

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Lucia Massuda Hoçoya

VALVA MITRAL DE SUÍNOS: UMA ABORDAGEM BIOQUÍMICA E
MORFOLÓGICA

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Lucia Massuda Hoçoya
[Signature]
e aprovada pela Comissão Julgadora.
x

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do Título de Mestre em
Biologia Celular e Estrutural na área de
Biologia Celular

Orientador: Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

H659v **Hoçoya, Lucia Massuda**
Valva mitral de suínos: uma abordagem bioquímica e morfológica / Lucia Massuda Hoçoya. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Edson Rosa Pimentel.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Valva mitral. 2. Suíno. 3. Matriz extracelular.
4. Colágeno. 5. Proteoglicanos. 6. Proteínas não-colagênicas. I. Edson Rosa Pimentel. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Mitral valve of suines: a biochemical and morphological approach.

Palavras-chave em inglês (Keywords): mitral valve, extracellular matrix, collagen, proteoglycan, non-collagenous proteins.

Área de concentração: Biologia celular.

Titulação: Mestrado.

Banca examinadora: Edson Rosa Pimentel, Sebastião Roberto Taboga, José Camillo Novello, Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira.

Data da defesa: 18/03/05.

Campinas, 18 de março de 2005.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel (Orientador)

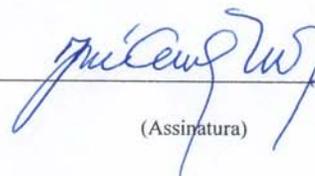


(Assinatura)

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga

(Assinatura)

Prof. Dr. José Camillo Novello



(Assinatura)

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira



(Assinatura)

ÍNDICE

Resumo.....	12
Summary.....	14
Introdução.....	16
Objetivos.....	30
Referências bibliográficas.....	31
Artigo 1.....	39
Resumo.....	39
Introdução.....	41
Materiais e métodos.....	45
Resultados.....	48
Discussão.....	51
Figuras.....	56
Referências bibliográficas.....	61
Artigo 2.....	67
Resumo.....	67
Introdução.....	69
Materiais e métodos.....	73
Resultados.....	80
Discussão.....	83
Figuras.....	87

Referências bibliográficas.....93

Conclusões.....100

“Quem não desafia seus limites,
nunca saberá realmente do que é capaz”

(Meishu- sama)

Deus e Meishu- sama

Obrigada pela permissão de chegar a este momento com saúde e
poder compartilhar minha alegria com aqueles que amo.

Oscar,

*Companheiro de todos os momentos, obrigada pelo carinho,
dedicação e paciência ao longo deste difícil caminho.*

Naoto,

*Filho querido, apesar de tão pequeno, tão corajoso, de quem foi
subtraído a contragosto, preciosas horas de brincadeiras e
convívio com a mãe, para que este trabalho se tornasse
realidade.*

Aos meus pais,

Exemplos de coragem e honestidade, obrigada pelo apoio incansável, sempre ao meu lado nas horas mais difíceis, nem todas as palavras do mundo seriam suficientes para expressar a minha gratidão.

E à toda minha família, principalmente você Regina, sempre me incentivando e apoiando, muito obrigada.

Professor Edson,

Obrigada pelo apoio e estímulos constantes para a realização desta etapa tão importante de minha vida acadêmica, e por ter encontrado tempo, paciência e boa vontade para me orientar, mesmo nos momentos mais atribulados de sua vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal, pelo uso de sua infra-estrutura laboratorial, e pelas valiosas sugestões para a realização desta tese.

À Profa. Dra. Laurecir Gomes, pelas importantes sugestões na realização dos experimentos de bioquímica, e pela amizade nos momentos difíceis.

Aos Profs. Drs. Sebastião Roberto Taboga, José Camillo Novello e Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, pelas valiosas sugestões que me ajudaram a completar este trabalho.

À Profa. Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel, por compreensivamente permitir o uso de equipamentos de seu laboratório.

Ao técnico Francisco Ângelo Malatesta, pela amizade, apoio e auxílio na realização dos experimentos mais difíceis desta tese.

Ao técnico Mario Bianchi, pela ajuda na realização dos experimentos de morfologia.

À Secretaria do Departamento de Biologia Celular, em especial a Lílian Alves Senne Panagio e Sidnei Henrique Simões, pela amizade e auxílio prestados durante todo este período.

Ao Frigorífico e Abatedouro Marchiori, por sempre cederem o material utilizado para a pesquisa.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

“O mundo seria enfadonho e triste sem os amigos, sem a presença de vocês...”

Tatiana, Fernanda, Josete e Paulo, jamais me esquecerei das conversas, das boas risadas, do apoio incondicional e principalmente da amizade de vocês, obrigada por tudo.

Marcela, Alberto, Antonella, Flávia, André e Gisele, obrigada pela amizade e ajuda em todos os momentos difíceis que passei por este caminho.

Gustavo, Alexandre e Wilson, apesar do pouco tempo de convivência guardarei boas recordações de vocês.

RESUMO

A valva mitral é uma complexa estrutura de tecido conjuntivo, constituída por proteínas colagênicas, não colagênicas e proteoglicanos. Histologicamente, o folheto valvar é constituído por 4 camadas: auricular, esponjosa, fibrosa e ventricular. A camada fibrosa forma o núcleo estrutural, enquanto a camada esponjosa funciona como amortecedor de choques. A corda tendínea possui 2 camadas distintas, um largo núcleo fibroso e uma camada esponjosa ao redor. Várias anormalidades da valva mitral têm sido constatadas, desde lesões causadas por acúmulo degenerativo de cálcio, endocardite infecciosa e anormalidades relacionadas com alterações da quantidade de colágeno, ácido hialurônico e glicosaminoglicanos. Entre os tratamentos normalmente utilizados, tem-se realizado técnica de reparo de porções da valva danificadas, ou a substituição destas por valvas artificiais ou biopróteses. Para tanto, um melhor conhecimento sobre os aspectos organizacionais e composicionais são necessários, tanto do folheto, como da corda tendínea. Para a análise morfológica, montagem total e cortes histológicos do folheto e corda tendínea foram corados com azul de toluidina e analisados em microscopia de polarização. Feixes de colágeno intensamente birrefringentes foram encontrados altamente organizados na corda tendínea e com orientação multidirecional no folheto, onde fibrilas colágenas vindas da corda tendínea ramificam-se e entrelaçam-se formando uma estrutura em rede no folheto. A metacromasia foi intensa nas regiões de inserção das cordas tendíneas no folheto, ocorrendo de maneira não uniforme. Cortes transversais do folheto mostraram a camada esponjosa, com características de tecido conjuntivo frouxo, e a fibrosa, onde os feixes de

colágeno estão densamente arranjados. Para o estudo bioquímico componentes da matriz extracelular foram extraídos com cloreto de guanidina 4M, fracionados em DEAE-Sephacel e analisados em SDS-PAGE. As proteínas não colagênicas encontradas mostraram Mr entre 19 e 179 kDa e 19 e 235 kDa para o folheto e corda tendínea respectivamente. Várias proteínas similares são encontradas em ambos os tecidos. Bandas polidispersas em torno de 67 kDa e 80-100 kDa foram encontradas, as quais provavelmente correspondem aos pequenos proteoglicanos fibromodulim e decorim respectivamente. Análise em gel de agarose-poliacrilamida revelou a presença de banda polidispersa e matacromática, indicando a presença de proteoglicanos de alto peso molecular, que provavelmente trata-se do versicam, tanto no folheto, como na corda tendínea. A análise de GAGs mostrou a presença de condroitim sulfato e dermatam sulfato nas duas regiões. De acordo com nossos estudos bioquímicos e morfológicos, podemos concluir que: 1) A corda tendínea apresentou maiores quantidades de proteínas e glicosaminoglicanos que o folheto; 2) Pequenos e grandes proteoglicanos estão presentes em ambos os tecidos; 3) Os feixes de colágeno estão altamente organizados na corda tendínea, enquanto assumem várias direções no folheto; 4) A distribuição de proteoglicanos no folheto ocorre de maneira não uniforme, provavelmente devido a atuação também não uniforme de forças compressivas nesta estrutura.

SUMMARY

The mitral valve is a complex connective tissue structure, constituted by collagenous proteins, non collagenous proteins and proteoglycans. Structurally the valve leaflets are composed of four main layers: auricularis, fibrosa, spongiosa and ventricularis. The fibrosa layer forms the structural core of the valve, while the spongiosa has an important role in absorption of shock. The chordae tendineae has two distinct layers, a large fibrous core surrounded by a spongenous layer. Several abnormalities of mitral valve have been reported, as the result of injuries caused by degenerative calcium accumulation, infectious endocarditis and disorders associated with collagen content, hyaluronic acid and glycosaminoglycans abnormalities. Among the treatments normally used, have been realized repair techniques of portions of the valve or replacement of these with a prosthetic valve or bioprostheses. Detailed information about organization and composition aspects of the leaflets and chordae tendineae are necessary. For morphological analysis, whole mounts and histological sections of leaflets and chordae tendineae were stained by toluidine blue. Analysis of whole mounts in polarization microscopy showed an intense brightness of the collagen fibrils, demonstrating the high molecular organization of the collagen in the chordae tendineae while in the valve leaflets collagen fiber is multidirectional. In this case, collagen fibrils coming from the chordae tendineae branch cross each other forming a network-like structure. Intense metachromasy was observed in leaflet region of chordae tendineae insertion, with a non uniform distribution. Leaflets transversal sections showed the spongiosa layer with soft connective tissue characteristics, and the fibrosa, where

collagens bundles are highly arranged. For the biochemical study extracellular matrix components were extracted with 4M guanidinium chloride, fractionated in DEAE-Sephacel and analysed by SDS-PAGE. The non collagenous proteins found showed Mr values between 19-179kDa and 19-235kDa to the leaflet and chordae tendineae respectively. Several similar proteins were found in both tissues. Polidisperses bands around 70kDa and 80-100kDa which probably correspond to the small proteoglycans fibromodulin and decorin respectively were found. The analysis in agarose-polyacrylamide gel revealed a polydisperse and metachromatic band in the leaflet and chordae tendineae, indicating the presence of proteoglycans of high molecular weight presumables versican. According to our morphological and biochemical studies, it may be concluded that: 1) The chordae tendineae showed larger amounts of proteins and glycosaminoglycans than the leaflet; 2) Small and large proteoglycans are present in both tissues; 3) The collagen bundles are highly organized in the chordae tendineae while in the leaflet they have a multidirectional arrangement; 4) Proteoglycans have a non uniform distribution in the leaflets, probably due to a non uniform action of compressive forces on these structures.

INTRODUÇÃO

Características Gerais da Valva Mitral

A valva átrio-ventricular esquerda, também denominada de bicúspide ou valva mitral, é muito semelhante em todos os mamíferos. As de suínos têm uma maior semelhança com a de humanos, tanto pelas suas dimensões, como pelas suas características anatômicas (van Rijk-Zwicker *et al*, 1994). A valva mitral é uma das estruturas mais complexas de tecido conjuntivo de todo o corpo (Grande-Allen *et al*, 2004), e tem a importante função de impedir o retorno do fluxo sanguíneo do ventrículo esquerdo para o átrio esquerdo durante a sístole ventricular. Isto é, ela se fecha quando um gradiente retrógrado de pressão empurra o sangue em direção ao átrio esquerdo, e se abre quando um gradiente de pressão é dirigido do átrio para o ventrículo esquerdo (Guyton & Hall, 2002). Apresenta 2 folhetos, o anterior e o posterior. O folheto anterior é maior, aproximadamente triangular, apresenta zonas rugosas e claras (Mandarim, 1990; Nesralla & Sant'Anna, 2000). Recebe na superfície ventricular de seu terço distal a inserção das cordas tendíneas, sendo esta área irregular, e faz aposição à zona correspondente do folheto posterior quando a valva se fecha. A superfície do folheto situada entre a zona irregular e a inserção do anel é clara e membranosa (Nesralla & Sant'Anna, 2000). O folheto posterior é retangular, apresenta uma zona irregular na porção distal do folheto, onde se inserem as cordas tendíneas, e que faz aposição ao folheto anterior quando a valva se fecha; uma zona clara ou translúcida, intermediária e uma zona basal, interposta entre a zona clara e o anel, que

recebe as cordas basais (Mandarin, 1990; van Rijk-Zwicker *et al*, 1994; Nesralla & Sant'Anna, 2000).

As bordas da valva mitral estão fixadas à parede ventricular e aos músculos papilares, através de cordões tendíneos delicados, as cordas tendíneas (Shoen, 1999). Estas subdividem-se em: marginais, intermédias e basais, que correspondem respectivamente à borda livre do folheto, região imediatamente posterior a esta área, e próxima ao anel mitral. As cordas tendíneas basais são maiores, das quais ramificam-se as cordas intermédias e marginais. A principal função das cordas marginais é prevenir a eversão da margem livre do folheto no momento da sístole ventricular, as intermédias previnem o encurvamento dos folhetos e as basais suportam a parte central dos folhetos (van Rijk-Zwicker *et al*, 1994).

O bom funcionamento da valva mitral depende da ação coordenada do anel fibroso, dos folhetos, das cordas tendíneas e dos músculos papilares (Shoen, 1999).

Os folhetos valvares são compostos por 4 camadas principais, que do átrio para o ventrículo são: auricular, esponjosa, fibrosa e ventricular (Tamura *et al*, 1995). A camada fibrosa, próxima a superfície de efluxo, é constituída principalmente de feixes de colágeno, formando o núcleo estrutural dos folhetos (Faria, 1999; Tamura *et al*, 1995; Shoen, 1999). Está coberta pelas camadas esponjosa e auricular, vista do lado atrial, e pela camada ventricular, do lado ventricular (Ferrans & Butany, 1983). Na camada esponjosa, de tecido conjuntivo frouxo, há abundância de grânulos contendo proteoglicanos, além de pequena quantidade de fibras elásticas e fibrilas colágenas, funcionando como absorvente de choque (Faria, 1999; Tamura *et al*, 1995; Shoen, 1999). Na camada ventricular, há uma fina camada de fibras elásticas arranjadas linearmente, contínua com a camada elástica da corda tendínea. Na camada auricular, as fibras elásticas estão dispostas paralelas ao anel mitral

(Tamura *et al*, 1995). As fibras elásticas são mais abundantes na periferia, responsáveis pelo aspecto rugoso dos folhetos (Mandarim, 1990).

A corda tendínea possui 2 camadas distintas de tecido conjuntivo. Um denso núcleo fibroso, composto por feixes colágenos e uma camada de fibras elásticas ao redor. Ambos, folheto e corda tendínea são recobertos por uma simples e contínua camada de células endoteliais (Tamura *et al*, 1995) que formam o endocárdio. Na porção fibrosa do folheto e da corda tendínea, as fibras colágenas estão intermixadas com fibras elásticas, ambas associadas com proteoglicanos (Akhtar *et al*, 1999; Tamura *et al*, 1995). As fibras colágenas vindas da corda tendínea penetram na válvula no seu ponto de inserção, dispersam-se na porção clara e terminam no anel fibroso de sustentação da valva mitral (Mandarim, 1990).

Aspectos estruturais e bioquímicos da matriz extracelular

A matriz extracelular (MEC) dos tecidos conjuntivos em geral é composta por 4 grandes classes de macromoléculas, os colágenos, os proteoglicanos, as proteínas não colagênicas e a elastina (Hay, 1991). A composição macromolecular da matriz determina a hidratação da MEC, e conseqüentemente o volume do tecido, criando espaços para o transporte de moléculas, organização dinâmica e resistência às forças de compressão (Comper, 1996).

A MEC contém moléculas com características químicas e estruturais necessárias para se organizarem em forma de rede, devido às interações entre os seus vários

componentes, e entre estes componentes e receptores da superfície celular (Bissel & Barcellos-Hoff, 1987; Adms & Watt, 1993; Lin & Bissell, 1993; Venstron, 1993).

1- Colágeno

Colágenos são macromoléculas estruturais da matriz extracelular, constituindo algumas vezes, mais da metade do total de proteínas do organismo adulto (Linsenmayer, 1985). São conhecidos 24 tipos de colágenos (Olsen & Ninomiya, 1999), sendo que a diferença entre eles reside na composição de aminoácidos, nos domínios de cada molécula e nos diferentes arranjos estruturais (van der Rest & Garrone, 1991). Estas macromoléculas interagem entre si e se arranjam para oferecer resistência aos tecidos e, em combinação com proteoglicanos, formam estruturas em rede que mantêm a integridade mecânica dos tecidos (Silver *et al*, 2000). Agem também, direta ou indiretamente, como agentes promotores de adesão e diferenciação celular, agentes quimiotáticos para macrófagos e fibroblastos, e como antígenos nos processos imunológicos (Linsenmayer, 1985). São os maiores componentes da valva mitral (Cochran *et al*, 1991). Em valva mitral já foram encontrados os colágenos tipo I, III e V (Tamura *et al*, 1995). O colágeno tipo I, também encontrado em tendão, osso e pele, é o mais abundante da valva mitral, composto por 2 cadeias distintas, $\alpha 1$ (I) e $\alpha 2$ (I) (Bashey *et al*, 1978), constitui 74% do colágeno da valva mitral (Tamura *et al*, 1995; Cole *et al*, 1984). O colágeno tipo III, encontrado em pele, vasos e membranas fetais, é composto por 3 cadeias $\alpha 1$ (Bashey *et al*, 1978), constitui 24%, e o tipo V, 2 % do total de colágeno da valva mitral (Tamura *et al*, 1995; Cole *et al*, 1984). Os colágenos tipos I e III de valva mitral possuem alto conteúdo de hidroxilisina (Cole *et*

al, 1984) quando comparado com os mesmos tipos de colágenos de outros tecidos, como pele e outros tecidos vasculares, o que torna o colágeno da valva cardíaca mais insolúvel e capaz de sustentar o stress mecânico constante da circulação (Bashey *et al*, 1978).

A molécula de colágeno tem forma de bastão, composta por 3 cadeias polipeptídicas ricas em prolina e glicina, importantes na formação da tripla-hélice. A estrutura primária de cada cadeia é composta por seqüências triplas Gly-X-Y com X ou Y podendo ser qualquer aminoácido (van der Rest & Garrone, 1991 ; Linsenmayer, 1985). Freqüentemente X é prolina e Y é hidroxiprolina, sendo que os resíduos de hidroxiprolina estabilizam a estrutura helicoidal. Diferente de outras proteínas, o colágeno apresenta expressiva quantidade de hidroxiprolina, permitindo que o colágeno seja quantificado pela dosagem desse aminoácido (Slack *et al*, 1984). Um outro aminoácido com significado funcional é a lisina, que participa nas ligações covalentes entre as cadeias e as moléculas (Linsenmayer, 1985). As moléculas de colágeno são glicosiladas, e a glicosilação ocorre nos resíduos de hidroxilisina (Hay, 1991).

Além dos colágenos fibrilares tipos I, III e V, os tipos II e XI também formam fibrilas, e são encontrados na maioria dos tecidos. O colágeno tipo VIII é constituinte de cutícula de vermes anelados e exoesqueleto orgânico de esponjas; colágeno tipo IV, presente na lâmina basal; o colágeno tipo VII que forma as fibrilas ancoradoras, auxilia a conexão da lâmina basal do epitélio multicamada ao tecido conjuntivo subjacente; o colágeno tipo VI forma filamentos que interagem com fibrilas e células (van der Rest & Garrone, 1991).

Outros tipos de colágeno estão presentes em pequenas quantidades em tecidos, conectando macromoléculas com outros componentes da matriz.

2- Proteoglicanos

Os proteoglicanos são complexos macromoleculares que contém um cerne protéico, ao qual estão covalentemente ligados uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs). Diferenças nos cernes protéicos, classes, quantidades e comprimentos de cadeias de GAGs, assim como o padrão de sulfatação podem proporcionar enorme versatilidade aos proteoglicanos, permitindo desempenhar diversas funções estruturais e organizacionais nos tecidos (Hascall & Hascall, 1985; Hardingham & Fosang, 1992).

Os GAGs consistem de polímeros lineares, compostos de unidades repetidas de dissacarídeos, que contém sempre um monossacarídeo N-acetilglucosamina ou N-acetilgalactosamina e sendo o outro geralmente um ácido urônico, usualmente o ácido D-glicurônico ou o ácido L-idurônico, exceto o queratam-sulfato, que apresenta galactose no lugar do ácido urônico (Hascall & Hascall, 1985). Devido aos grupos carboxila e sulfato dos GAGs serem carregados negativamente, os proteoglicanos são moléculas altamente hidrofílicas (Hay, 1991).

A composição dissacarídica, o tipo de ligação glicosídica entre eles, além do número e localização dos radicais sulfato, são responsáveis pela classificação dos GAGs em: ácido hialurônico, condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS), heparam sulfato (HS) e queratam sulfato (KS). A MEC do tecido conjuntivo da valva mitral é constituída por ácido hialurônico, pelos PGs de dermatam sulfato, de condroitim sulfato e em menor quantidade o heparam sulfato (Tamura *et al*, 1995). Há evidências de que ácido hialurônico e pequenos PGs como o decorim, possam estar ligados à elastina na valva mitral, podendo influenciar nas propriedades biomecânicas desta valva (Baccarani-Contri *et al*, 1990).

Há 2 classes principais de proteoglicanos no meio intercelular: os grandes e os pequenos proteoglicanos. Os principais representantes dos grandes proteoglicanos são o agrecam e o versicam e os pequenos são representados principalmente pelos decorim, biglicam, fibromodulim e lumicam (Heinegård & Paulsson, 1984; Wight *et al*, 1991), que são membros da família dos proteoglicanos ricos em leucina (Hardingham & Fosang, 1992; Scott, 1996).

PG de alto peso molecular, como versicam, foi encontrado em valva mitral. Possui cadeias de GAGs tipo CS, cuja função é oferecer resistência às forças de compressão (Grande-Allen *et al*, 2004). O versicam também está presente nas paredes arteriais (Rothenburger *et al*, 2002), e na MEC de vários tecidos, possuindo não apenas funções estruturais e biomecânicas, mas também função na migração, proliferação e adesão celular, além da montagem da matriz extracelular (Wight, 2002).

Outro grande PG, o agrecam, conhecido inicialmente como um proteoglicano específico de cartilagem, mas pode também ser encontrado em outros tecidos, como aorta, disco intervertebral e tendão que contorna a articulação (Knudson & Knudson, 2001).

PGs de baixo peso molecular como decorim e biglicam foram recentemente detectados em diferentes regiões da valva mitral (Grande-Allen *et al*, 2004). O decorim, que provavelmente está presente em todos os tecidos conjuntivos fibrosos (Kuc & Scott, 1997; Comper, 1996), possui apenas uma cadeia de GAG que pode ser CS ou DS (Knudson & Knudson, 2001; Hardingham & Fosang, 1992), com funções de regulação da fibrilogênese do colágeno, modulação da atividade do fator de crescimento e regulação do crescimento celular (Weber *et al*, 1996).

O biglicam é de distribuição mais restrita que o decorim (Kuc & Scott, 1997), possui 2 cadeias de GAGs, que pode ser CS ou DS (Knudson & Knudson, 2001; Hardingham & Fosang, 1992), e é um regulador da formação óssea, podendo também estar relacionado à adesão celular e estruturação da matriz (Knudson & Knudson, 2001).

O fibromodulim possui 4 cadeias KS, provavelmente tem a função de regular o diâmetro das fibrilas (Knudson & Knudson, 2001). Pode ser encontrado em cartilagens, tendões, esclera e muito pouco em ossos e pele (Comper, 1996).

O lumicam possui cadeias de GAGs tipo KS, está envolvido na regulação e montagem das fibrilas de colágeno, e é o maior componente da córnea, derme e tem distribuição comum em tecidos conjuntivos dos músculos (Knudson & Knudson, 2001; Chakravarti *et al*, 1998).

Além dos proteoglicanos do meio intercelular, existem outros proteoglicanos, como o perlecam, presente na membrana basal (Knudson & Knudson, 2001); e os proteoglicanos de superfície celular, como o sindecam, glipicam, trombomodulim e CD 44 (Hardingham & Fosang, 1992).

3- Proteínas não-colagênicas

A matriz extracelular contém diversas proteínas importantes além das macromoléculas de colágeno e proteoglicanos. As proteínas não colagênicas, formam um importante grupo de proteínas que podem servir como mediadores da adesão celular na MEC (Comper, 1996). No tecido conjuntivo da valva mitral, estão presentes proteínas como a fibronectina associada aos colágenos tipos I e III. É sintetizada por fibroblastos,

células endoteliais, condrócitos, células gliais e miócitos. São abundantes em matriz dos tecidos conjuntivos, membranas basais e fluidos corporais (Piez & Reddi, 1984), e possui domínios de ligação para os colágenos tipo I, II, III e mais fracamente ao tipo V (Akhtar *et al*, 1999), ao GAG HS, ao ácido hialurônico, e domínios que se ligam à superfície celular (Yamada, 1985). São importantes para alguns processos básicos, como migração e diferenciação celular, desenvolvimento embrionário, coagulação sanguínea e também participam da formação de tumores celulares (Comper, 1996). Outra proteína adesiva, a vitronectina, encontrada em tecidos elásticos dos vasos sanguíneos e membrana basal da aorta (Scott-Jupp *et al*, 1981), é também encontrada em valva mitral, associada as microfibrilas das fibras elásticas (Akhtar *et al*, 1999). Outras proteínas não colagênicas encontradas em valva mitral são a fibrina (Faria, 1999) e a fibrilina, associada a elastina, colágenos I e III, com função de manter a integridade estrutural da matriz dos tecidos conjuntivos.

A matriz extracelular contém outras proteínas importantes, mas ainda não encontradas em matriz de valva mitral, como a laminina, uma glicoproteína importante na estrutura da lâmina basal (Yamada, 1985), com função de adesão, migração e diferenciação celular (Comper, 1996); a CMP (proteína de matriz de cartilagem), COMP (proteína oligomérica de matriz de cartilagem), ancorina e condrocalcina, inicialmente identificadas em tecidos cartilagosos (Heinegard & Pimentel, 1992), mas também detectadas em outros tecidos. Algumas dessas proteínas, como, laminina e ancorina podem servir como mediadores da adesão celular na matriz (Comper, 1996).

4- Elastina

A elastina é uma proteína fibrosa insolúvel que constitui a maior parte das fibras elásticas (Baccarani-Contri *et al*, 1994). As moléculas de elastina são ricas em aminoácidos hidrofóbicos, particularmente alanina, valina, prolina e glicina. Não contém hidroxilisina, e possui pequenas quantidades de hidroxiprolina. Estas moléculas podem formar ligações cruzadas entre si, através de seus derivados de lisina. Estas interações permitem que os vários monômeros de elastina formem as fibras de elastina, capazes de sofrer distensão e retração graças à presença de domínios hidrofóbicos em suas moléculas (Mecham & Heuser 1991; Kreis & Vale, 1999). Na formação destas fibras também participam as moléculas de fibrilina, que por sua vez formam microfibrilas estabilizadas por pontes dissulfetos e ligações cruzadas (Carvalho, 2001). As microfibrilas normalmente se associam a elastina, para formar as fibras elásticas (Ross *et al*, 1995). As fibras elásticas, encontradas na valva mitral (Nasuti *et al*, 2004), são também encontradas na MEC de outros tecidos que estão sujeitos à distensão e relaxamento repetitivos, estiramento e encurtamento (Edward & Mark, 1996), como ligamentos e paredes de grandes vasos sanguíneos (Franzblau & Faris, 1985).

Importância do estudo da matriz extracelular da valva mitral

A valva mitral em seres humanos é a mais frequentemente acometida nas doenças das valvas do coração (Moore & Dalley, 2001). O maior número de lesões valvulares é resultado de febre reumática (Guyton & Hall, 2002), onde ocorre cicatrização fibrótica dos

folhetos, com redução da elasticidade (Gartner & Hiatt, 1999). As bordas livres dos folhetos valvares adjacentes ficam presas umas às outras, de modo que com o passar do tempo transformam-se em massas sólidas e fibrosas (Guyton & Hall, 2002), havendo também encurtamento, espessamento e fusão das cordas tendíneas (Shoen, 1999). Como consequência ocorre o bloqueio do fluxo normal do sangue, tornando as valvas estenosadas. Por outro lado, quando as válvulas não conseguem se fechar completamente durante a contração ventricular, devido à destruição das válvulas por tecido cicatricial, ocorre regurgitação do sangue. Em ambos os casos, o fluxo do sangue é reduzido (Guyton & Hall, 2002).

As valvas estão sujeitas a “stress” por mecanismos biomecânicos fortes e repetitivos, particularmente nos pontos de junção das cúspides. Essas estruturas podem sofrer lesões pelo acúmulo degenerativo de cálcio. Assim, o anel da valva mitral é visualizado de modo geral como nódulos irregulares, duros e ocasionalmente ulcerados (Shoen, 1999). Normalmente o processo não afeta a função valvar, entretanto, em circunstâncias incomuns podem resultar em refluxo, e ocasionalmente em mortes repentinas, devido a arritmias, que ocorrem neste caso, em consequência dos depósitos de cálcio que podem afetar o sistema de condução átrio-ventricular (Moore & Adams, 2001). A calcificação anular mitral também pode propiciar aumento no risco de acidente vascular cerebral, uma vez que os nódulos calcificados podem ser sítios de trombos que podem embolizar. Os nódulos calcificados podem ser também focos para endocardite infecciosa (Shoen, 1999).

A endocardite infecciosa, uma das mais graves de todas as infecções, caracteriza-se por colonização ou invasão das valvas cardíacas por agente microbiológico, resultando em

formações de estruturas volumosas e friáveis, compostas de restos trombóticos e microorganismos, podendo causar erosão ou perfuração das cúspides (Robbins, 2000).

O prolapso da valva mitral (PVM) define um grupo de condições nas quais um ou ambos os folhetos ficam superiores ao plano do anel mitral (Goldman & Braunwald, 2000). O PVM pode ser funcional ou anatômico. O PVM funcional não apresenta evidências de processo degenerativo cuspidiano, cordal ou do anel mitral. No PVM anatômico ocorre degeneração mixomatosa, e a lesão alcança de pequenos e poucos nódulos discretos na linha de fechamento, até elevações como placas, envolvendo grande parte do folheto, predominantemente na área de aposição valvar (Gagna *et al*, 1998). Microscopicamente, há espessamento da camada esponjosa e degeneração da camada fibrosa (Gagna *et al*, 1998), onde ocorrem anormalidades e desequilíbrio na produção de colágeno (Henney *et al*, 1982; Cole *et al*, 1984), com desorganização dos feixes (Tamura *et al*, 1995), aumento na quantidade de ácido hialurônico e de GAGs (Lis *et al*, 1987), acúmulo de PGs, além de alterações na agregação e organização do componente amorfo e microfibrilas das fibras elásticas tanto no folheto, como na corda tendínea (Tamura *et al*, 1995). Na degeneração mixomatosa, as cordas tendíneas podem ser envolvidas, podendo ocorrer a sua ruptura (Braunwald, 1997).

O PVM tem sido associado com diversas anormalidades genéticas do colágeno, como a Síndrome de Ehlers-Danlos, Síndrome de Marfan e Osteogênese Imperfecta (Whittaker *et al*, 1987; Amoresano *et al*, 2000; Braunwald, 1997). Também pode levar a graves complicações numa pequena minoria de pacientes afetados, onde cerca de 3% desenvolvem endocardites infecciosas, insuficiência mitral, acidente vascular cerebral e arritmias (Shoen, 1999).

A substituição das valvas cardíacas lesadas tornou-se uma forma de terapia comum (Robbins, 2000). Por exemplo, na estenose mitral, que é uma doença de obstrução mecânica, a valva pode ser substituída por uma prótese valvular (Moore & Dalley, 2001). Embora a inserção de uma prótese melhore as condições funcionais do coração e possa oferecer ao paciente uma expectativa de vida normal, (Goldman & Braunwald, 2000), o uso de valvas mecânicas apresenta muitas desvantagens, como a necessidade constante de tratamento com anticoagulante, expondo os pacientes a riscos de hemorragia ou complicações de tromboembolia (Kirali *et al*, 2001), endocardite e insuficiência valvar que podem complicar o uso das valvas. Além disso, todas as próteses são inerentemente estenóticas, quando comparadas à valva original normal (Goldman & Braunwald, 2000). Biopróteses porcinas também têm sido utilizadas como alternativa para as próteses mecânicas, porém a calcificação dos folhetos e ruptura do folheto associados à fadiga do tecido tem limitado sua funcionalidade a longo prazo (Kirali *et al*, 2001; Misawa *et al*, 2001).

Frequentemente a valva mitral inteira era substituída por uma prótese valvar, entretanto, mais recentemente, com o aparecimento de novas técnicas de reparo e desenvolvimento contínuo de materiais biocompatíveis, a substituição de porções da valva tornou-se uma grande possibilidade (Kunzelman & Cochran, 1992), por resultar em menos complicações e melhor preservar a mecânica ventricular (David *et al*, 1983).

Informações detalhadas sobre a estrutura e propriedades mecânicas do tecido são essenciais seja para o “design” de valvas biossintéticas ou para a reconstrução com material autólogo ou sintético (Kunzeman & Cochran, 1992), os quais incluem o pericárdio, e mais recentemente sutura de politetrafluoroetileno (PTFE) (Cohran & Kunzelman, 1991).

Quando combinados com outras técnicas conservativas de reparo da valva mitral, a substituição da corda tendínea com PTFE, produz bons resultados, pois este exhibe características viscoelásticas (Kunzelman & Cochran, 1992). Apesar da substituição da corda tendínea com suturas PTFE ser um método seguro, em alguns casos pode desenvolver um espessamento fibroso e calcificação do endocárdio que recobre a prótese de corda tendínea, causando regurgitação mitral, necessitando de subsequente implantação de valva mecânica (di Gioia *et al*, 2001).

Alguns trabalhos têm relacionado valvas anormais com alterações na produção de colágeno (Henney *et al*, 1982; Cole *et al*, 1984; Henney *et al*, 1989) e na quantidade de ácido hialurônico e outros glicosaminoglicanos (Lis *et al*, 1987; Castagnaro *et al*, 1997 ; Amoresano *et al*, 2000). A falta de sucesso completo nos implantes das bipróteses valvares, tem sido atribuído à falta de informações sobre o modelo animal (Vesely, 2001), que permitiria prever o seu efeito ou sua funcionalidade quando utilizado em uma bioprótese. Dessa forma, apesar dos muitos estudos já realizados com MEC de valva mitral de porco ainda faltam informações tanto em seus aspectos bioquímicos quanto estruturais.

OBJETIVOS

1. Analisar a organização estrutural e distribuição dos componentes da MEC dos folhetos e cordas tendíneas da valva mitral de porco, sob microscopia de luz e avaliar os padrões de anisotropias ópticas da MEC destas valvas.
2. Identificar e analisar os principais componentes presentes na MEC dos folhetos e cordas tendíneas da valva mitral de porco, a partir de extrações e ensaios bioquímicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams JC, Watt FM (1993) Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development*. **117**, 1183-1198.
- Akhtar S, Meek KM, James V (1999) Ultrastructure abnormalities in proteoglycans, collagen fibrils, and elastic fibers in normal and myxomatous mitral valve chordae tendineae. *Cardiovasc. Pathol.* **8**, 191-201.
- Akhtar S, Meek KM, James V (1999) Immunolocalization of elastin, collagen type I and type III, fibronectin, and vitronectin in extracellular matrix components of normal and myxomatous mitral heart valve chordae tendineae. *Cardiovasc. Pathol.* **8**, 203-11.
- Amoresano A, Amadeo S, Dandrea G, Siciliano R, Gagna C, Castagnaro M, Marino G, Guarda F (2000) N-Linked glycans of proteins from mitral valve of normal pigs and pigs affected by endocardiosis. *Eur. J. Biochem.* **267**, 1299-306.
- Baccarani-Contrì M, Vincenzi D, Cicchetti F, Mori G, Pasquali-Ronchetti I (1990) Immunocytochemical localization of proteoglycans within normal elastin fibers. *Eur. J. Cell. Biol.* **53**, 305-312.
- Baccarani-Contrì M, Vincenzi D, Cicchetti F, Pasquali-Ronchetti I (1994) Immunochemical identification of abnormal constituents in the dermis of pseudoxanthoma elasticum patients. *Eur. J. Histochem.* **38**, 111-123.
- Bashey RI, Bashey HM, Jimenez SA (1978) Characterization of Pepsin-Solubilized Bovine Heart-Valve Collagen. *Biochem. J.* **173**, 885-894.

- Bissell MJ, Barcellos-Hoff MH (1987) The influence of extracellular matrix on gene expression: Is structure the message?. *J. Cell. Sci. Suppl.* **8**, 327-343.
- Braunwald E (1997) The mitral valve prolapse. In: *Heart Disease* (Braunwald E, ed). pp.1029-1035. Saunders Company: Philadelphia, W.B.
- Carvalho HF (2001) Sistema Elástico. In: *A Célula 2001* (Carvalho HF, Recco-Pimentel, eds). pp. 288-232. Editora Manole: São Paulo.
- Castagnaro M, Amadeo S, Bertolotto A, Manzardo E, Riccio A, Guarda F (1997) Morphological and biochemical investigations of mitral valve endocardiosis in pigs. *Res. Vet. Sci.* **62**, 121-5.
- Chakravarti S, Magnuson T, Lass JH, Jepsen KJ, LaMantia C, Carroll H (1998) Lumican Regulates Collagen Fibril Assembly: Skin fragility and Corneal Opacity in the absence of lumican. *J. Cell Biol.* **141**, 1277-1286.
- Cochran RP, Kunzelman KS (1991) Comparison of Viscoelastic Properties of Suture Versus Porcine Mitral Valve Chordae Tendineae. *J. Cardiac Surg.* **6**, 508-513.
- Cochran RP, Kunzelman KS, Chuong CJ, Sacks MS, Eberhart RC (1991) Nondestructive analysis of mitral valve collagen fiber orientation. *ASAIO Trans.* **37**, 447-8.
- Cole WG, Chan D, Hickey AJ, Wilcken DE (1984) Collagen composition of normal and mixomatous human mitral heart valves. *Biochem. J.* **219**, 451-60.
- Comper WD (1996) Water: Dynamic Aspects. In: *Extracellular matrix : Molecular components and interactions vol.2* (Comper WD, ed). pp. 1-21. Harwood Academic Publishers: Amsterdam.

- David TE, Uden DE, Strauss HD (1983) The importance of the mitral apparatus in left ventricular function after correction of mitral regurgitation. *Circulation*. **68** (Suppl. II), 76-82.
- di Gioia CRT, Brancaccio G, Sinata R, Gallo P (2001) Long-term histologic features of synthetic chordal replacement for mitral valve repair: a case report. *Cardiovasc. Pathol.* **19**, 87-89.
- Edward GC, Mark AG (1996) Elastic Tissue, Elastin and Elastin Associated Microfibrils. In: *Extracellular Matrix: Molecular Componentes and Interactions vol.2* (Comper WD, ed). pp. 95-140. Harwood Academic Publishers: Amsterdam.
- Faria JL (1999) Aparelho Cardiovascular. In: *Patologia Especial: Com Aplicação Clínica* (Faria JL, ed). pp. 11-99. Guanabara- Koogan: Rio de Janeiro.
- Ferrans VJ, Butany JW (1983) Ultrastructural pathology of the heart. In: *Diagnostic electron microscopy* (Trump BF, Jones RT, eds). pp. 421-435. John Wiley: New York.
- Franzblau C, Faris B (1985) Elastin. In: *Cell Biology of extracellular matrix* (Hay ED, ed). pp. 65-89. Plenum Press: New York.
- Gagna C, Meier D, Ru G, Pospischil A, Guarda F (1998) Pathology of Mitral Valve in Regularly Slaughtered Pigs: Abattoir Survey on the Occurrence of Myxoid Degeneration (Endocardioses), Fibrosis and Valvulitis. *J. Vet. Med.A.* **45**,383-395.
- Gartner LP, Hiatt JL (1999) Sistema Circulatório. In: *Tratado de Histologia em cores* (Gartner LP, Hiatt JL, eds). pp. 201-215. Guanabara- Koogan: Rio de Janeiro.
- Goldman L, Braunwald E (2000) Reconhecimento e Tratamento dos Pacientes com Valvopatias Cardíacas. In: *Cardiologia na Clínica Geral* (Goldman L, Braunwald E, eds). pp. 354-372. Guanabara-Koogan: Rio de Janeiro.

- Grande-Allen KJ, Calabro A, Gupta V, Wight TN, Hascall VC, Vesely I (2004) Glycosaminoglycans and Proteoglycans in Normal Mitral Valve Leaflets and Chordae: Association with Regions of Tensile and Compressive Loading. *Glycobiology*. **14**(7), 621-33.
- Guyton AC, Hall JE (2002) Válvulas e Bulhas Cardíacas; Dinâmica dos Defeitos Valvulares e Congênitos do Coração. In: *Tratado de Fisiologia Médica* (Guyton AC, Hall JE, eds). pp. 232-239. Guanabara-Koogan: Rio de Janeiro.
- Guyton AC, Hall JE (2002) O Músculo Cardíaco; O Coração Como Uma Bomba. In: *Tratado de Fisiologia Médica* (Guyton AC, Hall JE, eds). pp. 92-102. Guanabara-Koogan: Rio de Janeiro.
- Hardingham TE, Fosang AJ (1992) Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J*. **6**, 861-870.
- Hascall VC, Hascall KG (1985) Proteoglycans. In: *Cell biology of extracellular matrix* (Hay ED, ed). pp. 39-63. Plenum Press: New York.
- Hay ED (1991) *Cell biology of extracellular matrix*. Plenum Press: New York.
- Heinegård D, Paulsson M (1984) Structure and metabolism of proteoglycans. In: *Extracellular Matrix Biochemistry* (Piez KA, Reddi AH, eds). pp. 277-322. Elsevier: New York.
- Heinegård D, Pimentel ER (1992) Cartilage matrix proteins. In: *Articular cartilage and osteoarthritis* (Kuettner KE, Schleyerbach R, Peyron JG, Hascall VC, eds). pp. 95-114. Raven Press: New York
- Henney AM, Parker DJ, Davies MJ (1982) Collagen Biosynthesis in normal and abnormal heart valves. *Cardiovasc. Res*. **16**, 624-630.

- Henney AM, Tsipouras P, Schwartz RC, Shild AH, Devereux RB, Leech GJ (1989) Genetic evidence that mutations in the COL1A1, COL1A2, COL3A1 or COL5A2 collagen genes are not responsible for the mitral valve prolapse. *Br. Heart J.* **61**, 292-299.
- Kirali K, Guler M, Tuncer A, Daglar B, Ipek G, Isik O, Yakut C (2001) Fifteen-year clinical experience with the biocor porcine bioprostheses in the mitral position. *Ann. Thorac. Surg.* **71**, 811-815.
- Knudson CB, Knudson W (2001) Cartilage proteoglycans. *Cell & Develop. Biol.* **12**, 67-78.
- Kreis T, Vale R (1999) Elastin. In: *Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor, and Adhesion Proteins* (Kreis T, Vale R, eds). pp. 414-417. Oxford University Press: New York.
- Kuc IM, Scott PG (1997) Increased Diameters of Collagen Fibrils Precipitated in vitro in the Presence of Decorin from Various Connective Tissues. *Connect. Tissue Res.* **36**, 287-296.
- Kunzelman KS, Cochran RP (1992) Stress/Strain Characteristics of Porcine Mitral Valve Tissue: Parallel Versus Perpendicular Collagen Orientation. *J. Cardiac Surg.* **7**, 71-78.
- Lin CQ, Bissel MG (1993) Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *FASEB J.* **7**, 737-734.
- Linsenmayer TF (1985) Collagen. In: *Cell biology of extracellular matrix* (Hay ED, ed). pp. 5-37. Plenum Press: New York.
- Lis Y, Burleigh MC, Parker J, Child AH, Hogg J, Davies MJ (1987) Biochemical characterization of individual normal, floppy and rheumatic human mitral valves. *Biochem. J.* **244**, 597-603.

- Mandarin CA (1990) Anatomia funcional do coração. In: *Anatomia do coração: Clínica e cirúrgica* (Mandarin CA, ed). pp. 49-75. Revinter: Rio de Janeiro.
- Mechan RP, Heuser JE (1991) The Elastic Fibers. In: *Cell Biology of Extracellular Matrix* (Hay, ed). pp. 79-106. Plenum Press: New York.
- Misawa Y, Oki SI, Tezuka Y, Fuse K (2001) An unusual complication associated with the Carpentier-Edwards porcine bioprosthesis. *ASAIO J.* **47**, 563-564.
- Moore KL, Dalley AF (2001) Tórax. In: *Anatomia Orientada para a Clínica* (Moore KL, Dalley AF, eds). pp. 53-151. Guanabara-Koogan: Rio de Janeiro.
- Nasuti JF, Zhang PJ, Feldman MD, Pasha T, Khurana JS, Gorman III JH, Gorman RC, Narula J, Narula N (2004) Fibrillin and Other Matrix Proteins in Mitral Valve Prolapse Syndrome. *Ann. Thorac. Surg.* **77**, 532-536.
- Nesralla IA, Sant'Anna JRM (1994) Valvopatias Cirúrgicas. In: *Cardiologia Cirúrgica: perspectivas para o ano 2000* (Nesralla I, ed). pp. 428-440. Fundo Editorial BYK: São Paulo.
- Olsen BR, Ninomiya Y (1999) Collagens. In: *Guidebook to the extracellular matrix, anchor and adhesion proteins* (Kreis T, Vale R, eds). pp. 32-47. Oxford Univ. Press: New York.
- Piez KA, Reddi AH (1984) Fibronectin, Laminin, and other Extracellular glycoproteins. In: *Extracellular Matrix Biochemistry* (Hakamori S, Fukuda M, Sekiguchi K, Carter WG, eds). pp. 288-305. Elsevier Science: New York.
- Robbins SL (2000) O coração. In: *Patologia estrutural e funcional* (Robbins SL, ed). pp. 488-525. Guanabara-Koogan: Rio de Janeiro.

- Rothenburger M, Völker W, Vischer P, Berendes E, Glasmacher B, Scheld HH, Deiwick M (2002) Tissue Engineering of Heart Valves: Formation of a Three-Dimensional Tissue Using Porcine Heart Valve Cells. *ASAIO J.* **48**, 586-591.
- Scott JE (1996) Proteodermatan and Proteokeratan Sulfate (Decorin, Lumican/Fibromodulin). Proteins Are Horse Shoe Shaped. Implications for Their Interactions With Collagen. *Biochemistry.* **35**, 8795-8799.
- Scott-Jupp W, Barnett NL, Gallagher PJ, Monro JL, Ross JK (1981) Ultrastructural changes in spontaneous rupture of mitral chordae tendineae. *J. Pathol.* **133**, 185-201.
- Shoen FJ (1999) The Heart. In: *Robins Pathologic Basis of Disease* (Cotran RS, Kumar V, Collins T, eds). pp. 543-599. Saunders Company: United States of America.
- Silver FH, Christiansen DL, Snowhill PB, Chen Y (2000) Role of storage on Changes in the Mechanical Properties of Tendon and Self-Assembled Collagens Fibers. *Connect. Tissue Res.* **41**, 155-164.
- Slack C, Flint MH, Thompson BM (1984) The effect of tensional load on isolated embryonic chick tendons in organ culture. *Connect. Tissue Res.* **12**, 229-247.
- Tamura K, Fukuda Y, Ishizaki M, Masuda Y, Yamanaka N, Ferrans VJ (1995) Abnormalities in elastic fibers and other connective-tissue components of floppy mitral valve. *Am. Heart J.* **129**, 1149-1158.
- van der Rest M, Garrone R (1991) Collagen family of proteins. *FASEB J.* **5**, 2814-2823.
- Van Rijk-Zwikker GL, Delemarre BJ, Huysmans HA (1994) Mitral Valve Anatomy and Morphology: Relevance to Mitral Valve Replacement and Valve Reconstruction. *J. Cardiac Surg.* **9** (Suppl.), 255-261.

- Venstrom KA, Reichardt LF (1993) Extracellular matrix 2: Role of extracellular matrix molecules and their receptors in the nervous system. *FASEB J.* **7**, 996-1003.
- Vesely I (2001) The influence of design on bioprosthetic valve durability. *J. Long-Term Effects Med. Implants.* **11**, 137-149.
- Weber IT, Harrison RW, Iozzo RV (1996) Model Structure of Decorin and Implications for Collagen fibrillogenesis. *J. Biol. Chem.* **271**, 31767-31770
- Whittaker P, Boughner DR, Perkins DG, Canham PB (1987) Quantitative structural analysis of collagen in chordae tendineae and its relation to floppy mitral valves and proteoglycan infiltration. *Br. Heart J.* **57**, 264-269.
- Wight TN, Heinegård D, Hascall VC (1991) Proteoglycans. Structure and function. In: *Cell biology of the extracellular matrix* (Hay ED, ed). Plenum Press: New York.
- Wight TN (2002) Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **14**, 617-623.
- Yamada KM (1985) Fibronectin and other structural proteins. In: *Cell biology of extracellular matrix* (Hay ED, ed). pp. 95-111. Plenum Press: New York.

Artigo 1

ORGANIZAÇÃO DOS FEIXES DE COLÁGENO E PROTEOGLICANOS NO FOLHETO E CORDA TENDÍNEA DA VALVA MITRAL DE PORCO

RESUMO

As anomalias que afetam a valva mitral do coração, normalmente podem ser revertidas ou por substituição da valva ou por reparo na própria valva. O sucesso deste procedimento requer um conhecimento mais profundo da organização da MEC. As análises estruturais da montagem total do folheto e corda tendínea da valva mitral, corados com azul de toluidina, mostraram regiões metacromáticas e fibrilares. As fibrilas colágenas mostraram-se intensamente birrefringentes em análise de microscopia de polarização, evidenciando a distribuição altamente organizada na corda tendínea, e em várias direções no folheto, onde as fibras e feixes provenientes da corda tendínea ramificam-se e entrelaçam-se formando uma estrutura em rede no folheto. A metacromasia ocorreu de maneira não uniforme, com maior concentração em região de inserção das cordas no folheto. Em cortes longitudinais do folheto, corados com azul de toluidina, regiões intensamente metacromáticas, algumas vezes com aspecto fibrilar foram observadas. A metacromasia foi abolida após tratamento com hialuronidase testicular, pela remoção dos glicosaminoglicanos. A corda tendínea exibiu estrutura similar aos tendões e ligamentos. Análise em microscopia de polarização mostrou a estrutura contínua e não linear do

“crimp”, exibido pela alternância de cores, além de dicroísmo linear, observado quando os feixes de colágeno foram posicionados perpendicularmente (A_{\perp}) e paralelamente (A_{\parallel}) ao azimute do polarizador. Análise dos cortes transversais do folheto mostrou a camada esponjosa, com características de tecido conjuntivo frouxo, e a camada fibrosa, com aspecto fibrilar mais compactado. Análise sob luz polarizada mostrou material fibrilar birrefringente orientado, de inserção da corda tendínea na camada fibrosa do folheto.

INTRODUÇÃO

A valva mitral é composta pelo anel valvar, 2 folhetos, as cordas tendíneas e os músculos papilares (Ranganthan *et al*, 1970). O bom funcionamento da valva mitral depende da ação coordenada desses 4 elementos (Shoen, 1999).

Os folhetos valvares são compostos por 4 camadas principais, que do átrio para o ventrículo são: auricular, esponjosa, fibrosa e ventricular (Tamura *et al*, 1995). A camada fibrosa, próxima a superfície de efluxo, é constituída principalmente de feixes de colágeno, formando o núcleo estrutural dos folhetos (Faria, 1999; Tamura *et al*, 1995; Shoen, 1999). Está coberta pelas camadas esponjosa e auricular, do lado atrial, e pela camada ventricular, do lado ventricular (Ferrans & Butany, 1983). Na camada esponjosa, de tecido conjuntivo frouxo, há abundância de grânulos contendo proteoglicanos, além de pequenas quantidades de fibras elásticas e fibrilas colágenas, funcionando como absorvente de choque (Faria, 1999; Tamura *et al*, 1995; Shoen, 1999). Na camada ventricular, há uma fina camada de fibras elásticas arranjadas linearmente, contínua com a camada elástica da corda tendínea. Na camada auricular, as fibras elásticas estão dispostas paralelas ao anel mitral (Tamura *et al*, 1995). As fibras elásticas, mais abundantes na periferia, são responsáveis pelo aspecto rugoso dos folhetos (Mandarim, 1990).

A corda tendínea possui 2 camadas distintas de tecido conjuntivo. Um largo núcleo fibroso, composto por densos feixes colágenos e uma camada de fibras elásticas ao redor. Ambos, folheto e corda tendínea são recobertos por uma simples e contínua camada de células endoteliais (Tamura *et al*, 1995). Na porção fibrosa do folheto e da corda tendínea,

as fibras colágenas estão intermixadas com fibras elásticas, ambas associadas com proteoglicanos (Akhtar *et al*, 1999; Tamura *et al*, 1995). As fibras colágenas vindas da corda tendínea penetram na válvula no seu ponto de inserção, dispersam-se na porção clara e terminam no anel fibroso de sustentação da valva mitral (Mandarim, 1990).

Anormalidades nos componentes do tecido conjuntivo da valva mitral, como alterações no colágeno, acúmulo de proteoglicanos e anormalidades das fibras elásticas levam ao enfraquecimento da valva mitral (Tamura *et al*, 1995). O prolapso da valva mitral é uma das desordens valvulares cardíacas mais comuns, caracterizado pelo afrouxamento da valva, com ou sem ruptura da corda tendínea, ocorrendo a degeneração mixomatosa (Tamura *et al*, 1995). Essas mudanças mixomatosas ocorrem principalmente na camada esponjosa estendendo-se difusamente em outras camadas. Na corda tendínea a degeneração mixomatosa ocorre na camada elástica, estendendo-se ao centro fibroso (Tamura *et al*, 1995). Na degeneração mixomatosa ocorre acúmulo de proteoglicanos, encontrados entre as fibrilas colágenas e elásticas. Os proteoglicanos encontram-se associados às fibrilas colágenas exercendo importante função na montagem destas (Chandrasekhar *et al*, 1984), e estão também envolvidos na formação das fibras elásticas (Fornieri *et al*, 1987). As alterações nos feixes de colágeno tem sido relacionados com o enfraquecimento do centro fibroso dos folhetos e corda tendínea (Tamura *et al*, 1995). As anormalidades das fibras elásticas causam expansão do tecido (Tamura *et al*, 1995), podendo ocasionar o prolapso valvular. A degeneração mixomatosa e consequente prolapso da valva, acarretam a insuficiência mitral, ocorrendo regurgitação sanguínea durante a sístole ventricular (Nesralla & Sant'Anna, 2000). Já na estenose mitral, ocorre obstrução progressiva do orifício valvar (Nesralla & Sant'Anna, 2000), onde ocorre cicatrização fibrótica dos

folhetos, com redução da elasticidade (Gartner & Hiatt, 1999), além do encurtamento e fusão das cordas tendíneas (Kalil, 2000), a ponto de enrijecer totalmente a válvula. Calcificações podem estar presentes, tanto intramurais, como superficiais, onde amplas vegetações de tecidos calcificados determinam rigidez e obstrução do fluxo sanguíneo normal (Kalil, 2000).

Na estenose mitral, que é uma doença de obstrução mecânica (Moore & Dalley, 2001), a recuperação valvular geralmente é possível (Kalil, 2000), exceto em válvulas extremamente endurecidas e sem flexibilidade, onde a valva tem que ser substituída por uma prótese valvular (Moore & Dalley, 2001). Embora a inserção de uma prótese melhore as condições funcionais do coração e possa oferecer ao paciente uma expectativa de vida normal, (Goldman & Braunwald, 2000), o uso de valvas mecânicas apresentam muitas desvantagens, como a necessidade constante de tratamento com anticoagulante, expondo os pacientes a riscos de hemorragia ou complicações de tromboembolia (Kiralı *et al*, 2001), endocardite e insuficiência valvar que podem complicar o uso destas. Biopróteses porcinas também têm sido utilizadas como alternativa para as próteses mecânicas, porém a calcificação dos folhetos e ruptura do folheto associados à fadiga do tecido tem limitado sua funcionalidade a longo prazo (Kiralı *et al*, 2001; Misawa *et al*, 2001). Na insuficiência mitral, tratamento por valvuloplastia passou a mostrar resultados a médio e longo prazo comparáveis às próteses, sem as complicações das mesmas (Nesralla & Sant'Anna, 2000).

Após 20 anos de pesquisa sobre substituição valvar, nas últimas décadas (Cochran & Kunzelman, 1991), com o aparecimento de novas técnicas de reparo e desenvolvimento contínuo de materiais biocompatíveis, substituição de porções da valva tornou-se uma grande possibilidade (Kunzelman & Cochran, 1992), por resultar em menos complicações e

melhor preservação da mecânica ventricular (Ren *et al*, 1996; David *et al*, 1983). Todavia mais informações sobre a organização dos componentes da MEC da valva mitral e propriedades mecânicas do tecido valvar são essenciais seja para o “design” de valvas biossintéticas ou para a reconstrução com material autólogo ou sintético (Kunzeman & Cochran, 1992).

No presente trabalho apresentamos um estudo sobre a organização dos componentes fibrilares e sobre a distribuição dos proteoglicanos na MEC da valva mitral.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material Biológico

Foram utilizadas valvas mitrais de coração de porco com idade entre 4 e 6 meses provenientes do abatedouro Marchiori da cidade de Amparo - SP. Os folhetos e cordas tendíneas das valvas foram retiradas imediatamente após o abate, lavadas em solução fisiológica 4°C e imediatamente colocadas em solução fixadora.

Fixação do material

Os folhetos e as cordas tendíneas foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0.1M, pH 7.2 a vácuo por uma hora. Em seguida foram transferidos para a geladeira onde permaneceram no fixador por mais 24 horas. Após a fixação, o material foi processado para inclusão rotineira em parafina Histosec/Paraplast Plus (Merck) e seccionados com 7µm de espessura em micrótomo rotativo (MICROM/HM-315). Foram realizados cortes transversais e longitudinais. Alguns folhetos e cordas tendíneas foram utilizados para montagem total em lâminas.

Azul de Toluidina pH 4.0

Montagem total de folhetos e cordas tendíneas inteiras e cortes histológicos, foram corados em solução de AT 0.025% em tampão McIlvaine 0.1M pH 4.0 por 15 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas no mesmo tampão, secas ao ar, mergulhadas rapidamente em xilol e montadas em bálsamo do Canadá (Mello and Vidal, 1980), que tem

o índice de refração igual ao do sistema óptico do microscópio, o que evita artefatos de refração. Algumas lâminas com cortes histológicos, foram previamente tratadas com hialuronidase testicular e posteriormente coradas com AT.

Digestão Enzimática com Hialuronidase Testicular

Cortes histológicos foram mergulhados, rapidamente, em celoidina e, em seguida, tratados com hialuronidase testicular (Sigma) na concentração de 1 mg/ml de solução de NaCl 0,9% durante 6h a 37°C em câmara úmida (Kiernan, 1981). Após as 6 horas, a hialuronidase foi retirada dos cortes e a celoidina removida com acetona. Os cortes foram lavados em álcool 70% e posteriormente, em água destilada.

Microscopia de polarização

Para análise da organização dos componentes fibrosos da valva, foi utilizado microscópio de polarização Zeiss, com os eixos do polarizador e analisador cruzados. O brilho da birrefringência dos componentes altamente orientados e organizados da matriz, foi obtido com o material posicionado a 45° dos eixos dos polarizadores. Para visualizar a coloração por azul de toluidina e inferir como os proteoglicanos se arranjam em relação aos feixes de colágeno, o analisador foi ligeiramente girado em aproximadamente 10°, permitindo dessa forma que os grupos cromofóricos das moléculas do corante ligadas aos glicosaminoglicanos, se apresentassem com diferentes ângulos em relação ao vetor elétrico da luz polarizada. Isto permite evidenciar as ondulações das fibras, onde os glicosaminoglicanos se orientam diferentemente. O dicroísmo linear puro foi detectado

com analisador removido e com o material posicionado paralelamente e perpendicularmente ao polarizador.

Documentação Fotográfica

Para a fotografia do material foi utilizado microscópio Zeiss Axioplan 2, equipado com objetivas Neofluar de óptica infinitiva e condensador 1,4. Acoplado ao microscópio, o dispositivo Axiophot 2 (Zeiss), suprido com filme Kodak Gold ISO 100.

RESULTADOS

A análise de montagem total da valva de porco corada com AT mostrou o aspecto altamente fibroso da valva especialmente nas cordas tendíneas. É interessante notar que os feixes de colágeno das cordas aparecem corados por azul de toluidina, um corante catiônico (Fig.1A-1E). Também no folheto nota-se que o material metacromático não está presente de maneira uniforme, mas aparece mais concentrado em determinadas regiões, como próximo à inserção da corda no folheto (Fig.1B). Observe que esta imagem corresponde ao mesmo campo de visão da imagem anterior só que neste caso o material aparece ligeiramente girado em relação a um dos polarizadores, permitindo a visualização da metacromasia, principalmente na região próxima da inserção da corda no folheto. Na inserção, a corda parece se abrir em leque, sem contudo perder o caráter anisotrópico da morfologia do crimp, que pode ser observada quando a corda é posicionada paralelamente a um dos polarizadores (Fig.1C). Neste caso, devido ao aspecto sinuoso dos feixes de colágeno, o segmento do feixe que se dispõe inclinado, próximo a 45° em relação a um dos polarizadores, exibe um forte brilho de birrefringência. A alternância de faixas claras e escuras ao longo da corda, evidencia o arranjo ondulado dos feixes de colágeno na corda tendínea. Devido a corda tendínea não seguir uma única direção, pode-se notar intensa birrefringência só nos segmentos que se dispõem a 45° em relação aos polarizadores (Fig.1D e 1E). No folheto, intensa birrefringência das fibras e feixes de colágeno pode ser vista em várias direções (Fig.1A).

A análise de cortes longitudinais da corda tendínea posicionadas a 45° em relação aos polarizadores em microscopia de polarização mostraram intensa birrefringência evidenciando a natureza fibrilar e o caráter altamente organizado da corda tendínea (fig.2A). Observou-se também regiões fortemente birrefringentes e regiões com menor brilho devido ao arranjo ondulado dos feixes de colágeno, que ora estão a 45°, ora menos inclinados ou mesmo em posição paralela em relação a um dos polarizadores (fig.2B). Uma observação mais detalhada, evidencia a estrutura contínua e não linear da ondulação, exibido pela alternância das cores roxa, branca e azul (fig.2C), devido às moléculas de AT ligadas aos proteoglicanos, aparentemente associados às fibras colágenas. O aspecto ondulado dos feixes de colágeno bem como as diferentes direções que os feixes de colágeno exibem no plano do corte, ficaram mais evidentes quando os cortes foram posicionados em diferentes inclinações com relação aos polarizadores (fig.2C e 2D).

A mesma região da corda tendínea, analisada por microscopia de polarização, mas sem analisador exibiu dicroísmo linear, conferido especialmente pela presença das moléculas de AT. Quando o eixo maior da corda tendínea estava posicionado paralelamente ao polarizador (fig.2F), as moléculas de AT ligadas aos GAGs de PG associados aos feixes colágenos, ficaram com seus grupos cromofóricos perpendiculares em relação ao plano de luz polarizada, absorvendo menos luz, e conseqüentemente aparecendo com menos intensidade de cor (fig.2F). Girando-se o material, de maneira que a corda tendínea ficasse perpendicular ao polarizador, ocorreu o inverso, isto é, as moléculas de AT ficaram orientadas na mesma direção da luz do polarizador, absorvendo maior quantidade de luz (fig.2E). Metacromasia foi constatada nos dois casos, reforçando que a ligação das moléculas de AT ocorreu nas moléculas de GAGs, permitindo o empilhamento das

moléculas do corante e conseqüentemente o aparecimento da metacromasia e dos fenômenos anisotrópicos relacionados.

A análise de cortes longitudinais dos folhetos corados com AT e observados sob luz polarizada, com polarizadores cruzados, e analisador ligeiramente girado, mostrou a presença de material metacromático, algumas vezes com aspecto fibrilar, orientado em uma direção preferencial. As moléculas de AT ligadas aos PGs, que estavam paralelas ao plano de luz do polarizador, apresentaram grande metacromasia, pois a luz passa pelo maior eixo da molécula, onde estão os grupos cromofóricos do corante. Apesar de não exibir birrefringência, observa-se a presença de segmentos do crimp em algumas regiões, de provável inserção das cordas tendíneas no folheto (fig.3E). Já em algumas regiões do folheto, apesar de apresentar metacromasia (fig.3A), quando posicionados a 45° em relação aos polarizadores, mostram birrefringência (fig.3B), provavelmente devido a forte interação das fibras colágenas com PGs.

Tratamento dos cortes do folheto com hialuronidase testicular que resultou na remoção total dos GAGs, e posterior coloração com AT deixou em evidência o núcleo das células dispersas por todo o tecido, e núcleos das células da camada endotelial dos vasos (fig.3F e 3G).

Cortes histológicos transversais do folheto, corados com AT, mostraram as 2 camadas distintas do folheto: esponjosa e fibrosa (fig.3C e 3D). Intensa metacromasia foi observada na camada esponjosa, mostrando o aspecto de malha frouxa desta camada (fig.3C). A camada fibrosa apresenta um aspecto fibrilar mais compactado (fig.3C). Análise em microscopia de polarização mostrou material fibrilar birrefringente orientado em direção à inserção da corda tendínea na camada fibrosa do folheto (fig.3D).

DISCUSSÃO

A valva mitral é uma das estruturas mais complexas de tecido conjuntivo de todo o corpo, sendo os seus constituintes estruturais determinados pelas funções específicas dos folhetos e corda tendínea (Kunzelman *et al*, 1993). Embora alguns autores dividam a valva em regiões, onde a corda tendínea e a região central do folheto anterior estão em tensão, enquanto a borda livre do folheto anterior e a maior parte do folheto posterior estão em compressão (Grande-Allen *et al*, 2004), no presente trabalho, análise de montagem total e cortes longitudinais do folheto da valva mitral corados com AT, mostrou que a metacromasia ocorre de maneira não uniforme, sendo bem proeminente nas regiões de inserção das cordas tendíneas no folheto, mas também acúmulo de material metacromático foi encontrado em diversas porções do folheto, indicando que nestas áreas ocorre uma maior presença de proteoglicanos, provavelmente devido a uma maior intensidade de forças compressivas nestes locais.

É conhecido que o azul de toluidina é um corante catiônico, com geometria planar, que se liga a substratos aniônicos (Vidal,1980), com seus grupos cromofóricos orientando-se perpendicularmente ao longo dos feixes de colágeno (Vidal, 1984; Mello & Vidal, 1972). Em pH4,0, liga-se tanto aos grupamentos fosfatos dos ácidos nucleicos, como aos radicais carboxila e sulfato das cadeias dos GAGs, os quais dispõem-se helicilmente ao longo do eixo principal das fibrilas de colágeno (Mello & Vidal, 2003). A forma planar da molécula facilita o seu empilhamento e a manifestação da metacromasia (Vidal, 1984). Desta forma, a forte metacromasia apresentada em algumas regiões do folheto e na corda

tendínea indica que há concentração de proteoglicanos nestas regiões, provavelmente por receber mais carga compressiva. As forças de compressão exercidas estimulam as células a sintetizarem proteoglicanos, mesmo em tecidos predominantemente fibrosos, mas que recebem forças de compressão, como tendões de anfíbios (Carvalho & Vidal, 1994), bovinos (Vogel *et al*, 1994) e suínos (Feitosa *et al*, 2002).

Os feixes de colágeno aparentemente corados com AT indicam que as cadeias glicânicas dos proteoglicanos estão arranjadas paralelamente às fibrilas de colágeno de modo a otimizar as interações eletrostáticas entre as cargas positivas do colágeno e as cargas negativas dos GAGs (Vidal, 1964; Mello & Vidal, 1972). Além disso, as moléculas de AT são dotadas de propriedades anisotrópicas, como o dicroísmo linear (DL), o qual é um fenômeno anisotrópico de absorção seletiva da luz polarizada, resultante do arranjo helical das moléculas do corante que estão eletrostaticamente ligados aos sítios aniônicos do substrato (Mello & Vidal, 2003). O DL negativo ($A_{\perp} > A_{\parallel}$) apresentado pela corda tendínea, em cortes longitudinais corados com AT se deve aos GAGs, que estão arranjados paralelamente ao longo dos feixes do colágeno, como já descrito em tendão (Vidal & Mello, 1984). As moléculas de AT ao se ligarem aos grupos carregados negativamente dos GAGs, deixa seus grupos cromofóricos posicionados perpendicularmente ao GAG e também ao eixo mais longo dos feixes de colágeno, dessa forma a absorbância de luz é maior quando o polarizador está perpendicular aos feixes de colágeno.

Esses achados topoquímicos indicam alto conteúdo de radicais aniônicos disponíveis, o que se deve à presença de pequenos e grandes PGs, tanto nos folhetos, quanto na corda tendínea, como já mostrado pelos géis de eletroforese em SDS-poliacrilamida, gel de agarose-propileno diamino e gel de agarose-poliacrilamida, que vêm sendo realizados em

um trabalho paralelo. As cargas negativas das cadeias de GAGs dos PGs mostram propriedades hidrofílicas, formando um gel viscoso resistente à pressão, como ocorre em cartilagem (Hascal & Kimura, 1982). Em recente estudo realizado por Grande-Allen *et al* (2004) um grande PG como o versicam está presente na MEC da valva mitral. As cadeias CS deste PG, juntamente com o ácido hialurônico (Wight, 2002) criam domínios macromoleculares, com grande volume de água (Hardingham & Fosang, 1992). Estes constituintes macromoleculares são ideais para responder às variações nas forças de compressão e de tensão, suportando as grandes forças pulsativas (Wight *et al*, 1991).

A presença do GAG de CS e de ácido hialurônico é reforçada pelos experimentos realizados com hialuronidase testicular, que é um tratamento histoquímico efetivo na remoção de glicosaminoglicanos, através da despolimerização do ácido hialurônico e do CS (Vidal, 1976). Desta forma, a metacromasia apresentada pelo folheto quando corado com AT é totalmente abolido, deixando visível somente os núcleos por todo o folheto, evidenciando alguns vasos. Apesar de ser discutível a vascularização dos folhetos (Faria, 1999), os resultados obtidos foram condizentes com alguns autores, que descrevem a presença destas estruturas nos folhetos (Faria, 1999; Gagna *et al*, 1999).

Além dos PGs, é conhecido a presença do colágeno nos folhetos e corda tendínea. Análise da montagem total do folheto e corda tendínea em microscopia de polarização mostrou que as fibras e feixes de colágeno exibem birrefringência. A birrefringência é uma propriedade anisotrópica, através da qual pode-se determinar e quantificar a ordenação macromolecular das estruturas biológicas (Vidal, 1980), informando sobre a morfologia e direção das fibras de colágeno, sua distribuição, seu grau de associação ou de empacotamento (Vidal, 1964). Os feixes de colágeno exibem estruturas onduladas que

equivalem ao “crimp”, estrutura morfofuncional já descrita em tendões. Crimp é uma característica morfológica de colágenos que formam fibras, como os tipos I, II e III, presentes em tecidos conjuntivos sujeitos à força de tensão (Gathercole & Keller, 1991). A microscopia de polarização é geralmente recomendada como o método mais apropriado para detecção, descrição e interpretação destas estruturas onduladas (Vidal, 2003; Gathercole & Keller, 1991).

Os resultados obtidos com microscopia de polarização mostraram que os componentes fibrilares estão altamente organizados na corda tendínea, diferentemente do folheto, onde as fibras colágenas assumem diversas direções. A orientação multidirecional do colágeno no folheto é responsável pelas propriedades mecânicas do tecido (Whittaker *et al*, 1987), as quais estão sujeitas a stress por mecanismos biomecânicos fortes e repetitivos (Shoen, 1999; Bashey *et al*, 1987). A corda tendínea possui estrutura e função similar aos tendões e ligamentos, porém o período do crimp da corda é muito menor e o ângulo do crimp muito maior do que outros tecidos fibrosos, como o tendão calcâneo e tendão de rato, o que lhe confere características viscoelásticas (Liao & Vesely, 2004), importantes para as funções das cordas tendíneas, que sofrem sobrecargas repetidas e rápidas durante toda a vida, quando a valva mitral abre e fecha (Liao & Vesely, 2003; 2004).

Análise dos cortes transversais corados com AT, mostrou a intensa metacromasia em toda a camada esponjosa, indicando a significativa presença de PGs, provavelmente devido às forças compressivas exercidas nesta camada, que funciona como absorvente de choque mecânico (Faria, 1999). Os PGs possuem funções de proteção na valva, amortecendo e diminuindo a fricção entre as camadas fibrosa e ventricular no folheto (Tamura *et al*, 1995), e entre as camadas esponjosa e fibrosa na corda tendínea (Akhtar *et al*, 1999).

A camada fibrosa mostrou os feixes de colágeno altamente compactados, como exibem as imagens de birrefringência, formando o núcleo estrutural dos folhetos (Tamura *et al*, 1995; akhtar *et al*, 1999; Faria, 1999; Shoen, 1999). Esta camada constitui de 54% a 68% do folheto, enquanto representa de 85% a 89% na corda tendínea. A espessura desta camada, assim como a orientação das fibras de colágeno são responsáveis pelas propriedades mecânicas das valvas, de resistência às forças de tensão (Kunzelman & Cochran, 1992).

Apesar da análise dos cortes transversais dos folhetos, mostrar que algumas regiões aparecem predominantemente metacromáticos, como a camada esponjosa, e outras birrefringentes, como a camada fibrosa, algumas regiões exibem ao mesmo tempo metacromasia e birrefringência, indicando a forte interação entre pequenos PGs, monômeros de alto peso molecular (Roughley & White, 1989) e as fibras colágenas, como ocorre em cartilagem (Vynios *et al*, 2001).

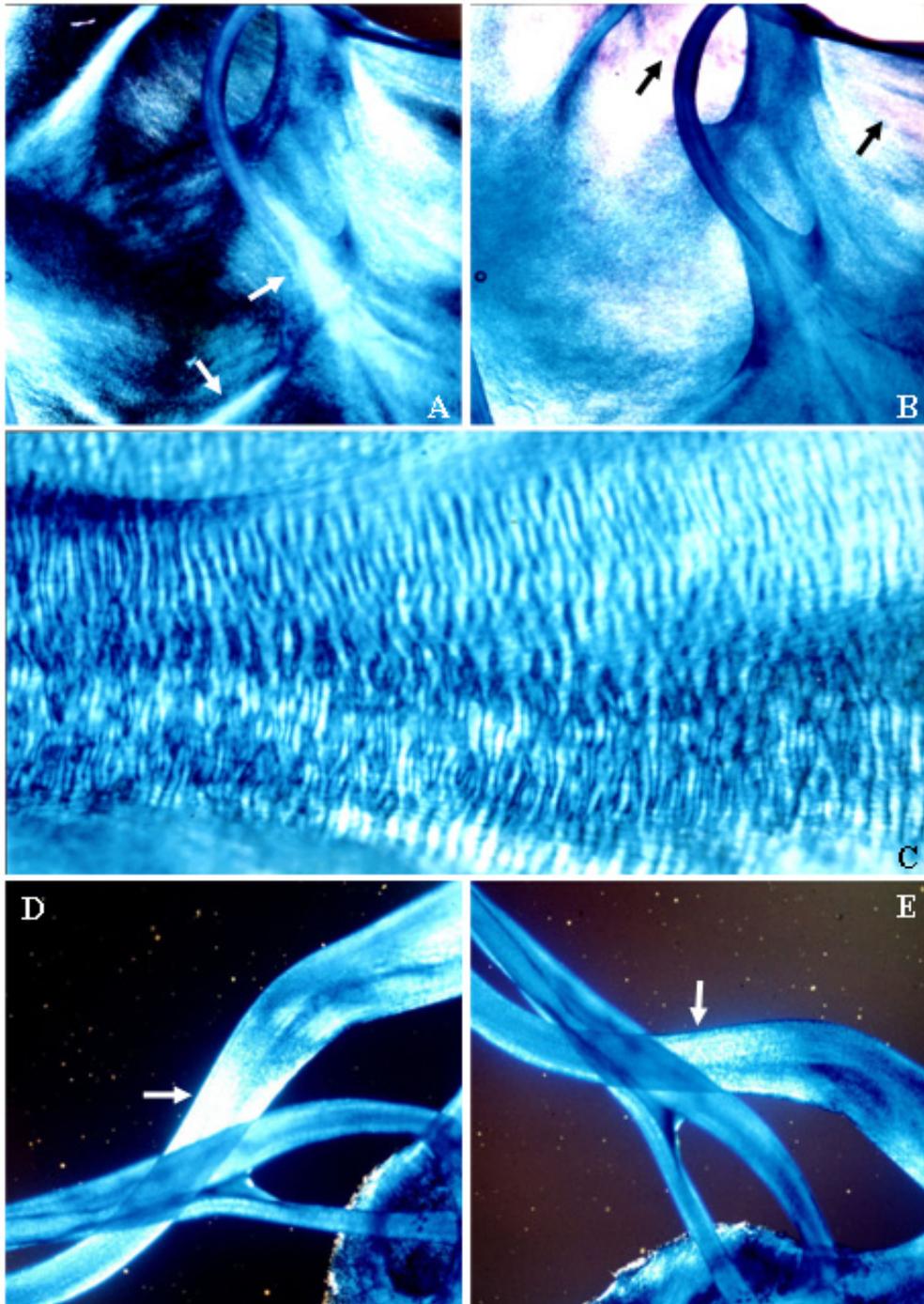


Figura 1

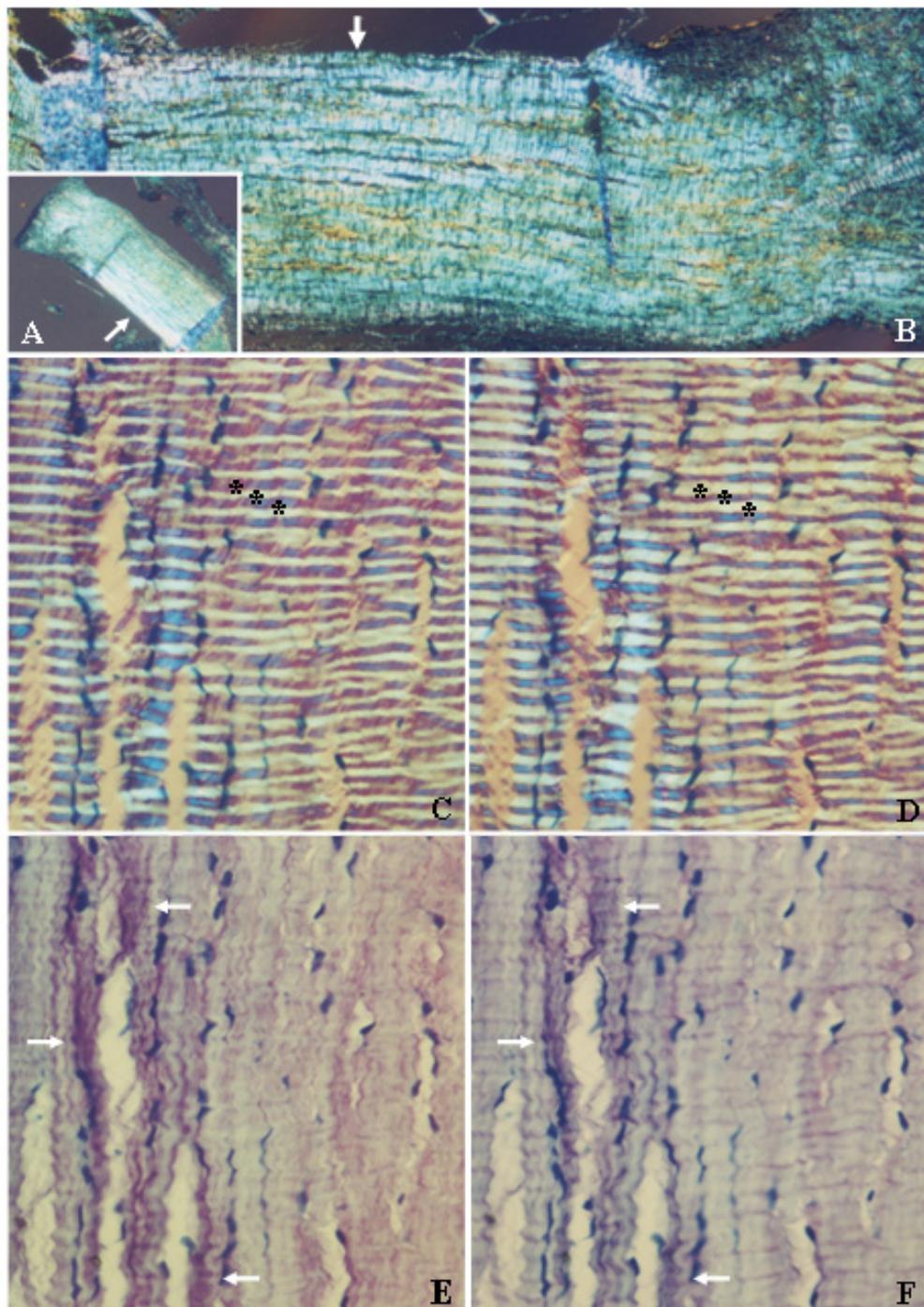


Figura 2

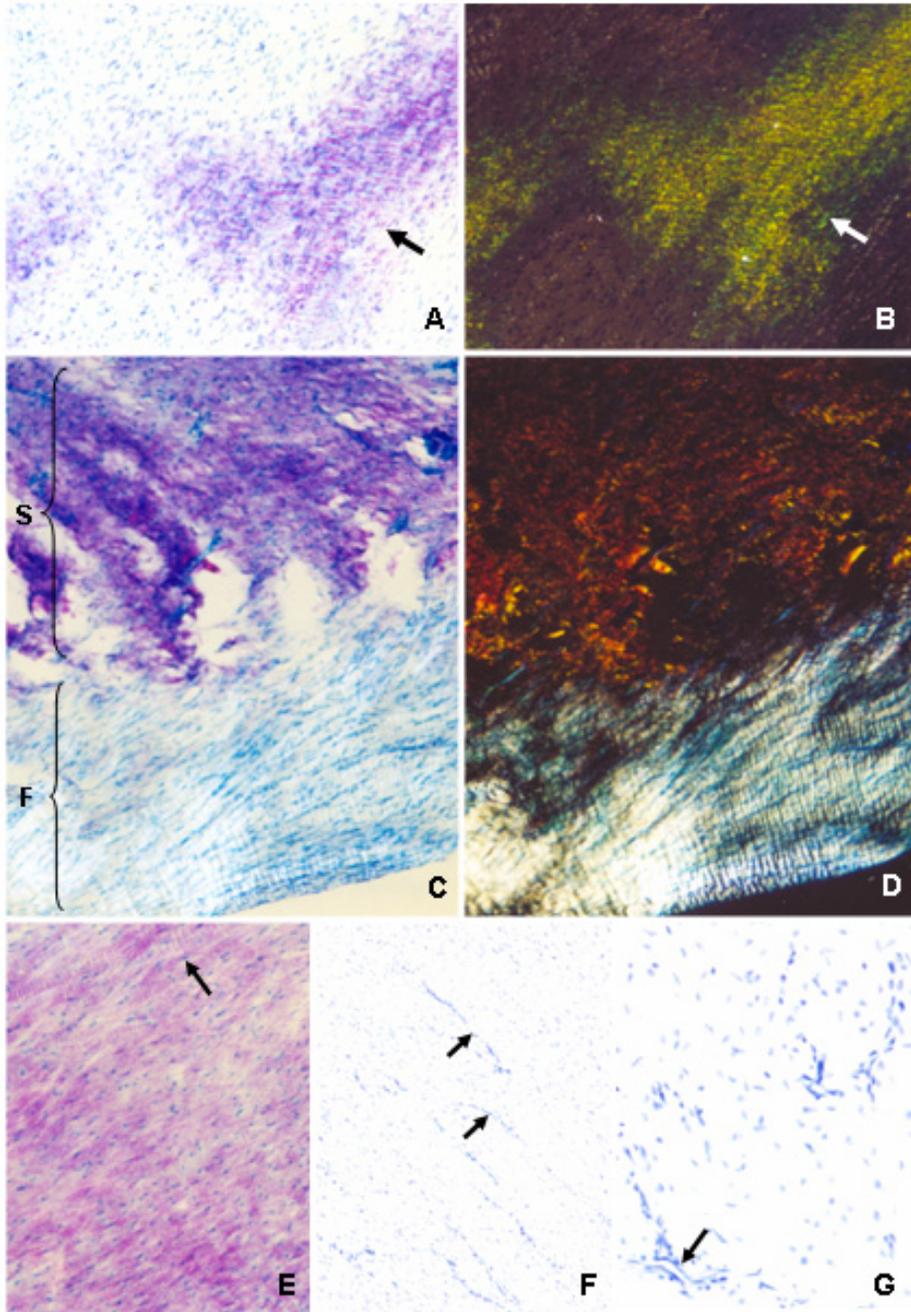


Figura 3

LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1 – Montagem total do folheto e corda tendínea corados com azul de toluidina, observada em microscopia de polarização, visto pela face ventricular (**A-E**). **A** – Feixes de colágeno partem das cordas tendíneas, orientando-se em várias direções (setas), onde regiões que se orientam a 45° em relação aos polarizadores exibem brilho intenso. X 26. **B** – Com polarizadores cruzados, ligeiramente girados, pode-se observar acúmulos de material metacromático nas regiões de inserção das cordas tendíneas (setas). X 26. **C** – Corda tendínea posicionada paralela ao azimute do polarizador. Detalhe da corda tendínea em região de inserção no folheto, notar que a corda abre-se em leque. Observar o aspecto ondulado, devido ao crimp. X 210. **D** – Regiões da corda tendínea que estão posicionados a 45° dos planos dos polarizadores exibem brilho intenso (seta). X 26. **E** – Mesma região que a anterior, posicionada paralelamente ao polarizador (seta). X 26.

Figura 2 – Cortes longitudinais da corda tendínea corados com azul de toluidina, vistos em microscopia de polarização (**A-F**). **A** – Corda tendínea disposta a 45° dos planos dos polarizadores. X 26. **B** – Mesmo que o anterior visto em maior aumento e posicionado paralelamente ao polarizador. Pode ser observado regiões dos feixes de colágeno que se encontram a 45° em relação aos polarizadores, que exibem brilho intenso, e regiões que aparecem menos birrefringentes. Observar o aspecto torcido dos feixes de colágeno, devido ao embrincamento das fibrilas de colágeno. X 105. **C e D** – Detalhe da figura anterior. A

alternância das cores roxa, branca e azul (*) mostram a estrutura contínua e não linear do crimp, e as diferentes orientações dos feixes de colágeno. X 420.

E e F – Observação com polarização, sem analisador, mostrou dicroísmo linear. **E** – Feixes de colágeno perpendiculares ao azimute do polarizador. X 420. **F** – Feixes de colágeno paralelos ao azimute do polarizador. Note as direções perpendicular  e paralela  do plano de luz polarizada, em relação ao eixo mais longo da corda tendínea. X 420.

Figura 3 – Cortes transversais (**A-D**) e longitudinais (**E-G**) do folheto, corados com azul de toluidina. **A** – Microscopia de polarização, com polarizadores ligeiramente girados. Observar material metacromático (seta). X 105. **B** – Mesmo que A, com objeto posicionado a 45° em relação aos polarizadores, apresentou birrefringência. X 105. **C** – Polarizadores girados, mostrando as camadas esponjosa (s) e fibrosa (f). Metacromasia foi observada na camada esponjosa. X 105. **D** – Mesmo que anterior, a 45° dos polarizadores. Observar fibrilas intensamente birrefringentes na camada fibrosa. **E** – Corte longitudinal do folheto, ligeiramente girado (5°) em relação à posição de 45° em relação aos polarizadores. Observe acúmulos de material metacromático em diferentes porções da área de secção longitudinal da valva. Note a presença do “crimp” em algumas regiões (setas). X 105. **F** – Corte tratado com hialuronidase testicular, e observado em microscopia de luz comum. Notar a ausência de metacromasia após tratamento enzimático, e a presença de núcleos e de vasos (setas). X 105. **G** – Idem em maior aumento. X 210.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akhtar S, Meek KM, James V (1999) Ultrastructure abnormalities in proteoglycans, collagen fibrils, and elastic fibers in normal and myxomatous mitral valve chordae tendineae. *Cardiovasc. Pathol.* **8**(4), 191-201.
- Bashey RI, Bashey HM, Jimenez SA (1978) Characterization of Pepsin-Solubilized Bovine Heart-Valve Collagen. *Biochem. J.* **173**, 885-894.
- Carvalho HF, Vidal BC (1994) Cell types and evidence for traumatic cell death in a pressure-bearing tendon of *Rana catesbeiana*. *Tissue Cell.* **26**, 841-848.
- Chandrasekhar S, Kleinman HK, Hassell LR, Martin GR, Termine JD, Trelstad RL (1984) Regulation of type I collagen fibril assembly by link proteins and proteoglycans. *Collagen Rel. Res.* **4**, 323-338.
- Cochran RP, Kunzelman KS (1991) Comparison of Viscoelastic Properties of Suture Versus Porcine Mitral Valve Chordae Tendineae. *J. Cardiac Surg.* **6**(4), 508-513.
- David TE, Uden DE, Strauss HD (1983) The importance of the mitral apparatus in left ventricular function after correction of mitral regurgitation. *Circulation.* **68**(Suppl. II), 76-82.
- Faria JL (1999) Aparelho Cardiovascular. In: *Patologia Especial: Com Aplicação Clínica* (Faria JL, ed). pp. 11-67. Guanabara- Koogan: Rio de Janeiro.
- Feitosa VLC, Vidal BC, Pimentel ER (2002) Optical anisotropy of a pig tendon under compression. *J. Anat.* **200**, 105-111.

- Ferrans VJ, Butany JW (1983) Ultrastructural pathology of the heart. In: *Diagnostic electron microscopy* (Trump BF, Jones RT, eds). pp. 421-435. John Wiley: New York.
- Fornieri C, Baccarani-Contri M, Quaglino D Jr, Pasquali-Ronchetti I (1987) Lysyl oxidase activity and elastin/glycosaminoglycan interactions in growing chick and rat aortas. *J. Cell Biol.* **105**, 1463-1469.
- Gagna C, Meier D, Ru G, Pospischil A, Guarda F (1998) Pathology of Mitral Valve in Regularly Slaughtered Pigs: Abattoir Survey on the Occurrence of Myxoid Degeneration (Endocardioses), Fibrosis and Valvulitis. *J. Vet. Med. A.* **45**, 383-395.
- Gartner LP, Hiatt JL (1999) Sistema Circulatório. In: *Tratado de Histologia em cores* (Gartner LP, Hiatt JL, eds). pp. 201-215. Guanabara- Koogan: Rio de Janeiro.
- Gathercole LJ, Keller A (1991) Crimp morphology in the fibre forming collagens. *Matrix* **11**, 214-234.
- Goldman L, Braunwald E (2000) Reconhecimento e Tratamento dos Pacientes com Valvopatias Cardíacas. In: *Cardiologia na Clínica Geral* (Goldman L, Braunwald E, eds). pp. 354-372. Guanabara-Koogan: Rio de Janeiro.
- Grande-Allen KJ, Calabro A, Gupta V, Wight TN, Hascall VC, Vesely I (2004) Glycosaminoglycans and Proteoglycans in Normal Mitral Valve Leaflets and Chordae: Association with Regions of Tensile and Compressive Loading. *Glycobiology.* **14**(7), 621-633.
- Guyton AC, Hall JE (2002) Válvulas e Bulhas Cardíacas; Dinâmica dos Defeitos Valvulares e Congênitos do Coração. In: *Tratado de Fisiologia Médica* (Guyton AC, Hall JE, eds). pp. 232-239. Guanabara-Koogan: Rio de Janeiro.

- Hardingham TE, Fosang AJ (1992) Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J.* **6**, 861-870.
- Hascall VC, Kimura J (1982) Proteoglycans: isolation and characterization. *Methods Enzimol.* **82**, 769-800.
- Kalil RAK (1994) Procedimentos Reconstitutivos Valvares. In: *Cardiologia cirúrgica; perspectivas para o ano 2000* (Nesralla I, ed). pp. 441-447. Fundo Editoriual BYK: São Paulo.
- Kiernan JA (1981) *Histological and histochemical methods*. Pergamon Press: Oxford, England.
- Kirali K, Guler M, Tuncer A, Daglar B, Ipek G, Isik O, Yakut C (2001) Fifteen-year clinical experience with the biocor porcine bioprostheses in the mitral position. *Ann. Thorac. Surg.* **71**, 811-815.
- Kunkelman KS, Cochran RP, Murphree SS, Ring WS, Verrier ED, Eberhart RC (1993) Differential collagen distribution in the mitral valve and its influence on biomechanical behaviour. *J. Heart Valve Dis.* **2**, 236-244.
- Kunzelman KS, Cochran RP (1992) Stress/Strain Characteristics of Porcine Mitral Valve Tissue: Parallel Versus Perpendicular Collagen Orientation. *J. Cardiac Surg.* **7**, 71-78.
- Liao J, Vesely I (2003) A structural basis for the size-related mechanical properties of mitral valve chordae tendineae. *J. Biomech.* **36**, 1125-1133.
- Liao J, Vesely I (2004) Relationship between Collagen Fibrils, Glycosaminoglycans, and Stress Relaxation in Mitral Valve Chordae Tendineae. *Ann. Biomed. Eng.* **32**(7), 977-983.

- Mandarin CA (1990) Anatomia funcional do coração. In: *Anatomia do coração: Clínica e cirúrgica* (Mandarin CA, ed). pp. 49-75. Revinter: Rio de Janeiro.
- Mello MLS, Vidal BC (1972) Anisotropic properties of Toluidine Blue-stained collagen. *Ann. Histochem.* **18**, 103-122.
- Mello MLS, Vidal BC. (1980) *Práticas de Biologia Celular*. Edgar Blücher: Campinas, SP. Funcamp.
- Mello MLS, Vidal BC (2003) Experimental tendon repair: glycosaminoglycan arrangement in newly synthesized collagen fibers. *Cell. Mol. Biol.* **49**(4), 579-585.
- Misawa Y, Oki SI, Tezuka Y, Fuse K (2001) An unusual complication associated with the Carpentier-Edwards porcine bioprosthesis. *ASAIO J.* **47**, 563-564.
- Moore KL, Dalley AF (2001) Tórax. In: *Anatomia Orientada para a Clínica* (Moore KL, Dalley AF eds). pp. 53-151. Guanabara-Koogan: Rio de Janeiro.
- Nesralla IA, Sant'Anna JRM (1994) Valvopatias Cirúrgicas. In: *Cardiologia cirúrgica; perspectivas para o ano 2000* (Nesralla I, ed). pp. 441-447. Fundo Editorial BYK: São Paulo.
- Ranganathan N, Lam JH, Wigle ED, Silver MD (1970) Morphology of the human mitral valve II-the valve leaflets. *Circulation.* **XLI**, 459-567.
- Ren JF, Aksut S, Lighty Jr GW, Vigilante GJ, Sink JD, Segal BL, Hargrove WC (1996) Mitral valve repair is superior to valve replacement for the early preservation of cardiac function : relation of ventricular geometry to function. *Am. Heart J.* **133**, 974-981.

- Roughley PJ, White RJ (1989) Dermatan sulphate proteoglycans of human articular cartilage. The properties of dermatan sulphate proteoglycan I and II. *Biochem. J.* **295**, 823–827.
- Shoen FJ (1999) The Heart. In: *Robins Pathologic Basis of Disease* (Cotran RS, Kumar V, Collins T, eds). pp. 543-599. Saunders Company: United States of America.
- Tamura K, Fukuda Y, Ishizaki M, Masuda Y, Yamanaka N, Ferrans VJ (1995) Abnormalities in elastic fibers and other connective-tissue components of floppy mitral valve. *Am. Heart J.* **129**, 1149-1158.
- Vynios DM , Papageorgakopoulou N, Sazakli H, Tsiganos CP (2001) The interactions of cartilage proteoglycans with collagens are determined by their structures. *Biochimie.* **83**, 899-906.
- Vidal BC (1964) The part played by the mucopolysaccharides in the form birefringence of the collagen. *Protoplasma.* **59**, 472-479.
- Vidal BC (1976) Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. *Cell. Mol. Biol.* **22**, 45-64.
- Vidal BC (1980) Feixes de colágeno: detecção e quantificação de ordem macromolecular I. Dicroísmo com corantes azóicos sulfatados (Orange G, Xylidine Ponceau e Sirius Red). *Ciência e Cultura.* **32**(5), 603-611.
- Vidal BC (1980) The part played by proteoglycans and structural glycoproteins in the macromolecular orientation of collagen bundles. *Cell. Mol. Biol.* **26**, 415-421.

- Vidal BC, Mello MLS (1984) Proteoglycan arrangement in tendon collagen bundles. *Cell Mol. Biol.* **30**, 195-204.
- Vidal (1984) Orden molecular y haces do colageno (Molecular order and collagen bundles). *Trab. Inst. Cajal LXXV*, 19-27.
- Vidal BC (2003) Image analysis of tendon helical superstructure using interference and polarized light microscopy. *Micron.* **34**, 423-432.
- Vogel KG, Sandy JD, Pogány G, Robbins JR (1994) Aggrecan in bovine tendon. *Matrix.* **14**, 171-179.
- Whittaker P, Boughner DR, Perkins DG, Canham PB (1987) Quantitative structural analysis of collagen in chordae tendineae and its relation to floppy mitral valves and proteoglycan infiltration. *Br. Heart J.* **57**, 264-269.
- Wight TN, Heinegård D, Hascall VC (1991) Proteoglycans. Structure and function. In: *Cell biology of the extracellular matrix* (Hay ED, ed). p. 45-78. Plenum Press: New York.
- Wight TN (2002) Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **14**, 617-623.

Artigo 2

ANÁLISE DE PROTEÍNAS E PROTEOGLICANOS DA MATRIZ EXTRACELULAR DO FOLHETO E CORDA TENDÍNEA DA VALVA MITRAL DE PORCO.

RESUMO

Muitos estudos já foram realizados sobre a composição da valva mitral de porco, mas ainda faltam informações sobre a composição de proteínas não colagênicas e proteoglicanos no folheto e corda tendínea desta valva, principal razão deste estudo. Componentes da matriz extracelular do folheto e da corda tendínea da valva mitral de porco, foram extraídos com GuHCl 4M, fracionados em DEAE-Sephacel, e analisados em SDS-PAGE. Glicosaminoglicanos (GAGs) foram analisados em gel de agarose-propilenodiamino, e grandes proteoglicanos em gel de agarose-poliacrilamida, ambos corados com azul de toluidina. Análise em SDS-PAGE mostrou a presença de proteínas com massa molecular aparente entre 19-179kDa para o folheto e 19-235kDa para a corda tendínea. Várias proteínas encontradas nos folhetos são também encontradas nas cordas tendíneas, com prováveis funções estruturais e regulatórias. Em ambos os tecidos foram encontrados componentes polidispersos em torno de 67kDa e 80-100kDa, os quais provavelmente correspondem aos pequenos proteoglicanos fibromodulim e decorim, respectivamente. Análise de GAGs após digestão com papaína, mostrou a presença de

condroitim sulfato (CS) e dermatam sulfato (DS) em ambos os tecidos. Também a análise das frações de DEAE-Sephacel, ricas no componente polidisperso de 80-100kDa, que foram β -eliminadas, tratadas com condroitinases ABC/AC, mostrou a presença de bandas de CS e DS. Em análise de frações de DEAE-Sephacel da fração D4 de ultracentrifugação somente o DS foi detectado nas duas regiões. Análise de fração D1 de ultracentrifugação, mostrou a presença de um único componente polidisperso metacromático, tanto no folheto, como na corda tendínea, indicando a presença de proteoglicano de alto peso molecular, que provavelmente trata-se do versicam. A presença destes proteoglicanos sugerem a presença de forças compressivas no folheto e também na corda tendínea.

INTRODUÇÃO

A valva mitral, uma das estruturas mais complexas de tecido conjuntivo de todo o corpo, tem a importante função de impedir o retorno do sangue do ventrículo esquerdo para o átrio esquerdo durante a sístole (Guyton & Hall, 2002). É composta por um anel valvar, folhetos, cordas tendíneas e músculos papilares (Nesralla & Sant'Anna, 2002). A matriz extracelular (MEC) do tecido conjuntivo da valva mitral em geral é composta por 3 grandes classes de macromoléculas, os colágenos, proteoglicanos (PGs), e proteínas não colagênicas.

Colágenos são macromoléculas estruturais da MEC, capazes de interagir entre si, e se arranjar para oferecer resistência aos tecidos (Silver *et al*, 2000). É o mais abundante componente dos folhetos da valva mitral (Cochran *et al*, 1991), compreendendo aproximadamente 50% do seu peso seco, enquanto a elastina representa cerca de 13% (Bashey *et al*, 1967). As válvulas resistem à pressão sanguínea devido à resistência dos feixes de colágeno, e à elasticidade das fibras elásticas (Faria, 1999). O colágeno do tipo I, encontrado principalmente em tendão, osso e pele (Bashey *et al*, 1978), constitui 74% do colágeno da valva mitral (Tamura *et al*, 1995; Cole *et al*, 1984). O tipo III, encontrado em pele, vasos e membranas fetais (Bashey *et al*, 1978), constitui 24%, e o tipo V, 2 % do total de colágeno da valva mitral (Tamura *et al*, 1995; Cole *et al*, 1984). As moléculas de colágeno, em combinação com moléculas de PGs formam estruturas em rede que mantém a integridade mecânica dos tecidos (Silver *et al*, 2000).

Os proteoglicanos são complexos macromoleculares formados por um cerne protéico, ao qual estão covalentemente ligados uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs). Diferenças nos cernes protéicos, e nos tipos, quantidades e comprimentos de cadeias de GAGs, assim como no padrão de sulfatação proporcionam enorme variabilidade aos proteoglicanos, permitindo que estes desempenhem diversas funções estruturais e organizacionais nos tecidos (Hascall & Hascall, 1985; Hardingham & Fosang, 1992). PGs de alto peso molecular como versicam e baixo peso como decorim e biglicam foram encontrados na valva mitral (Grande-Allen *et al*, 2004). Versicam possui cadeias de GAGs do tipo CS, cuja função é oferecer resistência às forças de compressão. Está também presente nas paredes arteriais (Rothenburger *et al*, 2002), e na MEC de vários outros tecidos, possuindo não apenas funções estruturais e biomecânicas, mas também função na migração, proliferação, adesão celular e montagem da MEC (Wight, 2002). O decorim presente em todos os tecidos conjuntivos fibrosos (Kuc & Scott, 1997; Comper, 1996), possui apenas uma cadeia de GAG que pode ser CS ou DS (Knudson & Knudson, 2001; Hardingham & Fosang, 1992), com funções de regulação da fibrilogênese do colágeno, modulação da atividade do fator de crescimento e regulação do crescimento celular (Weber *et al*, 1996). O biglicam é de distribuição mais restrita que o decorim (Kuc & Scott, 1997), possui 2 cadeias de GAGs, que pode ser CS ou DS (Knudson & Knudson, 2001; Hardingham & Fosang, 1992), e é um regulador da formação óssea, podendo também estar relacionado à adesão celular e estruturação da matriz. (Knudson & Knudson, 2001).

A matriz extracelular contém diversas proteínas importantes em adição às macromoléculas de colágeno e proteoglicanos. As proteínas não colagênicas, formam um importante grupo de proteínas que podem servir como mediadores da adesão celular na

MEC (Comper, 1996). No tecido conjuntivo da valva mitral, estão presentes proteínas como a fibronectina, fibrina (Faria, 1999), vitronectina (Akhtar *et al*, 1999), fibrilina (Nasuti *et al*, 2004), e elastina (Tamura *et al*, 1995; Akhtar *et al*, 1999). Fibronectina foi encontrada associada aos colágenos I e III, vitronectina as microfibrilas das fibras elásticas (Akhtar *et al*, 1999), e fibrilina associada a elastina, colágeno I e III (Nasuti *et al*, 2004).

A valva mitral em seres humanos é a mais freqüentemente acometida nas doenças das valvas do coração (Moore & Dalley, 2001). As valvas estão sujeitas a stress por mecanismos biomecânicos fortes e repetitivos, podendo assim, sofrer lesões degenerativas pelo acúmulo de cálcio (Shoen, 1999). Os nódulos calcificados podem ser foco para endocardite infecciosa, uma das mais graves de todas as infecções (Robbins, 2000). Como resultado da febre reumática, ocorre cicatrização fibrótica dos folhetos, com redução da elasticidade, havendo também encurtamento, espessamento e fusão das cordas tendíneas, com conseqüente redução do fluxo sanguíneo (Guyton & Hall, 2002; Gartner & Hiatt, 1999; Shoen, 1999). Uma das desordens cardíacas mais comuns, é o prolapso da valva mitral (PVM), onde um ou ambos folhetos ficam superiores ao plano do anel mitral (Goldman & Braunwald, 2000), tendo sido constatados anormalidades e desequilíbrio na produção de colágeno (Henney *et al*, 1982; Cole *et al*, 1984), com desorganização dos feixes (Tamura *et al*, 1995), aumento na quantidade de ácido hialurônico e de GAGs (Lis *et al*, 1987), com acúmulo de PGs, além de alterações na agregação e organização do componente amorfo e microfibrilas das fibras elásticas tanto no folheto, como na corda tendínea (Tamura *et al*, 1995). Frequentemente a valva mitral inteira era substituída por uma prótese valvar, entretanto, mais recentemente, com o aparecimento de novas técnicas de reparo e desenvolvimento contínuo de materiais biocompatíveis, substituição de porções

da valva tornou-se uma grande possibilidade (Kunzelman & Cochran, 1992), por resultar em menos complicações e melhor preservação da mecânica ventricular (David *et al*, 1983). Informações detalhadas sobre a estrutura e propriedades mecânicas do tecido são essenciais seja para o “design” de valvas biossintéticas ou para a reconstrução com material autólogo ou sintético (Kunzeman & Cochran, 1992).

Devido a importância da valva mitral, como estrutura anátomo-funcional, e devido à importância da composição da MEC para que a valva possa exercer sua função, é que estamos analisando os componentes da MEC do folheto e das cordas tendíneas da valva mitral de porco, que é anatomicamente muito similar com a valva humana.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material biológico

Foram utilizadas valvas mitrais de coração de 30 porcos com idade entre 4 e 6 meses provenientes do Abatedouro Marchiori da cidade de Amparo - SP. Imediatamente após o abate, folhetos e cordas tendíneas foram retiradas, lavadas em solução fisiológica 4°C, e processadas para análise Bioquímica.

Extração dos componentes da matriz extracelular

Folhetos e cordas tendíneas foram picados em pequenos pedaços e homogeneizados em PBS com homogeneizador Polytron-Aggregate de 12mm de diâmetro. A homogeneização foi por três vezes consecutivas com intensidade 5, por 40 segundos cada, com um intervalo de 15 segundos entre uma e outra. Em seguida o material foi submetido a centrifugação em 18.000 rpm (centrífuga Beckman J2-21 – rotor JA-20) durante 50 minutos, ao precipitado foram acrescentados 15 volumes de cloridrato de guanidina (GuHCl) 4M, contendo inibidores de proteases como o fluoreto de fenilmetil sulfonil (PMSF) 1mM, etilenodiaminotetracético (EDTA) 20 mM, em tampão acetato sódio 50mM, pH 5,8 (Heinergård & Sommarin, 1987). A extração foi 48 horas sob constante agitação e em banho de gelo. Após o término da extração, material foi submetido à centrifugação com 18000 rpm em um rotor JA-20 da Beckmann por 50 minutos. O sobrenadante foi utilizado para as análises bioquímicas.

Ultracentrifugação

Parte do extrato total foi submetido à ultracentrifugação em gradiente de cloreto de céσιο (CsCl) segundo Hascall & Sajdera (1969). Para este procedimento foram adicionados 0,35g de CsCl por grama de extrato, de modo que a densidade obtida ficasse 1,35g/ml. A centrifugação foi de 34000 rpm por 63 horas, a 15°C (centrífuga Beckman L-8-80 M, rotor 80 Ti). Após este período de centrifugação foram obtidas as frações D1, D2, D3 e D4 do fundo do tubo para o topo, respectivamente.

Análise quantitativa

Para dosagem de proteínas solúveis foi utilizado o método de Bradford (1976), usando diferentes concentrações de solução de BSA (albumina de soro bovino) para curva padrão. A leitura foi em 596nm. Para a quantificação de glicosaminoglicanos sulfatados foi utilizado o DMMB (azul de dimetilmetileno) (Farndale *et al*, 1986). Para a curva padrão foi utilizado o Condroitim sulfato, a leitura foi em 526nm. A quantificação de hidroxiprolina foi realizada a partir de fragmentos dos folhetos e cordas tendíneas hidrolisadas em HCl 6N (1ml/10mg de tecido) por 4h a 130°C. A seguir foi acrescentado 1,41g de cloramina-T, 10 ml de água, 10 ml de n-propanol e 80ml de tampão (50g de ácido cítrico, 12ml de ácido acético, 120g de acetato de sódio e 34 g de hidróxido de sódio, pH6,0) e após 20 minutos foi adicionado 1ml de solução de ácido perclórico/aldeído (15g de p-dimetilamino benzaldeído, 60ml de n-propanol, 26ml de ácido perclórico a 60% e n-propanol para completar 100ml). O material foi incubado por 15 min em 60°C, resfriado e a

absorbância lida em 550nm (Stegemann & Karlheinz, 1967). Em todos os casos foi usado espectrofotômetro Hewlet Packard 8452A.

Diálise

Amostras de 3ml do extrato total em GuHCl 4M, foram utilizadas para diálise contra uréia 7M, em tampão Tris-acetato 0,05M pH 8,0. Foram realizadas quatro trocas da uréia 7M, utilizando vinte vezes o volume dialisado, deixando deste modo a amostra pronta para ser utilizada na cromatografia de troca iônica.

Cromatografia de Troca iônica

A amostra (3ml) foi fracionada em coluna de troca iônica com resina de dietilaminoetil-Sephacel (DEAE-Sephacel 1,5x2,7 cm), equilibrada com uréia 7M em tampão Tris-acetato 0,05M pH8,0. As frações foram eluídas utilizando gradiente de NaCl 0,1-1M, no mesmo tampão com uréia. Frações de 2,8ml foram coletadas e monitoradas por absorbância em 230 e 280 nm em espectrofotômetro (Hewlet Packard 8452A).

Gel de Poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)

Amostras de frações de cromatografia foram precipitadas em etanol-acetato (Heinegård & Sommarin, 1987), 3 vezes com trocas a cada 12 horas e então centrifugadas em Microcentrífuga Fisher Scientific Model 235 Va 8000, a 8000 rpm por 4 minutos. O

sobrenadante foi descartado e o precipitado levado em estufa à 37°C para secagem e suspenso em tampão de amostra contendo Tris-HCl 6,5 mM, SDS 2%, glicerol 10%, EDTA 1mM em pH 6,8 e azul de bromofenol 0,01% na ausência ou presença de β -Mercaptoetanol (β -Me 2%). A eletroforese foi realizada conforme Zingales (1984). As amostras obtidas após cromatografia de troca iônica foram analisadas em gel com gradiente de 4 - 16% de acrilamida em presença de SDS com gel de empacotamento de 3,5% de acrilamida, usando o sistema de tampão de acordo com Laemmli (1970). A coloração do gel foi feita pelo Coomassie Blue R-250. As massas moleculares aparentes (M_r) das proteínas foram inferidas por cálculo de R_f das bandas visualizadas no gel e curva de regressão dos marcadores de peso molecular (Klaus & Osborn, 1969).

Eletroforese em gel de Agarose-Propileno diamino(PDA)

Os GAGs obtidos por tratamento enzimático com papaína, e por β -eliminação, foram analisados por eletroforese em gel de agarose. Padrões conhecidos de glicosaminoglicanos contendo condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS) e heparim sulfato (HS) foram aplicados paralelamente. O tampão utilizado foi o propileno diamino 50mM, pH 9,0. As condições de corrida foram 0,1A e 100 V. Após a corrida os géis foram fixados em Cetavlon (brometo de cetiltrimetilamonio) 0,1% e corados com azul de Toluidina 0,1% em etanol 50% e ácido acético 1% (Dietrich & Dietrich, 1976).

β-eliminação

Para análise das cadeias de GAGs dos PGs eluídos da cromatografia de troca iônica, amostras foram precipitadas em acetato-etanol, como mostrado acima, incubadas durante 19 horas com 0,5ml de NaOH 0,5M à 4°C e em seguida precipitadas com álcool etílico absoluto, lavadas em etanol 80% e por último lavadas em acetona. As cadeias de GAGs obtidas foram analisadas em gel de agarose-propileno.

Tratamentos enzimáticos

Digestão com papaína

Para análise dos glicosaminoglicanos do tecido, o material ficou em acetona overnight a 4°C, e em seguida 24 horas de estufa a 37°C. Depois de seco e picado, foi acrescentado papaína na proporção de 40mg/g de tecido, em tampão citrato de sódio 0,03M contendo EDTA 0,04M e β-Me 0,08M (80μl/1ml) (Michelacci and Horton, 1989). O preparado foi incubado em banho maria a 50°C por 24 horas. Ao sobrenadante após centrifugação em microcentrífuga Fisher a 8.000 r.p.m. por 3 minutos foram adicionados 2 volumes de etanol. O precipitado final foi lavado com etanol 80%, acetona e secado na estufa a 37°C. Os glicosaminoglicanos obtidos após digestão com papaína, foram suspensos em 140μl de água para a corda tendínea e em 60μl para o folheto, e após analisados em gel de agarose.

Digestão com condroitinase ABC/AC

Condroitinases ABC e AC (SIGMA) foram usadas para digestão. Após β -eliminação, o material foi suspenso em 10 μ L de Tampão Tris-Acetato 50 mM e EDTA 10 mM pH 8.0 para chace ABC e pH 6.0 para chace AC (Beeley, 1985). Após 20 horas de incubação a 37°C, os GAGs foram precipitados em etanol e analisados em gel de agarose-propilenodiamino.

Digestão com Colagenase

Algumas frações obtidas da cromatografia de troca iônica foram precipitadas em etanol como descrito acima, suspensas em 10 μ l da enzima Colagenase tipo VI (Sigma), e incubadas à 37°C durante 90 minutos. Em seguida, as amostras foram precipitadas, suspensas em tampão de amostra e analisadas em SDS-PAGE.

Gel de Agarose-Poliacrilamida

Amostras da fração D1 provenientes da ultracentrifugação foram precipitadas, lavadas em 2 volumes de etanol e suspensas em solução de SDS 0,5% de modo a conter de 0,25mg a 2mg/ml de proteoglicanos. A utilização de SDS na incubação da amostra antes da eletroforese, facilita a entrada dessas macromoléculas no gel, pois o SDS dificulta a interação dos proteoglicanos com as demais proteínas de matriz (Oegema, 1979). Após incubar à 37°C durante 2 horas, foi adicionado igual volume de sacarose 60% e azul de bromofenol 0,05% em tampão estoque (Tris-acetato 0,04M, Na₂SO₄ 1mM, pH 6,8). A solução de acrilamida foi preparada com 0,912g de acrilamida, 0,048g de Bis-acrilamida

em 10ml de água dos quais utilizamos 1,64ml, 0,0115g de TritonX-100 e 49 μ l de TEMED. Solução agarose 0,0786g de agarose em 7,376ml de tampão estoque e 0,0393g de PAM em 0,983ml de água. A eletroforese correu usando 2-4 Volts por centímetro de gel durante dez horas. O tampão estoque foi diluído 4 vezes e utilizado como tampão de corrida (Heinergård *et al*, 1985). Amostras da fração D1 foram precipitadas, lavadas e suspensas em tampão stock sem SDS.

RESULTADOS

Dosagem de proteínas e glicosaminoglicanos

Análise das dosagens de proteínas e glicosaminoglicanos sulfatados realizadas nos extratos totais obtidos do folheto da valva mitral e corda tendínea, mostrou que a corda tendínea apresenta maior quantidade de proteínas (P) e glicosaminoglicanos (GAG) quando comparada com o folheto (fig.1A). A quantidade de hidroxiprolina quantificado a partir de hidrolisado de fragmentos da corda tendínea e dos folhetos também mostrou uma concentração maior de hidroxiprolina na corda do que no folheto (fig.1B)

Cromatografia de Troca Iônica e SDS-PAGE

Os componentes do folheto e corda tendínea extraídos com GuHCl, foram fracionados por cromatografia em DEAE-Sephacel. As proteínas ligadas ao DEAE foram eluídas com um gradiente de NaCl (fig.2A e 2D), e analisadas por eletroforese em gel de SDS-Poliacrilamida (fig.2B e 2E). Analisando-se o resultado da cromatografia e do gel, nota-se que no caso do folheto, praticamente todas as proteínas com a exceção de 2 polipeptídeos que devem corresponder às cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ do colágeno, se ligaram ao DEAE e só foram eluídos com a presença de concentrações crescentes de NaCl. Já em relação à corda tendínea, além das cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ de colágeno, nas frações que continha material que não se ligou ao DEAE, também estava presente um componente polidisperso com Mr próxima de 67kDa. A presença das cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ de colágeno nas frações anteriores ao início do gradiente de NaCl, foi confirmado após digestão com colagenase (fig.2C e 2F).

Análise do material ligado ao DEAE mostrou várias proteínas com mesmo M_r e comportamento similar em gel de SDS-poliacrilamida, em corda e folheto, como as proteínas com 19, 22, 35, 40, 43 e 62 kDa. Outras proteínas com 58, 76, 84, 97, 119, 161 e 179 kDa foram encontradas só em folheto, e proteínas com 28, 54 e 235 kDa na corda tendínea. Nenhuma modificação foi observada na migração destas proteínas quando a eletroforese foi corrida em presença de agente redutor como o β -mercaptoetanol (resultado não mostrado).

Em ambos os tecidos foram observadas bandas polidispersas em torno de 67kDa e 80-100kDa, que provavelmente representem os pequenos proteoglicanos fibromodulim e decorim.

Gel de Agarose-Propileno diamino (PDA)

A análise de GAGs em gel de agarose propileno diamino após digestão do tecido com papaína revelou a presença de DS e CS tanto no folheto quanto na corda tendínea (fig. 3A e 3B). Também foram analisadas amostras das frações, eluídas de DEAE-Sephacel, ricas no componente polidisperso de 80-100 kDa, que exibe um comportamento em gel semelhante ao decorim. Estas amostras foram submetidas à β -eliminação e analisadas por eletroforese em gel de agarose propileno diamino. Em ambas as amostras foram encontrados DS e CS. A presença destes GAGs foram comprovadas após tratamento com Chase ABC/AC (fig.3C e 3D). Já em análise das frações da cromatografia de D4 da ultracentrifugação submetidas à β -eliminação e tratadas com condroitinases ABC/AC, mostrou somente a presença do GAG DS (fig. 3E e 3F).

Gel de Agarose-poliacrilamida

Para avaliar a presença de proteoglicanos de alto peso molecular, amostras da fração D1 da ultracentrifugação do extrato total do folheto e corda tendínea foram analisadas em gel de agarose-poliacrilamida após tratamento com SDS 0,5% e com Triton X-100 0,1%. Uma banda polidispersa e metacromática após coloração com AT foi encontrada em ambos os tecidos (fig.4).

DISCUSSÃO

A necessidade da presença do agente caotrópico GuHCl 4M, para a extração dos componentes da matriz extracelular da valva mitral e corda tendínea, significa que estes componentes estão interagindo fortemente entre si, para constituir a matriz extracelular, que vai ser responsável pelas propriedades mecânicas do tecido.

Análises das dosagens dos extratos totais do folheto e corda tendínea mostraram que as quantidades de GAGs e proteínas são maiores na corda tendínea do que no folheto, o que condiz com os resultados obtidos pela cromatografia em DEAE-Sephacel, onde maiores valores de absorbância tanto antes da aplicação do gradiente de NaCl (proteínas catiônicas), como depois (proteínas aniônicas) foram encontradas no extrato da corda tendínea, e menos no caso do folheto. Possivelmente estas diferenças tenham ocorrido devido ao estado mais hidratado e menos compactado do folheto, em relação à corda tendínea. De qualquer forma é interessante observar a grande variedade de proteínas presentes tanto no folheto como na corda tendínea.

As proteínas de carga positiva correspondem em sua maioria ao colágeno, componente de valva mitral já bem conhecido (Kunzelman & Cochran, 1992; Bashey *et al*, 1978). As proteínas de carga negativa, detectadas nas frações eluídas de DEAE-Sephacel após aplicação de gradiente de NaCl, possuem massa molecular aparente entre 19-179kDa para o folheto e 19-235kDa para a corda tendínea. Pelo valor de Mr e característica das bandas no gel, os resultados obtidos indicam que várias proteínas encontradas nos folhetos são também encontradas nas cordas tendíneas, o que é esperado pois embora corda e

folheto possuam diferenças estruturais e funcionais, são estruturas contínuas e constituintes da mesma valva. Estas proteínas, até agora não detectadas em valva mitral de porco, provavelmente possuam funções estruturais, uma vez que interagem com os vários componentes da matriz, dedução óbvia se considerarmos que foram extraídas em presença de agentes caotrópicos, mas possíveis funções regulatórias não devem ser descartadas.

Em ambos os tecidos foram encontrados componentes polidispersos com Mr em torno de 67kDa e 80-100kDa, os quais provavelmente correspondem aos pequenos proteoglicanos fibromodulim e decorim, respectivamente. A banda de 80-100kDa possui comportamento eletroforético muito parecido com o decorim encontrado na pele (Kuc & Scott, 1997), tendões (Scott *et al*, 1981) e cartilagem (Heinegard & Pimentel, 1992). A hipótese de que este componente de 80-100 kDa corresponda ao pequeno proteoglicano decorim é reforçada pela análise em gel de agarose após a digestão com papaína, onde encontramos além do GAG CS, o DS. Também a análise das frações de DEAE-Sephacel, ricas no componente polidisperso de 80-100kDa, que foram β -eliminadas, tratadas com condroitinases ABC/AC e aplicadas em gel de agarose-PDA, mostrou a presença da bandas de CS e DS. Para se ter certeza que o DS era proveniente de decorim, foi feita análise de frações de DEAE-Sephacel da fração D4 de ultracentrifugação que não contém grandes proteoglicanos, e somente o DS foi detectado. É conhecido que o decorim de tecidos moles possui DS e não CS, como aqueles encontrados em ossos (Bianco *et al*, 1990).

O componente polidisperso de 67kDa, que estamos supondo tratar-se de fibromodulim, na verdade tem um valor de Mr que não confere com o Mr do pequeno proteoglicano fibromodulim, que foi descrito com Mr de 59kDa (Heinegård & Oldberg,

1989). É possível que esta diferença seja devido a uma maior extensão das cadeias de KS, já que o esqueleto protéico central é altamente conservado. O aparecimento de banda polidispersa com Mr de aproximadamente 67kDa nas frações eluídas antes do gradiente de NaCl, no material de corda tendínea, nos leva a pensar que parte da população deste componente esteja fortemente ligado ao colágeno, mantendo-os assim, mesmo na presença de Uréia 7M durante a cromatografia, só sendo dissociado do colágeno, nas condições altamente dissociantes em que é realizada a eletroforese. Não se pode descartar a hipótese de que este componente seja a proteína osteopontina, que possui Mr de 67kDa (Devoll *et al*, 1996), e foi encontrada em valvas aórticas (Shen *et al*, 1997). Outros experimentos ainda precisarão ser feitos para a identificação deste componente.

A presença de pequenos proteoglicanos é esperada no folheto e principalmente na corda tendínea, que possui feixes de colágeno altamente compactados (Kunzelman & Cochran, 1992; Whittaker *et al*, 1987), e necessitam dessas moléculas para regular a fibrilogênese, e auxiliar na orientação das fibrilas de colágeno (Scott, 1996; Hardingham & Fosang, 1992; Iozzo, 1997).

Grandes proteoglicanos identificados em cartilagem, tendões, aorta e esclera, com um grande número de cadeias laterais de glicosaminoglicanos, usualmente condroitim sulfato (Heinergård *et al*, 1985), foram também encontrados nos folhetos e cordas tendíneas da valva mitral, como mostrado nos resultados de eletroforese em gel de agarose-poliacrilamida, onde ocorre a presença de um único componente polidisperso metacromático. Em estudo realizado por Grande-Allen e colaboradores (2004), regiões que recebem forças de compressão contém o proteoglicano versicam, que é um grande proteoglicano presente na MEC de um grande número de tecidos moles (Wight, 2002). As

cadeias de GAGs CS deste PG criam domínios macromoleculares, com grandes volumes de água (Hardingham & Fosang, 1992), agregando com o ácido hialurônico (Wight, 2002). Estes constituintes macromoleculares são capazes de responder às variações nas forças de compressão, suportando as grandes forças pulsativas (Wight *et al*, 1991). A presença de um componente polidisperso metacromático foi encontrado também na corda tendínea, indicando a presença de grandes PGs também nesta estrutura, diferente dos dados encontrados na literatura. Se estes grandes proteoglicanos estão presentes só próximo à inserção da corda no folheto, onde é esperado uma presença mais marcante de força compressiva, ainda precisa ser esclarecido.

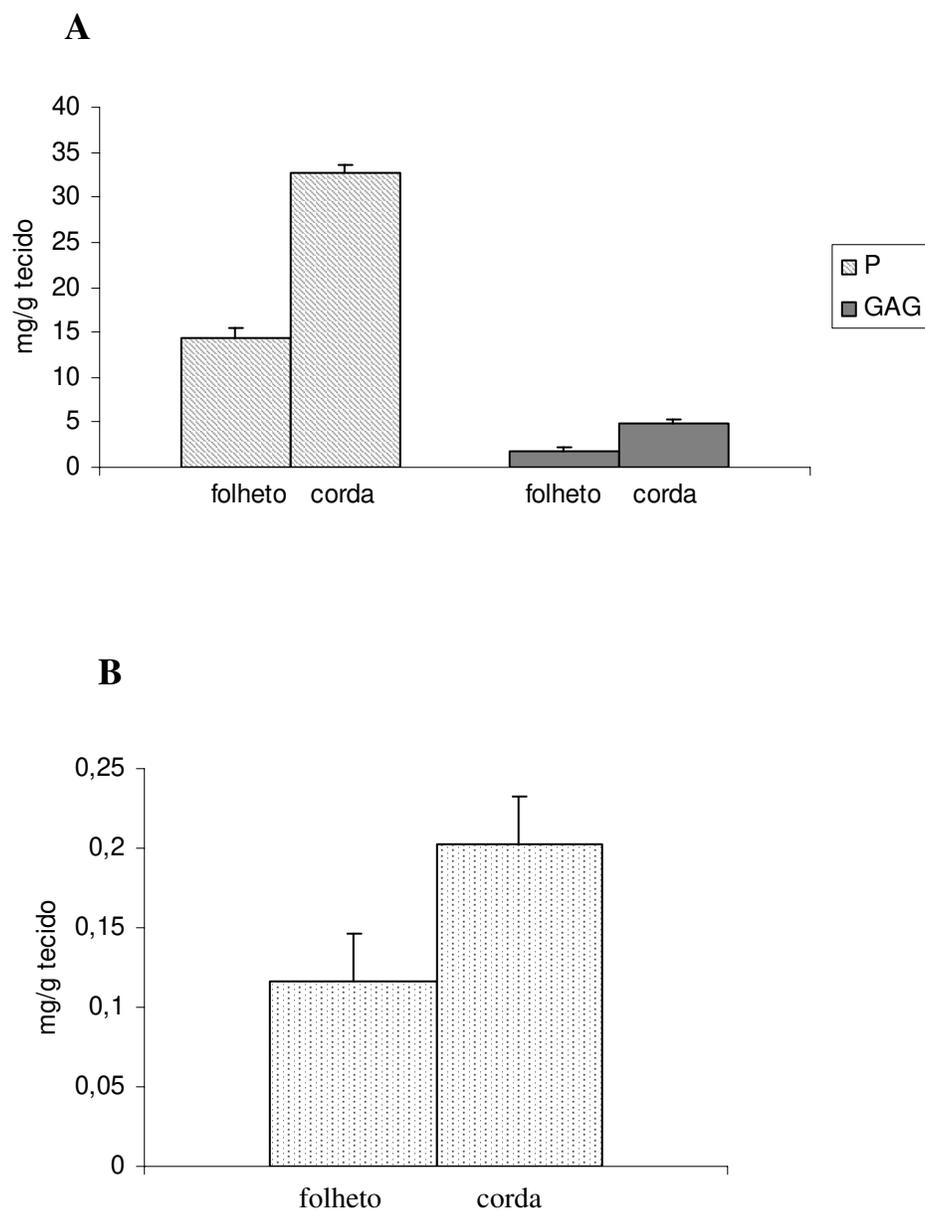


Figura 1

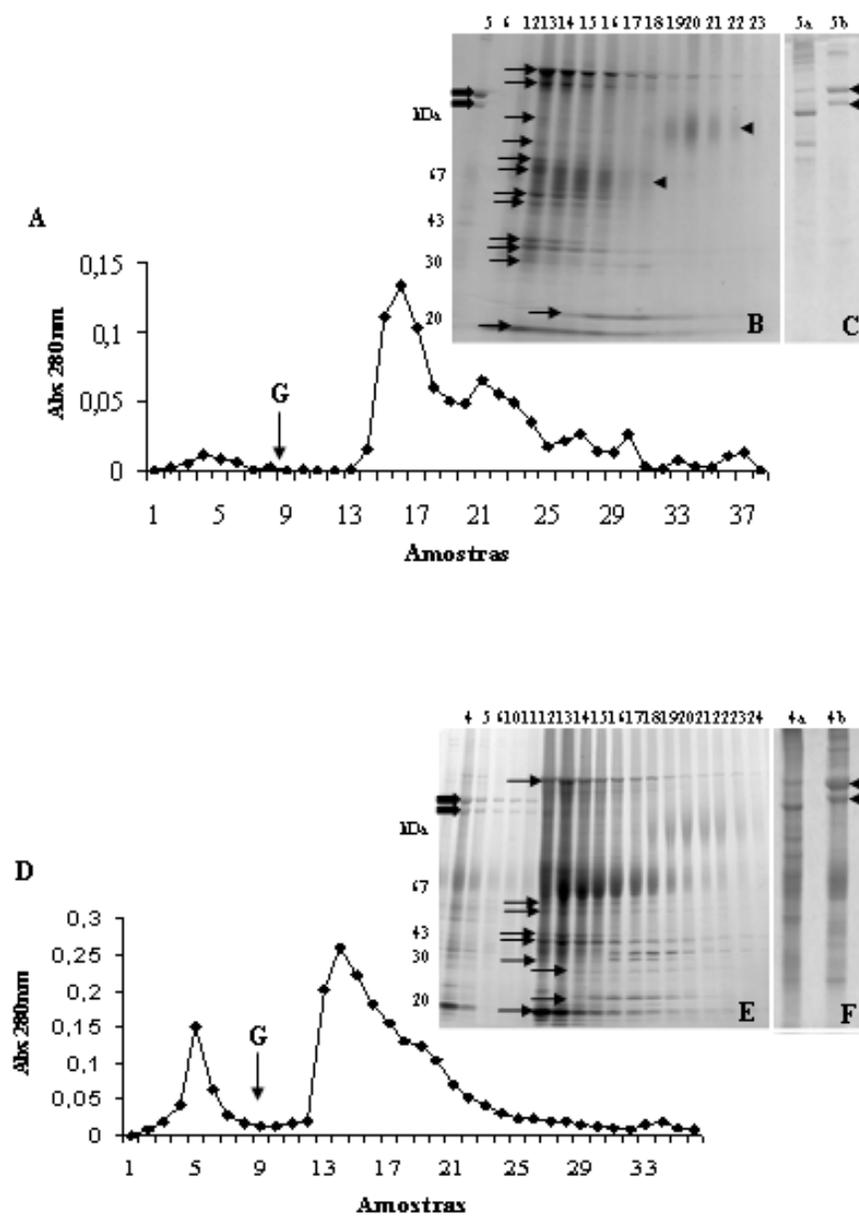


Figura 2

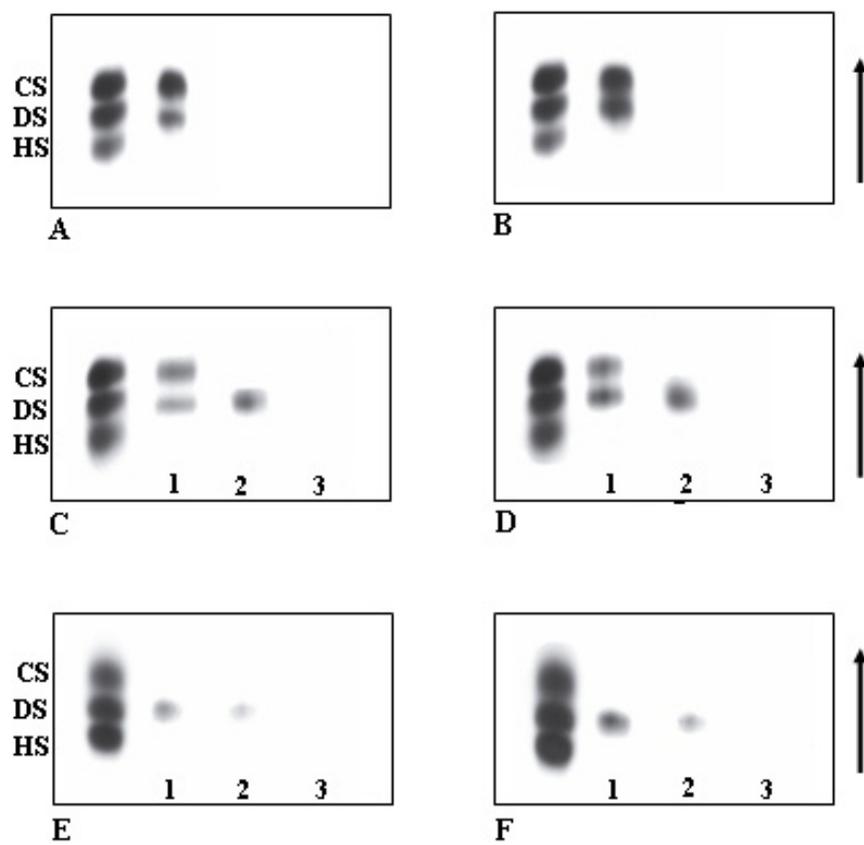


Figura 3

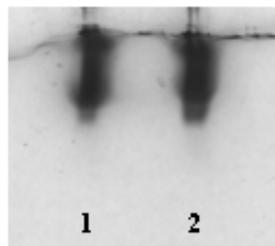


Figura 4

LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1 – Dosagem de proteínas, glicosaminoglicanos (**A**) e hidroxiprolina (**B**) do folheto e corda tendínea.

Figura 2 – Cromatografia (**A e D**) e eletroforese (**B,C,E e F**) - Cromatografia em DEAE-Sephacel do folheto (**A**) e corda tendínea (**D**). As proteínas foram eluídas após aplicação de um gradiente de NaCl (0,1 – 1,0 M). G – indica o início do gradiente. Eletroforese em SDS-Poliacrilamida do folheto (**B**) e corda tendínea (**E**). Observar as proteínas com 179, 161, 119, 97, 84, 76, 62, 58, 43, 40, 35, 22 e 19kDa (setas) em **B**, e proteínas com 235, 62, 54, 43, 40, 35, 28, 22 e 19kDa (setas) em **E**. Bandas polidispersas em torno de 67kDa e 80-100kDa podem ser vistas em **B e E** (cabeça de seta). À esquerda estão os marcadores de peso moleculares (LW). **C e F** – Eletroforese em SDS-Poliacrilamida das cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ de colágeno (setas cheias), tratadas (5a e 4a) e não tratadas (5b e 4b) com colagenase. Observe que estas proteínas foram digeridas pela enzima (cabeça de seta), tanto no folheto (**C**) quanto na corda tendínea (**F**).

Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose-propilenodiamino. **A e B** – GAGs obtidos após digestão do tecido total com papaína, do folheto (**A**) e corda tendínea (**B**). Nos dois casos pôde-se observar condroitim sulfato (CS) e dermatam sulfato (DS). **C e D** – GAGs obtidos após β -eliminação de frações de DEAE-Sephacel contendo componente polidisperso de 80 – 100kDa do folheto (**C**) e corda tendínea (**D**). Em 2 e 3 o material foi tratado com

condroitinases AC e ABC respectivamente. Em 1 não houve tratamento enzimático. **E e F** – GAG obtido após β -eliminação de frações de DEAE-Sephacel de frações de D4 da ultracentrifugação do folheto (**E**) e corda tendínea (**F**). Em 2 e 3 o material foi tratado com condroitinases AC e ABC respectivamente. Em 1 não houve tratamento enzimático. À esquerda estão os padrões de GAGs: condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS) e heparam sulfato (HS). A seta indica a direção da corrida.

Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose-poliacrilamida. As bandas polidispersas observadas correspondem a proteoglicano de alto peso molecular presentes no folheto (**1**) e corda tendínea (**2**).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akhtar S, Meek KM, James V (1999) Immunolocalization of elastin, collagen type I and type III, fibronectin, and vitronectin in extracellular matrix components of normal and mixomatous mitral heart valve chordae tendineae. *Cardiovasc. Pathol.* **8**, 203-11.
- Amoresano A, Amadeo S, Dandrea G, Siciliano R, Gagna C, Castagnaro M, Marino G, Guarda F (2000) N-Linked glycans of proteins from mitral valve of normal pigs and pigs affected by endocardiosis. *Eur. J. Biochem.* **267**, 1299-306.
- Bashey RI, Torii S, Angrist AA (1967) Age-related collagen and elastin content of human heart valves. *J. Gerontol.* **20**, 203-208.
- Bashey RI, Bashey HM, Jimenez SA (1978) Characterization of Pepsin-Solubilized Bovine Heart-Valve Collagen. *Biochem. J.* **173**, 885-894.
- Beeley JG (1985) Laboratory techniques in biochemistry molecular biology glycoprotein and proteoglycan techniques. 3rd. Elsevier: Oxford.
- Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey PG (1990) Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **38**, 1549-1563.
- Bradford MM (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein- Dye Binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Braunwald E (1997) The mitral valve prolapse. In: *Heart Disease* (Braunwald E, ed). pp.1029-1035. Saunders Company: Philadelphia, W.B.

- Cochran RP, Kunzelman KS, Chuong CJ, Sacks MS, Eberhart RC (1991) Nondestructive analysis of mitral valve collagen fiber orientation. *ASAIO Trans.* **37**, 447-8.
- Cole WG, Chan D, Hickey AJ, Wilcken DE (1984) Collagen composition of normal and mixomatous human mitral heart valves. *Biochem. J.* **219**, 451-60.
- Comper WD (1996) Water: Dynamic Aspects. In: *Extracellular matrix : Molecular components and interactions vol.2* (Comper WD, ed). pp. 1-21. Harwood Academic Publishers: Amsterdam.
- David TE, Uden DE, Strauss HD (1983) The importance of the mitral apparatus in left ventricular function after correction of mitral regurgitation. *Circulation.* **68** (Suppl. II), 76-82.
- Devoll RE, Pinero GJ, Appelbaum ER, Dul E, Troncoso P, Butler WT, Farach-Carson MC (1997) Improved Immunohistochemical Staining of Osteopontin (OPN) in Paraffin-Embedded Archival Bone Specimens Following Antigen Retrieval: Anti-Human OPN Antibody Recognizes Multiple Molecular Forms. *Calcif. Tissue Int.* **60**, 380-386.
- Dietrich CP, Dietrich SMC (1976) Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. *Anal. Biochem.* **70**, 645-647.
- Faria JL (1999) Aparelho Cardiovascular. In: *Patologia Especial: Com Aplicação Clínica* (Faria JL, ed). pp. 11-67. Guanabara- Koogan: Rio de Janeiro.
- Farndale RW, Buttle DJ, Barret AJ (1986) Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochem. Biophys. Acta.* **883**, 173-177.
- Gartner LP, Hiatt JL (1999) Sistema Circulatório. In: *Tratado de Histologia em cores* (Gartner LP, Hiatt JL, eds). pp. 201-215. Guanabara- Koogan: Rio de Janeiro.

- Goldman L, Braunwald E (2000) Reconhecimento e Tratamento dos Pacientes com Valvopatias Cardíacas. In: *Cardiologia na Clínica Geral* (Goldman L, Braunwald E, eds). pp. 354-372. Guanabara-Koogan: Rio de Janeiro.
- Grande-Allen KJ, Calabro A, Gupta V, Wight TN, Hascall VC, Vesely I (2004) Glycosaminoglycans and Proteoglycans in Normal Mitral Valve Leaflets and Chordae: Association with Regions of Tensile and Compressive Loading. *Glycobiology*. **14**(7), 621-633.
- Guyton AC, Hall JE (2002) Válvulas e Bulhas Cardíacas; Dinâmica dos Defeitos Valvulares e Congênitos do Coração. In: *Tratado de Fisiologia Médica* (Guyton AC, Hall JE, eds). pp. 232-239. Guanabara-Koogan: Rio de Janeiro.
- Guyton AC, Hall JE (2002) O Músculo Cardíaco; O Coração Como Uma Bomba. In: *Tratado de Fisiologia Médica* (Guyton AC, Hall JE, eds). pp. 92-102. Guanabara-Koogan: Rio de Janeiro.
- Hardingham TE, Fosang AJ (1992) Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J*. **6**, 861-870.
- Hascall VC, Hascall KG (1985) Proteoglycans. In: *Cell biology of extracellular matrix* (Hay ED, ed). pp. 39-63. Plenum Press: New York.
- Hascall VC, Sajdera SW (1969) Protein polysaccharide complex from bovine nasal cartilage: the function of glycoprotein in the formation of aggregates. *J. Biol. Chem.* **244**, 2384-2396.
- Hay ED (1985) *Cell biology of extracellular matrix*. Plenum Press: New York.

- Heinegård D, Oldberg Å (1989) Structure and biology of cartilage and bone matrix non collagenous macromolecules. *FASEB J.* **3**, 2042-2051.
- Heinegård D, Pimentel ER (1992) Cartilage matrix proteins. In: *Articular cartilage and osteoarthritis* (Kuettner KE, Scheleyerbach R, Peyron JG, Hascall VC, eds). pp. 95-114. Raven Press: New York
- Heinegard D, Sommarin Y (1987) Proteoglycans: an overview. *Methods Enzymol.* **144**, 319-373.
- Heinegård D, Sommarin Y, Hedbom E, Wieslander J, Larsson B (1985). Assay of proteoglycan populations using agarose-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **151**, 41-48.
- Henny AM, Parker DJ, Davies MJ (1982) Collagen biosynthesis in normal and abnormal heart valves. *Cardiovasc. Res.* **16**, 642-630.
- Iozzo RV (1997) The Family of the Small Leucine-Rich Proteoglycans: Key Regulators of Matrix Assembly and Cellular Growth. *Crit. Rev. in Biochem. and Mol. Biol.* **32**, 141-174.
- Klaus W, Osborn M (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**, 4406-4412.
- Knudson CB, Knudson W (2001) Cartilage proteoglycans. *Cell & Develop. Biol.* **12**, 67-78.
- Kuc IM, Scott PG (1997) Increased Diameters of Collagen Fibrils Precipitated in vitro in the Presence of Decorin from Various Connective Tissues. *Connect. Tissue Res.* **36**, 287-296.

- Kunzelman KS, Cochran RP (1992) Stress/Strain Characteristics of Porcine Mitral Valve Tissue: Parallel Versus Perpendicular Collagen Orientation. *J. Cardiac Surg.* **7**, 71-78.
- Laemmli VK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage ty. *Nature.* **227**, 680-685.
- Lis Y, Burleigh MC, Parker J, Child AH, Hogg J, Davies MJ (1987) Biochemical characterization of individual normal, floppy and rheumatic human mitral valve. *Biochem. J.* **244**, 597-603.
- Michelacci Y M, Horton DSPQ (1989) Proteoglycans from the cartilage of young hammerhead shark *Sphyrna lewini*. *Comp. Biochem. Physiol.* **92B**, 651-658.
- Moore KL, Dalley AF (2001) Tórax. In: *Anatomia Orientada para a Clínica* (Moore KL, Dalley AF, eds). pp. 53-151. Guanabara-Koogan: Rio de Janeiro.
- Nasuti JF, Zhang PJ, Feldman MD, Pasha T, Khurana JS, Gorman III JH, Gorman RC, Narula J, Narula N (2004) Fibrillin and Other Matrix Proteins in Mitral Valve Prolapse Syndrome. *Ann. Thorac. Surg.* **77**, 532-536.
- Nesralla IA, Sant'Anna JRM (1994) Valvopatias Cirúrgicas. In: *Cardiologia cirúrgica; perspectivas para o ano 2000* (Nesralla I, ed). pp. 441-447. Fundo Editoriual BYK: São Paulo.
- Oegema TR, Hascall V, Eisenstein R (1979) Characterization of bovine aorta proteoglycan extracted with guanidine hydrochloride in the presence of protease inhibitors. *J. Biol. Chem.* **254**(4), 1312-1318.
- Robbins SL (2000) O coração. In: *Patologia estrutural e funcional* (Robbins SL, ed). pp. 488-525. Guanabara-Koogan: Rio de Janeiro.

- Rothenburger M, Völker W, Vischer P, Berendes E, Glasmacher B, Scheld HH, Deiwick M (2002) Tissue Engineering of Heart Valves: Formation of a Three-Dimensional Tissue Using Porcine Heart Valve Cells. *ASAIO J.* **48**, 586-591.
- Scott JE (1996) Proteodermatan and Proteokeratan Sulfate (Decorin, Lumican/Fibromodulin). Proteins Are Horse Shoe Shaped. Implications for Their Interactions With Collagen. *Biochemistry.* **35**, 8795-8799.
- Scott JE, Orford CR, Hughes EW (1981) Proteoglycan-collagen relationships in developing chick and bovine tendons. Influence of the physiological environment. *Connect. Tissue Res.* **14**, 267-378.
- Shen M, Marie P, Farge D, Carpentier S, Pollak CD, Hott M, Chen L, Martinet B, Carpentier A (1997) Osteopontin is associated with bioprosthetic heart valve calcification in humans. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Life Sciences.* **320**, 49-57.
- Shoen FJ (1999) The Heart. In: *Robins Pathologic Basis of Disease* (Cotran RS, Kumar V, Collins T, eds). pp. 543-599. Saunders Company: United States of America.
- Silver FH, Christiansen DL, Snowhill PB, Chen Y (2000) Role of storage on Changes in the Mechanical Properties of Tendon and Self-Assembled Collagens Fibers. *Connect. Tissue Res.* **41**, 155-164.
- Stegemann H, Stalder K (1967) Determination of Hidroxyproline. *Clin. Chim. Acta.* **18**, 267-273.

- Tamura K, Fukuda Y, Ishizaki M, Masuda Y, Yamanaka N, Ferrans VJ (1995) Abnormalities in elastic fibers and other connective-tissue components of floppy mitral valve. *Am. Heart J.* **129**, 1149-1158.
- Weber IT, Harrison RW, Iozzo RV (1996) Model Structure of Decorin and Implications for Collagen fibrillogenesis. *J. Biol. Chem.* **271**, 31767-31770.
- Whittaker P, Boughner DR, Perkins DG, Canham PB (1987) Quantitative structural analysis of collagen in chordae tendineae and its relation to floppy mitral valves and proteoglycan infiltration. *Br. Heart J.* **57**, 264-269.
- Wight TN, Heinegård D, Hascall VC (1991) Proteoglycans. Structure and function. In: *Cell biology of the extracellular matrix* (Hay ED, ed). pp. 45-78. Plenum Press: New York.
- Wight TN (2002) Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **14**, 617-623.
- Zingales B (1984) Analysis of protein sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. In: *Genes and antigens of parasites* (Zingales B, ed). pp. 357-363. Fiocruz: Rio de Janeiro.

CONCLUSÕES

- A distribuição dos proteoglicanos na valva mitral de porco não é uniforme, indicando que as forças de compressão nestas regiões, não ocorrem de forma homogênea.
- Uma maior concentração de proteoglicanos parece ocorrer nas regiões de inserção das cordas tendíneas no folheto.
- A birrefringência observada revela que os feixes de colágeno estão altamente orientados, arranjados paralelamente na direção do eixo maior da corda tendínea, enquanto se dispõem em várias direções no folheto.
- As cordas tendíneas inserem-se na camada fibrosa do folheto abrindo em leque, ramificam e entrelaçam-se, formando um arranjo em rede no folheto.
- A corda tendínea apresenta uma maior concentração de proteínas e glicosaminoglicanos do que o folheto.
- A matriz extracelular da valva mitral de porco possui proteínas não colagênicas com Mr entre 19-179kDa para o folheto e 19-235kDa para a corda tendínea, sendo que as proteínas com Mr de 19, 22, 35, 40, 43 e 62kDa são encontradas em ambos os tecidos.
- As duas regiões apresentaram componentes polidispersos de 80-100kDa e 67kDa. A população de 80-100kDa apresenta o glicosaminoglicano dermatam sulfato, e provavelmente trata-se do pequeno proteoglicano decorim.
- Grandes proteoglicanos foram encontrados no folheto e na corda tendínea, e provavelmente trata-se de versicam.