grau de aterosclerose e idade avançados.

1 **OBJETIVOS**

2

3 Quantificar mastócitos na aorta de adultos autopsiados e associar a densidade
4 dessas células com a idade, a cor, o gênero, o grau de aterosclerose, a causa de morte, a
5 porcentagem de depósito lipídico e a porcentagem de colágeno.

6

1 **MATERIAIS E MÉTODOS**

2

3 Após a aprovação pelo Comitê de Ética em Humanos da Universidade Federal do
4 Triângulo Mineiro (UFTM) foram coletados fragmentos de aortas de 141 pacientes
5 autopsiados pela Disciplina de Patologia Geral, Uberaba – MG, no período de 1963 a
6 2008. Foram selecionados pacientes com idade entre 18 e 85 anos, sendo coletados dados
7 relativos à idade, ao gênero, à cor e à causa de morte nos laudos de autópsias.

8

9 **1. Avaliação macroscópica do grau de aterosclerose nas aortas**

10 Inicialmente a intensidade da aterosclerose foi classificada macroscopicamente
11 em discreta, moderada ou acentuada de acordo com os depósitos lipídicos. Posteriormente,
12 foi avaliado o grau de aterosclerose com o auxílio de uma escala padronizada de 0,0 cm a
13 12,0 cm. O grau de aterosclerose foi transferido a uma escala não milimetrada, de forma
14 subjetiva registrando um ponto na escala. Em seguida, com o auxílio de uma régua, mediu-
15 se a distância de 0,0 cm ao ponto marcado na escala. A intensidade da aterosclerose foi
16 classificada em discreta de 0,1 cm a 4,0 cm, moderada de 4,1 cm a 7,0 cm e acentuada de
17 7,1 a 12,0 cm. Para esta avaliação foi considerada a extensão das placas ateromatosas, a
18 intensidade de fibrose e de calcificação. A avaliação foi realizada por um examinador
19 treinado que não conhecia os dados daquele material (Figura 1 A, B).

20

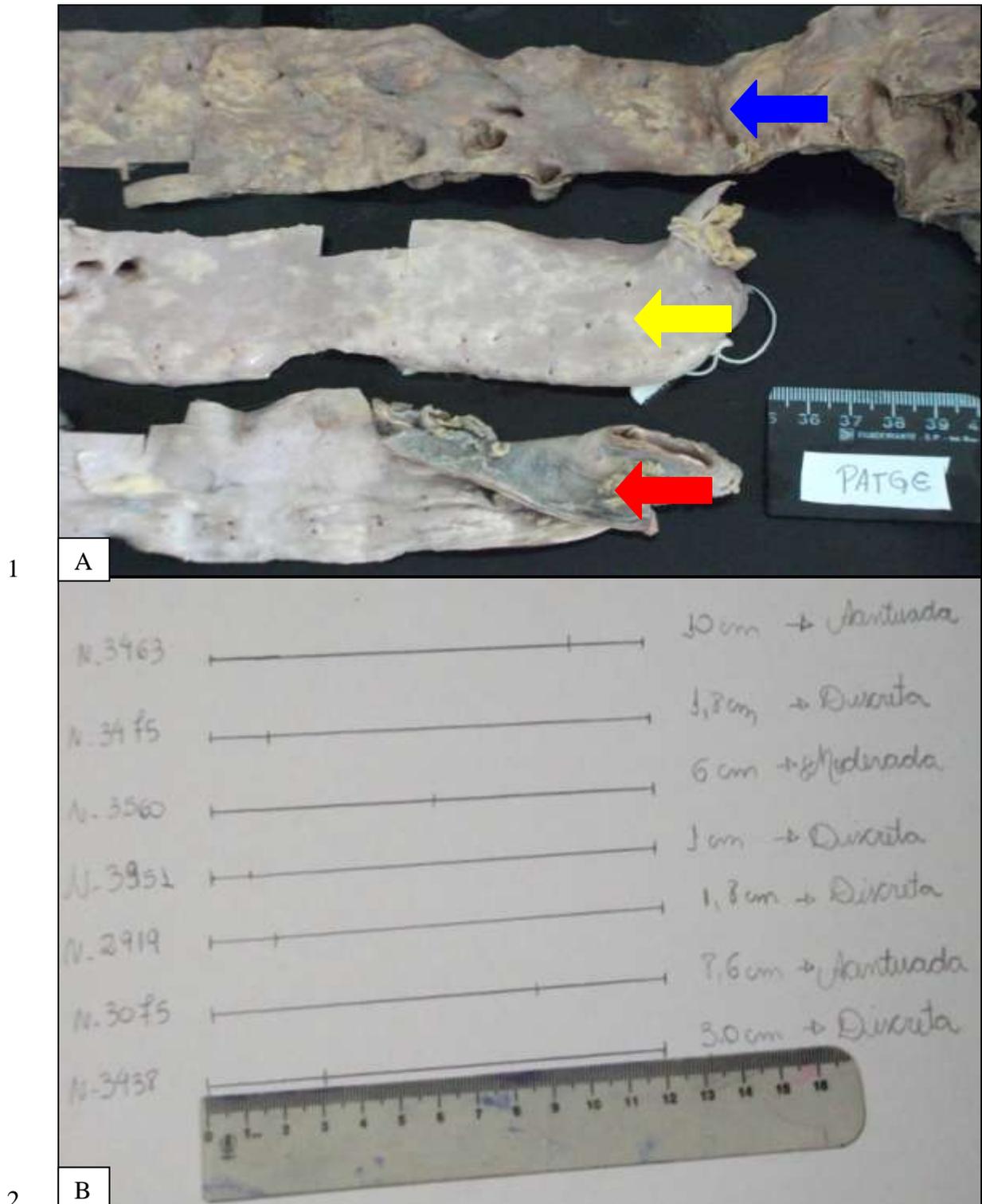


Figura 1. A- Análise macroscópica das aortas de pacientes autopsiados: Aorta com lipidose (seta amarela), aorta com aterosclerose moderada (seta vermelha), aorta com aterosclerose acentuada (seta azul) B - Marcação da intensidade de aterosclerose utilizando uma régua.

1 **2. Coleta e processamento dos fragmentos**

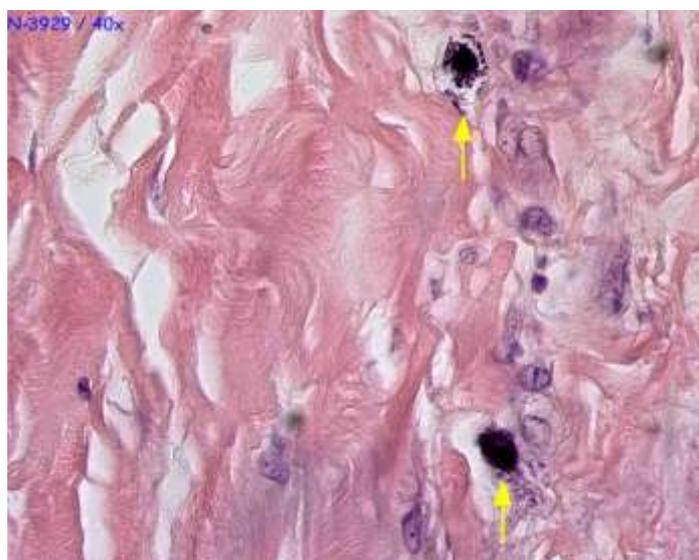
2 De cada caso foi coletado um fragmento de aorta, no sentido transversal, medindo
3 aproximadamente 2x2 cm. Esses fragmentos que já estavam fixados em formaldeído 3,7%,
4 foram desidratados em álcool, diafanizados em xilol e incluídos em parafina.
5 Posteriormente foram realizados 6 cortes de 4 µm, sendo as lâminas coradas pelo Giemsa,
6 Picro-sírius. As demais lâminas foram utilizadas para realização da imunohistoquímica
7 (Figura 2 A, B, C, D e E). Para coloração de Picro-sírius foi utilizada solução aquosa
8 saturada de ácido pícrico adicionada de 0,1g% de vermelho da Síria F3b, Sirius red F3B-
9 Bayer e contra-coloração pela Hematoxilina de Harris. Para a coloração de Sudan
10 Vermelho os fragmentos de aortas previamente fixados em formaldeído foram lavados
11 com tampão (Solução de Salina Tamponada (PBS) e congelados a temperatura de 180°C
12 em nitrogênio líquido para confecção do bloco. Posteriormente, foram realizados cortes
13 seriados de 8 µm de espessura no criostato a temperatura de -23°C. Deste material
14 congelado foi confeccionado uma lâmina e realizado a coloração pelo Sudan Vermelho
15 para quantificação do depósito lipídico (álcool 70% (50ml), acetona PA (50ml) e Sudan III
16 até saturar com contra-coloração pela Hematoxilina de Harris.
17



Figura 2. A- Corte do fragmento da aorta para processamento histológico. B-Fixação do fragmento em formaldeído 3,7%. C- Inclusão do fragmento em parafina. D- Micrótomo (a) e banho Maria (b) para preparo das lâminas. E – Bateria de coloração.

1 3. Avaliação dos mastócitos corados pelo Giemsa

2 Para a determinação da densidade de mastócitos foi calculada a área de cada
3 fragmento. Para isso as lâminas foram fotografadas juntamente com uma régua. Em
4 seguida utilizando o programa Image J, os fragmentos foram contornados para obtenção da
5 área de cada corte, sendo expressa em cm^2 . Posteriormente os mastócitos foram
6 quantificados nas camadas íntima, média e adventícia da aorta em aumento final de 500x
7 em toda extensão do corte (Figura 3). Com a área do corte e o número de mastocitos
8 calculamos a densidade de mastócitos (número de mastócitos por cm^2).
9
10

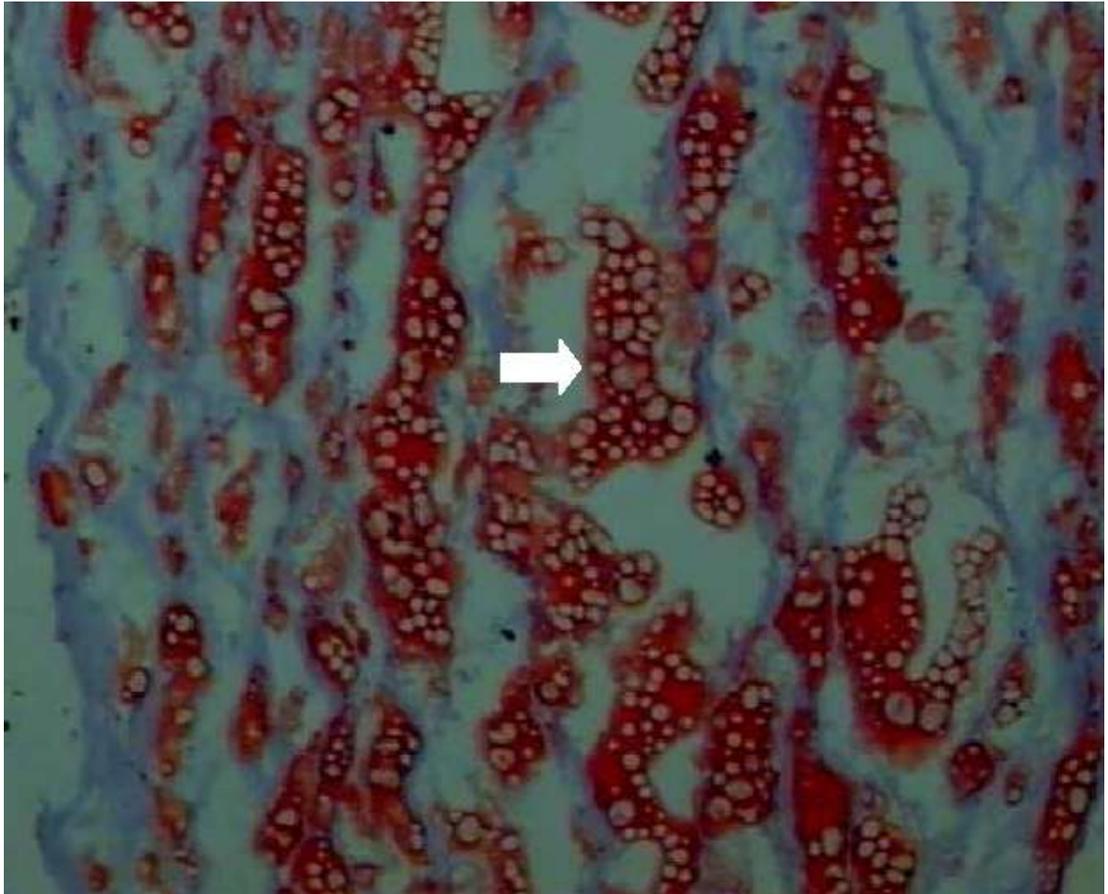


11
12 **Figura 3.** Corte histológico do fragmento da camada adventícia da aorta em que observa-
13 se mastócitos (setas) [Giemsa, 3200x].

14

1 4. Quantificação da porcentagem de depósito lipídico

2 Essa quantificação foi realizada com objetiva de 20x utilizando-se o programa KS
3 300 *Kontron-Zeiss*. O campo a ser quantificado foi capturado por meio de uma câmara
4 acoplada ao microscópio e ao computador para digitalização da imagem. Logo após, a área
5 de depósito lipídico positiva pelo Sudan Vermelho foi marcada pelo observador para obter
6 o percentual do depósito por área do campo analisado (Figura 4).



7
8 **Figura 4:** Corte histológico do fragmento da camada íntima da aorta onde se observa
9 depósito lipídico (seta) [Sudan Vermelho, 800x].
10

1 **5. Quantificação do colágeno**

2 A quantificação do colágeno foi realizada na camada íntima da aorta nas lâminas
3 coradas por Picro-sírius, sendo examinadas sob luz polarizada com objetiva de 5, 10 ou
4 40x de acordo com a espessura da camada. Para esta quantificação todos os campos do
5 corte foram digitalizados. A morfometria foi feita com o sistema analisador de imagens
6 semi-automático “Image J 1.32j (National Institutes of Health, USA). Dessa forma, a
7 imagem do campo a ser quantificado foi digitalizada utilizando uma câmera acoplada ao
8 microscópio. Por esse método, o colágeno mostra-se birrefringente. O colágeno tipo I,
9 presente no tecido cicatricial, produto final quando o tecido se cicatriza por reparação,
10 apresenta fibras grossas, com coloração variando do amarelo-alaranjado ao vermelho. E o
11 colágeno tipo III produzido por fibroblastos jovens antes do colágeno tipo I, que é mais
12 elaborado, está presente em tecidos de granulação (reticulina) se apresenta formado por
13 fibras finas, pouco compactadas, corando do amarelo-esverdeado ao verde (COIMBRA, et
14 al., 2008). A área de colágeno foi marcada para obter-se o percentual de colágeno por área
15 do campo analisado (Figura 5 A, B, C e D).

16

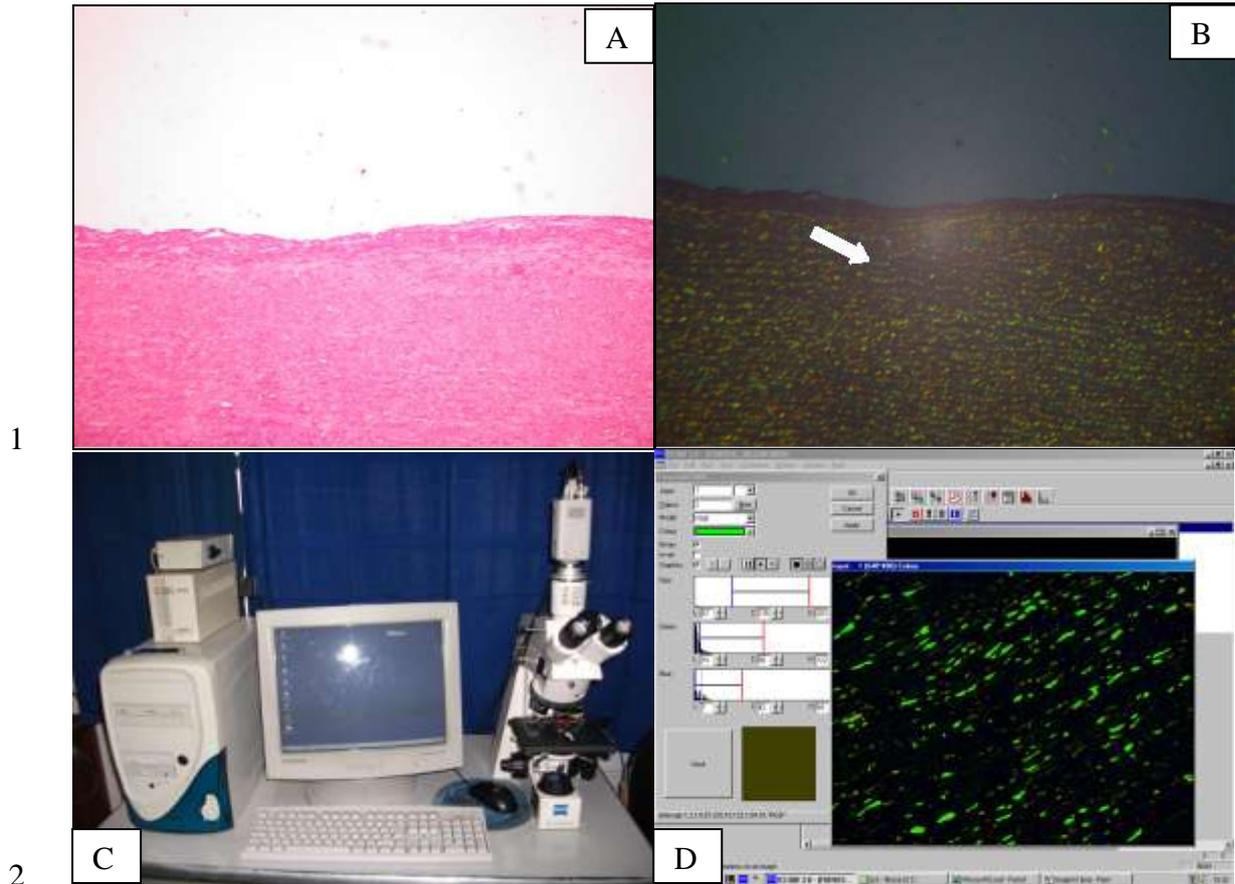


Figura 5: A- Corte histológico do fragmento da camada íntima da aorta examinado sob luz comum [Picro-sírius, 200x]; B - Corte histológico do fragmento da camada íntima da aorta observado sob luz polarizada em onde podemos observar fibras de colágeno birrefringentes (seta) [Picro-sírius, 200x]; C- Microscópio acoplado à câmera para digitalização das lâminas; D- Marcação do colágeno no programa KS300 para quantificação desse colágeno em porcentagem.

1 **6. Realização da imunohistoquímica Anti-quimase e Anti-triptase**

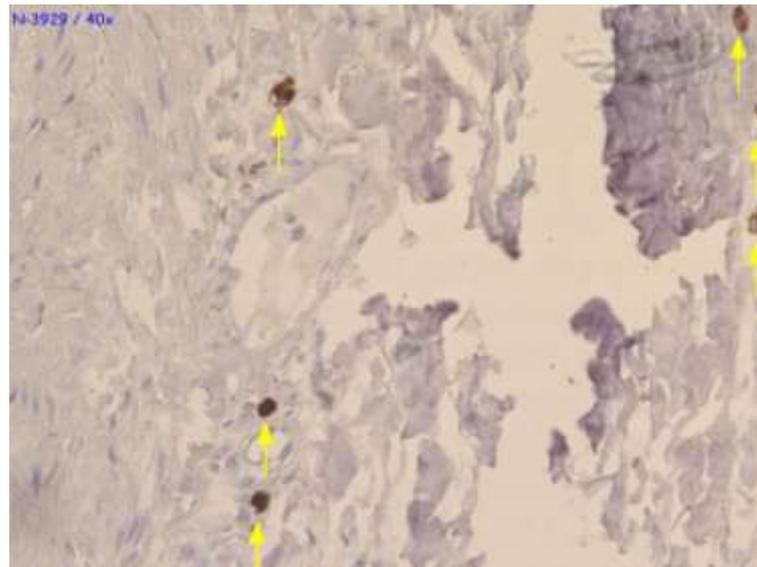
2 Foram utilizados os anticorpos anti-quimase (DBS, 1:1000) e anti-triptase (DBS,
3 1:1000) para a marcação dos mastócitos. Em lâminas silanizadas com poli-L-lisina foram
4 colocados os cortes em blocos de parafina de 2 μm . Foram imersas em xilol para retirar a
5 parafina sendo posteriormente hidratada em álcoois em concentrações decrescentes até
6 água destilada. Em uma panela a vapor a 97°C as lâminas foram embebidas em solução de
7 tampão citrato por 30 minutos e, logo após, resfriadas em temperatura ambiente por mais
8 30 minutos. O material foi lavado em água destilada rapidamente. A peroxidase endógena
9 foi inibida com H_2O_2 10V, 3 vezes por 5 min, em temperatura ambiente, ao abrigo da luz.
10 Posteriormente foi realizada lavagem em água rapidamente e em solução de Tampão
11 Fosfato Salino (PBS) 5 min. Os anticorpos primários foram reconstituídos e diluídos em
12 solução de PBS e albumina e incubados em câmara úmida e escura e deixados “*over night*”
13 a 8°C. Posteriormente, lavou-se novamente em água destilada rapidamente e depois em
14 solução de PBS 5 min. Os anticorpos secundários foram incubados por 1 hora à
15 temperatura ambiente em câmara úmida. Em seguida foi lavado em solução de PBS e
16 depois colocado em PBS por 5 min. Incubou-se em peroxidase por uma hora à temperatura
17 ambiente em câmara úmida. Lavou-se em solução de PBS 5 min. Incubou-se com
18 diaminobenzidina (DAB) por 10 minutos à temperatura ambiente e câmara úmida (100 μl
19 DAB + 15 μl de H_2O_2). As lâminas foram lavadas com água destilada para inativar o DAB,
20 contracoradas com Hematoxilina de Harris e montadas com lamínula e Enthelan[®].

21

22 **7. Determinação da densidade de mastócitos imunomarcados**

23 A análise morfométrica dos mastócitos imunomarcados foi realizada através de
24 microscópio de luz comum quantificando-se os mastócitos em toda a extensão do corte nas
25 três camadas da aorta, utilizando aumento final de 500x (Figura 6). Posteriormente a área
26 do corte foi calculada no programa image J com as fotografias das lâminas prontas,
27 contornando os cortes com auxílio de um cursor. Dessa forma foi possível calcular a
28 densidade de mastócitos, sendo expressa número de mastócitos por cm^2 (Figura 7).

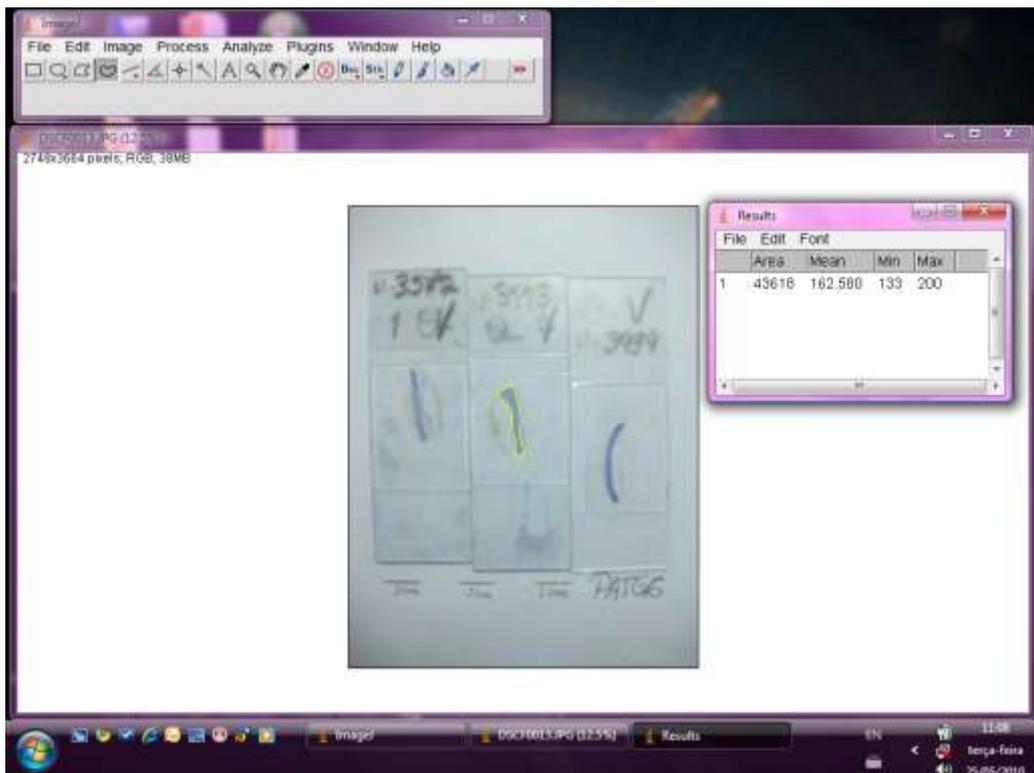
29



1

2 **Figura 6.** Corte histológico da camada adventícia da aorta imunomarcada por anti-
 3 quimase onde se observa a presença dos mastócitos (setas) [Imunohistoquímica, 3200x].

4



5

6 **Figura 7.** Determinação da área dos fragmentos utilizando o programa Image J.

7

1 **8. Análise estatística**

2

3 Inicialmente foi elaborado um banco de dados eletrônico através do programa
4 *Microsoft Excel*[®] e os dados foram analisados através do software *Sigma-Stat*[®] 2.03. A
5 normalidade dos dados foi verificada a partir do teste de Kolmogorov-Smirnov, como a
6 distribuição foi não normal, utilizamos o teste Mann-Whitney para comparação entre 2
7 grupos, e o teste Kruskal-Wallis para comparação entre 3 ou mais grupos e o coeficiente
8 de correlação de Spearman para correlacionar 2 variáveis. Foram consideradas
9 estatisticamente significativas quando p foi menor que 5% ($p < 0,05$).

10

1 **RESULTADOS**

2

3 Foi analisada a distribuição demográfica dos pacientes com métodos descritivos
4 (Tabela 1).

5

6 **Tabela 1.** Distribuição das características demográficas dos 141 pacientes autopsiados,
7 cujas aortas foram avaliadas.

Características demográficas n = 141		
Idade (Mediana, Min.-Máx.) anos		56 (18-85)
Gênero n (%)		
	Masculino	94 (66,7)
	Feminino	47 (33,3)
Cor n (%)		
	Branco	91 (64,5)
	Não Branco	50 (35,5)
Causa de morte n (%)		
	Cardiovascular	63 (44)
	Não Cardiovascular	79 (56)
Grau de aterosclerose n (%)		
	Discreto	59 (41,9)
	Moderado	37 (26,2)
	Acentuado	45 (31,9)

8

9 Os pacientes do gênero feminino e da cor branca apresentaram maior densidade de
10 mastócitos corados pelo Giemsa na aorta, porém, sem diferença significativa ($p>0,05$). Os
11 pacientes com causas de morte cardiovasculares apresentaram menor densidade de
12 mastócitos corados pelo Giemsa na aorta quando comparados a pacientes de causas de
13 morte não-cardiovasculares, sem diferença significativa ($p>0,05$) (Tabela 2).

14

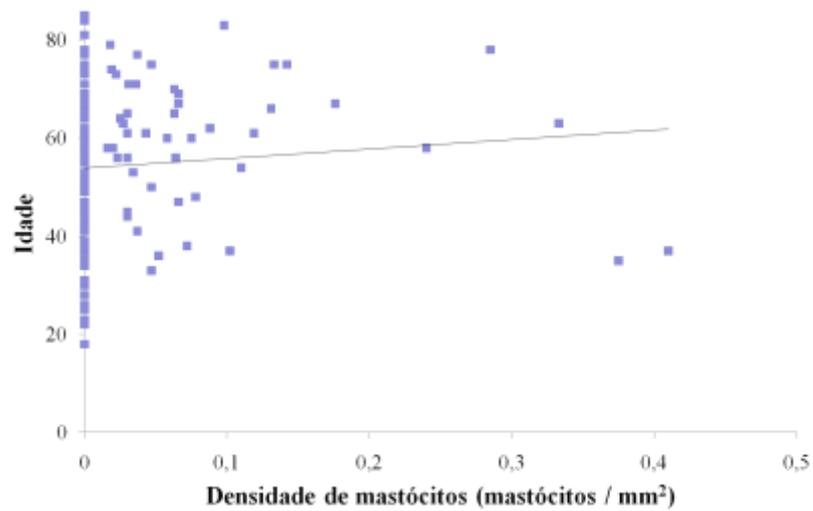
1 **Tabela 2.** Densidade média de mastócitos nas artérias dos 141 pacientes autopsiados em
 2 relação ao gênero, à cor e à causa de morte.

Dados	Média da densidade de mastócitos	p
Gênero		
	Masculino	0,0348
	Feminino	0,0125
Cor		
	Branco	0,033
	Não Branco	0,0242
Causa de morte		
	Cardiovascular	0,0325
	Não Cardiovascular	0,0232
Grau de aterosclerose		
	Discreto	0,0
	Moderado	0,0
	Acentuado	0,0

3 Houve correlação positiva e significativa entre a densidade de mastócitos corados
 4 pelo Giemsa e a idade ($rS = 0,214$ $p = 0,016$) (Figura 8); entre a intensidade de lesão
 5 macroscópica da aterosclerose e a densidade de mastócitos corados pelo Giemsa ($rS =$
 6 $0,234$ $p < 0,05$) (Figura 9); entre a intensidade de aterosclerose e a densidade de mastócitos
 7 do tipo quimase ($rS = 0,375$ $p = 0,0121$) (Figura 10); entre a densidade de mastócitos
 8 quimase e a porcentagem de colágeno ($rS = 0,115$ $p = 0,00568$) (Figura 11); entre a
 9 densidade de mastócitos triptase e a porcentagem de colágeno ($rS = 0,110$ $p = 0,00788$)
 10 (Figura 12); entre a densidade de mastócitos triptase e a porcentagem de depósito lipídico
 11 ($rS = 0,117$ $p = 0,00444$) (Figura 13).

12 Os demais parâmetros analisados (a cor, o gênero, a idade e o grau da aterosclerose)
 13 não apresentaram diferença estatística para as duas populações de mastócitos.

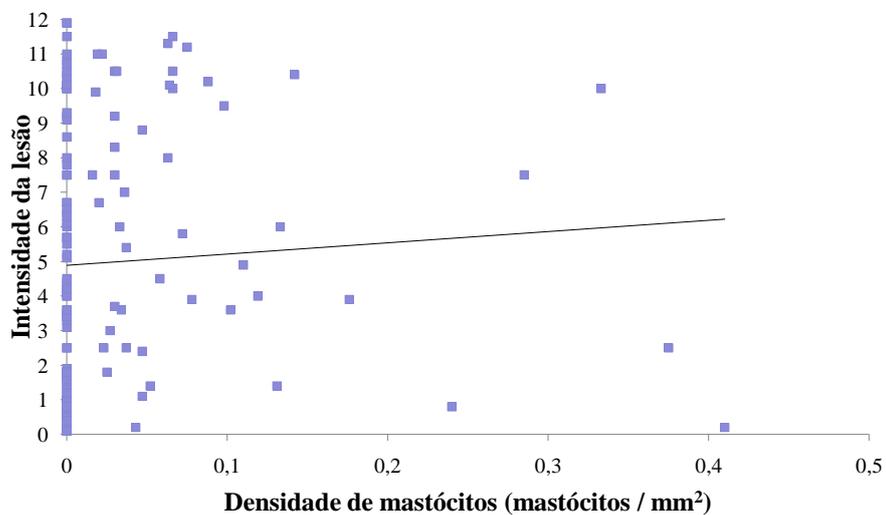
14



1

2 **Figura 8.** Correlação entre a idade e a densidade de mastócitos corados pelo Giemsa em
3 aortas de pacientes autopsiados.

4 Coeficiente de relação de Spearman $r_s = 0,214$; $p = 0,016$



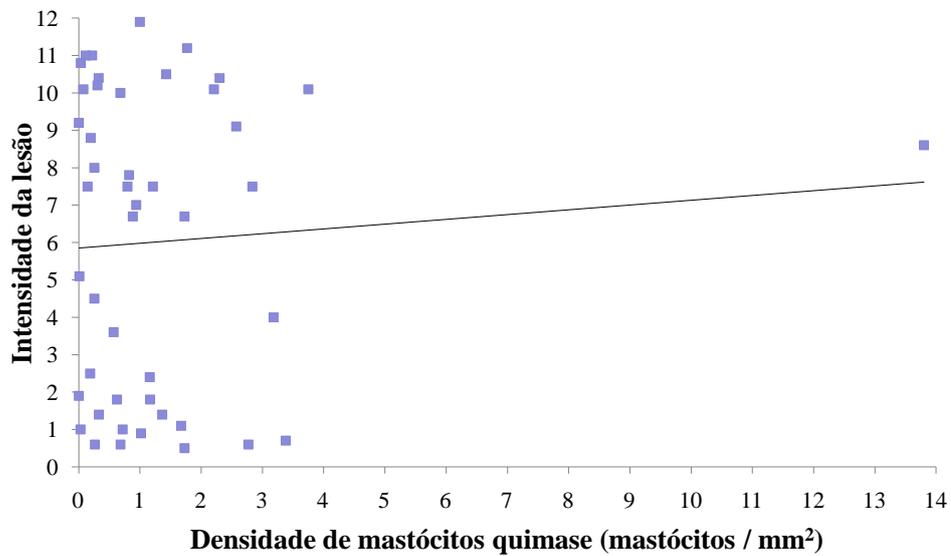
5

6 **Figura 9.** Correlação entre densidade de mastócitos corados pelo Giemsa em aortas de
7 pacientes autopsiados e intensidade da lesão aterosclerótica da aorta.

8

9 Coeficiente de relação de Spearman $r_s = 0,234$; $p < 0,05$.

10



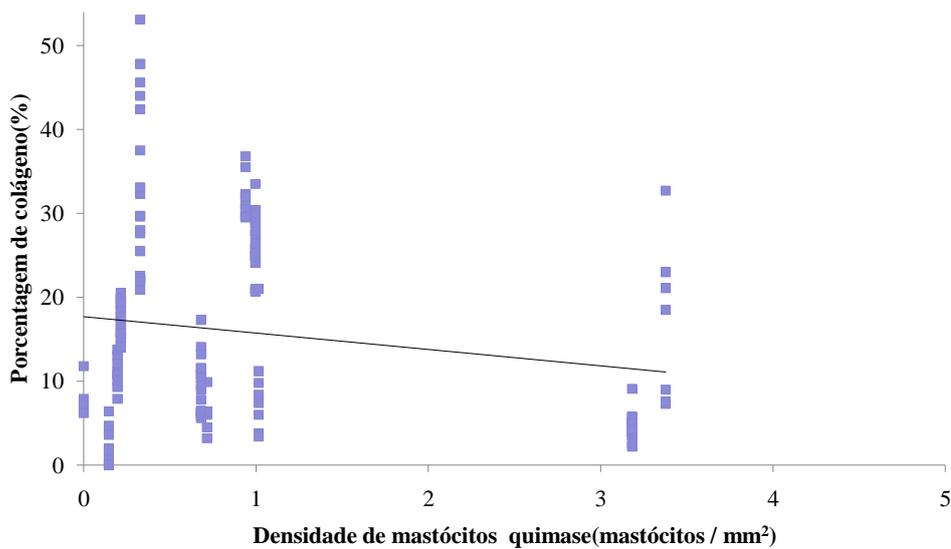
1

2 **Figura 10.** Correlação entre densidade de mastócitos quimase em aortas de pacientes
3 autopsiados e intensidade da lesão aterosclerótica da aorta.

4

5 Coeficiente de relação de Spearman $r_s = 0,375$; $p = 0,012$

6



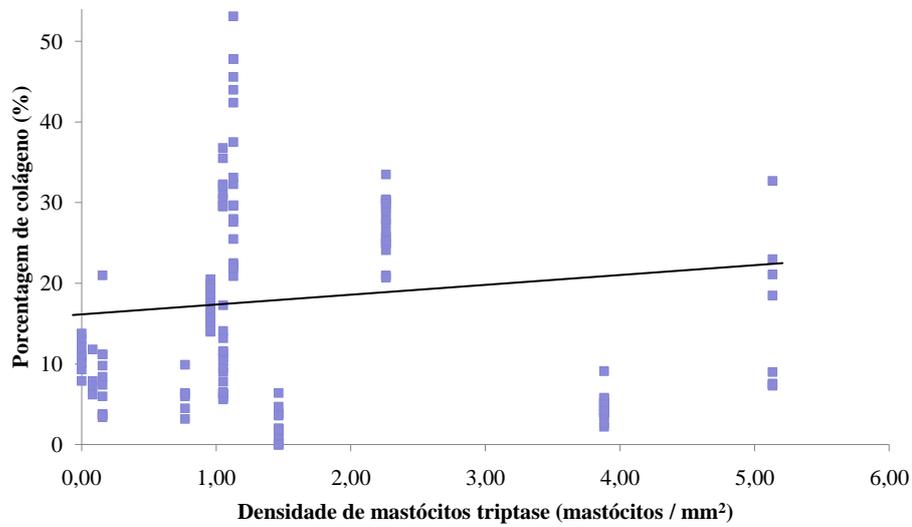
7

8 **Figura 11.** Correlação entre a densidade de mastócitos quimase em aortas de pacientes
9 autopsiados e a porcentagem de colágeno.

10

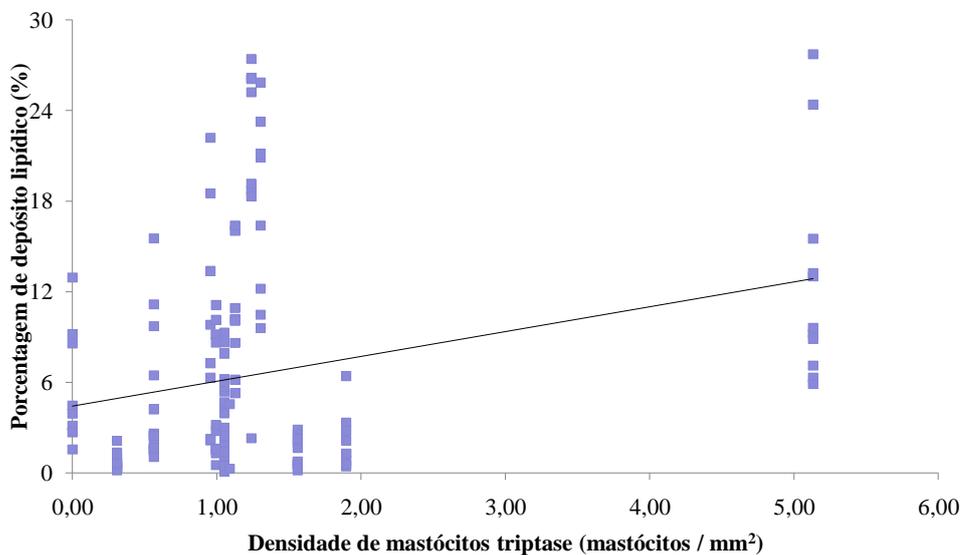
11 Coeficiente de relação de Spearman $r_s = 0,115$; $p=0,006$

12



1
2 **Figura 12.** Correlação entre a densidade de mastócitos triptase em aortas de pacientes
3 autopsiados e a porcentagem de colágeno.

4
5 Coeficiente de relação de Spearman $rS = 0,110$; $p=0,008$
6



7
8 **Figura 13.** Correlação entre a densidade de mastócitos triptase em aortas de pacientes
9 autopsiados e a porcentagem de depósito lipídico.

10
11 Coeficiente de relação de Spearman $rS = 0,117$; $p=0,004$
12

1 **DISCUSSÃO**

2
3 No presente estudo levantamos a hipótese de que os mastócitos seriam encontrados
4 em maior densidade nas artérias de pacientes com causa de morte cardiovascular, pois
5 participam da neofomação colágena da placa aterosclerótica por liberar mediadores que
6 induzem fibrogênese (TSURUDA, et al., 2006; DOGGRELL et al., 2004). Essas placas
7 ateroscleróticas podem obstruir artérias de médio calibre como as coronárias levando à
8 isquemia que, se prolongada, desencadeia infarto do miocárdio podendo comprometer a
9 função cardíaca levando inclusive ao óbito (BRASILEIRO FILHO, et al., 2004). No
10 entanto, não houve diferença significativa na comparação entre a densidade de mastócitos
11 e causas de mortes, nem mesmo a cardiovascular. Apesar da deficiência de mastócitos
12 estar associada ao menor risco de óbito frente a doenças inflamatórias como artrite
13 (FILIPPIS, et al., 2008), estudos demonstram que pacientes que foram a óbito por infarto
14 agudo do miocárdio apresentaram grande número de mastócitos em áreas de erosão ou
15 ruptura da placa aterosclerótica das artérias coronárias (LESKINEN et al., 2003). Assim,
16 acreditamos que, pelo menos nos casos analisados, o comprometimento das artérias aortas
17 não refletiria o comprometimento das coronárias, ou seja, pacientes com aterosclerose
18 avançada nas coronárias talvez não apresentassem lesões semelhantes nas aortas que
19 pudessem desencadear insuficiência cardíaca e óbito.

20 Sabe-se que com o envelhecimento a probabilidade de ser acometido pela doença
21 aterosclerótica é maior em função do depósito contínuo de colesterol (TSURUDA, et al.,
22 2006; DOGGRELL et al., 2004). No presente estudo observamos correlação positiva e
23 significativa entre o número de mastócitos e idade, o que demonstra que existe mais
24 mastócitos na aorta de idosos que nas aortas dos jovens. Portanto associado a outros fatores
25 de risco, o aumento da densidade de mastócitos com o envelhecimento pode provocar o
26 agravamento de lesões ateroscleróticas como já demonstrado em outros estudos
27 (TSURUDA et al., 2006; DOGGRELL et al., 2003). Em contrapartida, existem relatos de
28 aumento de mastócitos na aorta em indivíduos jovens estando associado às lesões precoces
29 de aterosclerose (ATINKSON et al., 1994).

30 Ainda, corroborando a associação entre densidade de mastócitos e a aterosclerose,
31 encontramos correlação positiva e significativa entre a intensidade da lesão macroscópica
32 da aterosclerose e a densidade de mastócitos corados pelo Giemsa. Apesar de não termos
33 encontrado na literatura estudos que comparassem a intensidade das lesões macroscópicas
34 da aterosclerose e a densidade de mastócitos nas aortas, nossos achados estão de acordo

1 com a literatura, pois já foi demonstrado que a densidade de mastócitos foi maior em aortas
2 com lipidose quando comparadas às aortas normais (KOVANEN, et al., 2007). Outro
3 estudo demonstrou histidina descarboxilase (HDC), uma enzima que codifica a histamina,
4 nas artérias de camundongos com aterosclerose. A enzima foi mais encontrada na
5 adventícia e na neoíntima das artérias, sendo que os animais que não tinham HDC
6 apresentavam menor espessamento da íntima. Isso indica que a histamina produzida pelos
7 mastócitos participa da estimulação da formação da neoíntima e da placa aterosclerótica
8 (OHTSU et al., 2008), o que justificaria maior densidade de mastócitos nas lesões mais
9 avançadas descritas no presente estudo.

10 Observamos correlação positiva e significativa entre a densidade de mastócitos
11 quimase e a porcentagem de colágeno e entre a densidade de mastócitos do tipo triptase e a
12 porcentagem de colágeno. Em condições fisiológicas, o mecanismo de ativação dos
13 mastócitos que levam a liberação de mediadores é rigorosamente regulado. Porém, em
14 condições patológicas, como na aterogênese, este mecanismo pode se tornar descontrolado,
15 levando à destruição tecidual (HEIKKILA, et al., 2008). Na íntima normal, a síntese e a
16 degradação da matriz pericelular e extracelular é balanceada, enquanto que na íntima
17 aterosclerótica a degradação predomina. Este fato leva a crer que as proteases dos
18 mastócitos, quimase e triptase, apresentem ação direta em processos que agravam a lesão
19 aterosclerótica como a ativação de pró MMPs que colaboram na degradação de
20 componentes como fibronectina e vitronectina (LINDSTEDT, et al., 2004). Essa
21 degradação descontrolada da matriz extracelular, associada à liberação de mediadores que
22 induzem neofomação colágena, participa da patogênese das placas ateroscleróticas
23 (HEIKKILÄ, et al., 2008). Assim, o aumento de mastócitos quimase e triptase nas aortas
24 do presente estudo estaria contribuindo para o aumento da produção de colágeno, e, por
25 conseguinte para o agravamento da lesão aterosclerótica.

26 Encontramos correlação positiva e significativa entre a densidade de mastócitos do
27 tipo quimase e intensidade da aterosclerose. A protease quimase, além de ativar a
28 degradação da matriz extracelular, participa da conversão da Angiotensina I em
29 Angiotensina II (LIBBY, et al., 2007; TAKAI, et al., 2004). Existem evidências de que a
30 ativação do sistema renina-angiotensina no tecido está associada com o desenvolvimento
31 de aterosclerose em humanos (IHARA, et al., 1999) pois a Angiotensina II induz
32 angiogênese, sendo importante na regulação do tônus vascular, no estresse oxidativo e na
33 resposta inflamatória na parede vascular (LIBBY, et al., 2007). Assim, a quimase atua
34 como potencializador da conversão da Angiotensina I em Angiotensina II, favorecendo a

1 formação da placa aterosclerótica, o que justificaria maior densidade de mastócitos
2 quimase nos casos de aterosclerose avançada encontrada no presente estudo.

3 Já com relação aos mastócitos triptase, não encontramos estudos que compararam a
4 densidade desses mastócitos com a porcentagem de colágeno. No entanto, como a maioria
5 dos mastócitos presentes nas paredes das artérias possuem triptase, talvez essa protease
6 (KOVANEN et al., 2007) também participe da neoformação colágena nas placas
7 ateroscleróticas. Em contraste com os nossos resultados, onde não observamos diferença
8 significativa entre a densidade de mastócitos do tipo quimase e a idade dos indivíduos,
9 uma pesquisa realizada em macacos, que possuem a quimase vascular altamente homóloga
10 à de humanos, demonstrou aumento dessa protease de acordo com o aumento da idade
11 desses animais (DOGGRELL, et al., 2004). Também não foi encontrada diferença
12 significativa entre a densidade de mastócitos do tipo triptase e a idade. No entanto, apesar
13 de não termos encontrado na literatura estudos que associassem a idade com a densidade
14 de mastócitos triptase nos tecidos, pesquisa realizada em pacientes com doença
15 aterosclerótica coronariana demonstrou que o nível de triptase sérico era maior nos
16 pacientes idosos, estando associado com o agravamento das lesões ateroscleróticas nas
17 artérias coronárias (DELLIARGYRIS, et al., 2005).

18 Estudo realizado em *hamsters* alimentados com dieta rica em colesterol demonstrou
19 aumento do depósito lipídico na íntima das aortas associado ao aumento da atividade da
20 quimase (DOGGRELL, et al., 2004). No entanto em humanos a quimase talvez não
21 apresente esse papel, o que justificaria o fato de não termos encontrados diferença
22 significativa entre a densidade de mastócitos do tipo quimase e a porcentagem de depósito
23 lipídico.

24 Já a protease triptase, entre inúmeras funções, degrada diretamente a proteína HDL₃
25 contribuindo para a formação e manutenção de células espumosas em lesões
26 ateroscleróticas (LEE, et al., 2002). A proteína HDL₃ é uma das proteínas que retiram os
27 ésteres de colesterol do citoplasma dos macrófagos da parede vascular transportando para o
28 fígado para excreção ou reutilização. Assim, por degradar a proteína HDL₃, a triptase
29 favorece a permanência dos ésteres de colesterol circulante e na íntima arterial,
30 contribuindo assim para a patogênese da aterosclerose, o que justificaria a correlação
31 positiva e significativa entre a densidade de mastócitos triptase e a porcentagem de
32 depósito lipídico encontrada no presente estudo.

33 Não encontramos diferença significativa entre a densidade de mastócitos corados
34 pelo Giemsa, imunomarcados por anti-quimase ou imunomarcados por anti-triptase,

1 comparada com o gênero ou a cor dos indivíduos. Corroborando nossos achados, outro
2 estudo avaliou a triptase sérica entre os homens e entre os caucasianos sem encontrar
3 diferença estatística entre os grupos (DELLIARGYRIS, et al., 2005), o que sugere que os
4 mastócitos apresentam distribuição semelhante entre os gêneros e cor.

5

1 **CONCLUSÕES**

2

3 • A densidade de mastócitos aumentou juntamente com a intensidade da lesão
4 macroscópica da aterosclerose;

5 • Houve aumento significativo da densidade de mastócitos com a idade, independente da
6 cor e do gênero;

7 • A densidade de mastócitos de tipo quimase foi significativamente maior em pacientes
8 idosos;

9 • Houve correlação positiva e significativa tanto entre a densidade de mastócitos triptase
10 com a porcentagem de colágeno como entre a densidade de mastócitos quimase com a
11 porcentagem de colágeno;

12 • Houve correlação positiva e significativa entre a densidade de mastócitos triptase e a
13 porcentagem de depósito lipídico.

14

15 **Conclusão Final**

16

17 Portanto o aumento de mastócitos nas placas ateroscleróticas encontrado no
18 presente estudo sugere a participação dessas células na patogênese e evolução da doença.
19 Entretanto novos estudos deverão ser realizados para melhor compreensão da função dos
20 mastócitos nas placas ateroscleróticas, auxiliando na adoção de medidas preventivas e
21 terapêuticas que contribuiriam para diminuir a morbidade e mortalidade dos pacientes com
22 fatores de risco para desenvolver a doença.

23

RESUMO

1

2

3 **Introdução:** A doença aterosclerótica é uma das principais causas de morbidade e
4 mortalidade em adultos de todo o mundo, com uma tendência a acometer pessoas mais
5 jovens nos países em desenvolvimento. Os mastócitos exercem papel fundamental na
6 fisiopatogênese da aterosclerose, contribuindo ativamente para a evolução da doença.

7 **Objetivos:** Identificar mastócitos na aorta de adultos autopsiados, associando com a idade,
8 a cor, o gênero, o grau de aterosclerose, a causa de morte, a intensidade de depósito
9 lipídico e de colágeno. **Materiais e métodos:** foram coletados fragmentos de aortas de 141
10 pacientes autopsiados na UFTM, estes fragmentos foram processados histologicamente e
11 corados pelas colorações de Giemsa, Sudan vermelho e Picro-sírius e técnica de
12 imunohistoquímica para avaliação da densidade de mastócitos, quantificação do depósito
13 lipídico e de colágeno. **Resultados e discussão:** Houve correlação positiva e significativa
14 entre a densidade de mastócitos corados pelo Giemsa e a idade; entre a intensidade da
15 aterosclerose e a densidade de mastócitos corados pelo Giemsa; entre a intensidade de
16 aterosclerose e a densidade de mastócitos quimase; entre a densidade de mastócitos
17 quimase e triptase e a porcentagem de colágeno; entre os mastócitos triptase e a
18 porcentagem de depósito lipídico. **Conclusão:** O aumento de mastócitos nas placas
19 ateroscleróticas avançadas indicaria participação dessas células na patogênese e evolução
20 da doença. Assim, novos estudos devem ser realizados para melhor compreensão da função
21 dos mastócitos nas placas ateroscleróticas, contribuindo para medidas preventivas e
22 terapêuticas que visem a diminuição da morbidade e mortalidade dos pacientes com fatores
23 de risco para desenvolver a doença.

24 Palavras Chave: Aterosclerose, Mastócitos, Proteases.

25

26

27

ABSTRACT**MORPHOMETRIC ANALYSIS OF AORTIC MAST CELLS IN
AUTOPSIED PATIENTS****ABSTRACT**

Introduction: Atherosclerosis is one of the main causes of morbidity and mortality in adults all over the world and it tends to affect younger people in developing countries. Mast cells play a major role in the physiopathogenesis of atherosclerosis, actively contributing to its development. **Objectives:** To identify aortic mast cells in autopsied adults, correlating them with age, ethnicity, gender, degree of atherosclerosis, cause of death, intensity of deposit of lipid and collagen. **Materials and methods:** Sections of the aorta of 141 patients who were autopsied at *Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)* were collected. Such sections were histologically processed and stained with Giemsa, Sudan and Picrosirius stains and immunohistochemistry method so as to calculate mast cells density and to quantify the deposit of lipid and collagen. **Results and discussion:** There was a significant positive correlation between the density of mast cells stained with Giemsa and age; between the intensity of macroscopic atherosclerotic lesion and the density of mast cells stained with Giemsa; between the intensity of atherosclerosis and the density of mast cell chymase; between the density of mast cell chymase and the percentage of collagen; between the density of mast cell tryptase and the percentage of collagen; between mast cell tryptase and the percentage of lipid deposit. **Conclusion:** The increase in the number of mast cells in advanced atherosclerotic plaques would suggest that such cells play a role in the pathogenesis and development of the disease. Thus, further studies are required to better understand the role of mast cells in atherosclerotic plaques in order to allow for preventive and therapeutic measures that would contribute to reducing morbidity and mortality in patients with risk factors for the development of the disease.

Key words: Atherosclerosis, Mast cells, Protease.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1
2
3 Atiknson JB, Harlan CW, Harlan GC, Virmani R. The Association Of Mast Cells And
4 Atherosclerosis: A Morphologic Study Of Early Atherosclerotic Lesions In Young
5 People. *Hum Pathol.*, 1994; 25(2):154-9.
6
7 Barger AC, Beeuwkes R III, Lainey LL, Silverman KJ. Hypothesis: vasa vasorum and
8 neovascularization of human coronary arteries. A possible role in the pathophysiology
9 of atherosclerosis. *N Engl J Med.*, 1984; 310:175-7.
10
11 Brasileiro Filho G, Pereira FEL, Pittella JEH, Guimarães RC. Distúrbios Do Crescimento
12 E Da Diferenciação Celular. In: Brasileiro Filho G. Bogliolo. *Patologia*. 3ed. Rio de
13 Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
14
15 Bot I, Jager SCA, Zerneck A, Lindstedt KA, Berkel TJC, Wewer C, Biessen EAL.
16 Perivascular mast cells promote atherogenesis and induce plaque destabilization in
17 apolipoprotein E-Deficient mice. *Circulation*, 2007;115(19):2471-3.

18 Coimbra DD, Lustosa JC, Sarmento DF, Lima RB, Pessoa OMN. Colagenoma eruptivo em
19 paciente HIV+. *An Bras Dermatol.*, 2008; 83(2):141-5.
20
21 Deliarhyris EN, Upadhya B, Sane DC, Dehmerg J, Pye J, Smith JrSC, Boucher WS,
22 Theoharides TC. Mast cell tryptase: a new biomarker in patients with stable coronary
23 artery disease. *Atherosclerosis*, 2005; 178:381-6.
24
25 Doggrell SA, Wanstall JC. Vascular Chymase: Pathofisiological Role And Therapeutic
26 Potencial Of Inhibition. *Casdiovasc Res.*, 2004; 61:653-62.
27
28 Duque, FLV. Aterosclerose: Aterogênese E Fatores De Risco. *Rev Soc Bras An Clín/RJ*
29 1998; 7(2).
30
31 Duque, FLV. Aterosclerose: Aterogênese E Fatores De Risco (cont). *Rev Soc Bras An*
32 *Clín/RJ* 1998; 7(3).
33
34 Filippis D, D'amico A, Iuvone T. Cannabinomimetic control of mast cell mediator release:
35 New perspective in chronic inflammation. *J Neuroendocrinol.*, 2008; 20(1):20-5.
36
37 Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ. Atherothrombosis and high-risk
38 plaque: part I: evolving concepts. *J Am Coll Cardiol.*, 2005; 46:937-54.
39
40 Gardner E, Gray DJ, Rahilly RO. *Anatomia Estudo Regional do Corpo Humano*. 4ª ed.
41 Philadelphia, Guanabara Koogan, 1999.
42
43 Giuliano ICB, Coutinho MSSA, Freitas SFT, Pires MMS, Zunino JN, Ribeiro RQC.
44 Lípidos séricos em crianças e adolescentes de Florianópolis, SC – Estudo Floripa
45 saudável 2040. *Arq Bras Cardiol.*, 2005; 85(2):85-91.
46
47 Hakala JK, Oksjoki R, Laine P, Du H, Grabowski GA, Kovanen PT, Penttinen MO.
48 Lysosomal enzymes are released from cultured human macrophages, hydrolyze LDL

- 1 in vitro, and are present extracellularly in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler*
2 *Thromb Vasc Biol.*, 2003; 23:1430–6.
- 3
- 4 Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N England J*
5 *Med.*, 2005; 352:1685–95.
- 6
- 7 Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword.
8 *Nat Rev Immunol.*, 2006; 6:508-19.
- 9
- 10 Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*,
11 2001; 21:1876-90.
- 12
- 13 Hevonoja T, Penttinen MO, Hyvonen MT, Kovanen PT, Ala-Korpela M. Structure of
14 low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in
15 modified LDL. *Biochim Biophys Acta.*, 2000; 1488:189–210.
- 16
- 17 Heikkila HM, Latti S, Leskinen MJ, Hakala JK, Kovanen PT, Lindstedt KA. Activated
18 Mast Cells Induce Endothelial Cell Apoptosis by a Combined Action of Chymase and
19 Tumor Necrosis Factor- α . *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 2008;28:309-14.
- 20
- 21 Ihara M, Urata H, Kinoshita A, Suzumiya J, Sasaguri M, Kikuchi M, Ideishi M, Arakawa
22 K. Increased chymase-dependent angiotensin II formation in human atherosclerotic
23 aorta. *Hypertension.*, 1999; 33: 1399-1405.
- 24
- 25 Kinet J. The essential role of mast cells in orchestrating inflammation. *Immunol Rev.*, 2007;
26 217:5-7.
- 27
- 28 Kinoshita M, Okada M, Hara M, Furukawa Y, Akira M. Mast Cell Tryptase in Mast Cell
29 Granules Enhances MCP-1 and Interleukin-8 Production in Human Endothelial Cells.
30 *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 2005; 25:1858-63.
- 31
- 32 Kovanen PT. Mast cells: multipotent local effector cells in atherothrombosis. *Immunol*
33 *Rev.*, 2007; 217:105–22.
- 34
- 35 Kovanen PT, CarpeˆN O, Lassila R, Kaste M. Carotid plaques and stenosis: molecular
36 mechanisms affecting the development of symptomatic lesions. In: Fieschi C, Fisher
37 M. *Prevention of Ischaemic Stroke*. London, Martin Dunitz; 2000. p 193–216.
- 38
- 39 Krause MP, Hallage T, Gama MPR, Sasaki JE, Miculis CP, Buzzachera CF, Silva SG.
40 Associação entre perfil lipídico e adiposidade corporal em mulheres com mais de 60
41 anos de idade. *Arq Bras Cardiol.*, 2007; 89(3):163-9.
- 42
- 43 Lee M, Sommerhoff CP, Eckardstein A, Zettl F, Fritz H, Kovanen PT. Mast Cell Tryptase
44 Degrades HDL and Blocks Its Function as an Acceptor of Cellular Cholesterol.
45 *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 2002; 22:2086-91.
- 46
- 47 Lesson S, Iredale R, Stansfield K, Evans A, Gray J. Developing a cancer genetics service
48 in wales: opinions of gynecologists on the management of women at risk of familial
49 ovarian cancer. *Eur J Cancer.*, 2001; 10(3):172-8.
- 50

- 1 Leskinen MJ, Kovanen PT, Lindstedt KA. Regulation of smooth muscle cell growth,
2 function and death in vitro by activated mast cells—a potential mechanism for the
3 weakening and rupture of atherosclerotic plaques. *Biochem Pharmacol.*, 2003;
4 66:1493–98.
5
- 6 Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation*, 1995; 91:2844–
7 50.
8
- 9 Lindstedt KA, Leskinen MJ, Kovanen PT. Proteolysis of the Pericellular Matrix: A Novel
10 Element Determining Cell Survival and Death in the Pathogenesis of Plaque Erosion
11 and Rupture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 2004; 24:1350-58.
12
- 13 Metcalfe DD. Mast cells and mastocytosis. *Blood J.*, 2008; 112:946-56.
14
- 15 Napoli C, D'armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, Palinski W.
16 Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal
17 hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its
18 oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin*
19 *Invest.*, 1997; 100:2680–90.
20
- 21 Ohtsu H. Progress in allergy signal research on mast cells: The role of histamine in
22 immunological and cardiovascular disease and the transporting system of histamine in
23 the cell. *J Pharmacol Sci.*, 2008; 106:347-53.
24
- 25 Paanamen K, Kovanen PT. Proteolysis and fusion of low density lipoprotein particles
26 independently strengthen their binding to exocytosed mast cell granules. *J Biol Chem.*,
27 1994; 269:2030-31.
28
- 29 Rice KM, Desai DH, Preston DL, Wehner PS, Blough ER. Uniaxial stretch-induced
30 regulation of mitogen-activated protein kinase. *Exp Physiol.*, 2007; 92(5):963-70.
31
- 32 Schoen FJ, Cotran RS. Vasos sanguíneos. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins:
33 patología estructural e funcional. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
34
- 35 Sary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull WJr, Rosenfeld ME,
36 Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A Definition of Advanced Types of
37 Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis.
38 *Circulation*, 1995; 92:1355-74.
39
- 40 Sary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull WJr, Rosenfeld ME, Schaffer SA,
41 Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and
42 intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular
43 Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*,
44 1994; 89:2462–78.
45
- 46 Sary HC. Lipid and macrophage accumulations in arteries of children and the
47 development of atherosclerosis. *Am J Clin Nutr* 2000; V. 72 (Suppl):1297S–1306S.
48

- 1 Sun J, Sukhova, GK, Wolters PJ, Yang M, Kitamoto S, Libby P, MacFarlane LA, Clair
2 JM, Shi G. Mast cells promotes atherosclerosis by releasing proinflammatory
3 cytokines. *Nat Med.*, 2007; 13(6):719-24.
4
- 5 Takai S, Jin D, Muramatsu M, Miyazaki, M. Chymase as a novel target for the prevention
6 of vascular diseases. *Pharmacol Scien.*, 2004;25(10):518-22.
7
- 8 Takei H, Strong JP, Yutani C, Malcom GT. Comparison of coronary and aortic
9 atherosclerosis in youth from Japan and the USA. *Atherosclerosis* 2005; 180(1):171-9.
10
- 11 Tsuruda T, Kato J, Hatakeyama K, Yamashita A, Nakamura K, Iamamura T, Kitamura K,
12 Onitsuka T, Asada Y, Eto T. Adrenomadullium in mas cells of abdominal aortic
13 aneurysm. *Cardiovasc Res.*, 2006; 70: 158-64.
14
- 15 Upston JM, Niu X, Brown AJ, Mashima R, Wang H. Stage-Dependent Accumulation of
16 Lipid and Protein Oxidation Products in Human Atherosclerosis. *Am J Pathol.*, 2002;
17 160:701-10.
18
- 19 Wang Y, Shiota N, Leskinen MJ, Lindstedt KA, Kovanen PT. Mast cells chymase inhibits
20 smooth muscle cell growth and collagen expression In vitro: transforming growth
21 factor-beta-1-dependent and -independent effects. *Artheroscler Thromb Vasc Biol.*,
22 2001; 21:1928-1933.
23

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](#)