

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Josete Mazon

**ESTUDO ESTRUTURAL E BIOQUÍMICO DO TECIDO CONJUNTIVO DA
VALVA AÓRTICA DE PORCO**

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

Orientador: Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel.

Co-Orientador: Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal.

M458e

Mazon, Josete

Estudo estrutural e bioquímico do tecido conjuntivo da valva aórtica de porco / Josete Mazon. --
Campinas, SP:[s.n.], 2004.

Orientador: Edson Rosa Pimentel

Co-orientador: Benedicto de Campos Vidal

Tese (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

1. Suíno. 2. Matriz extracelular. 3. Valva aórtica. 4. Proteoglicanos.
5. Colágeno. I. Pimentel, Edson Rosa. II. Vidal, Benedicto de Campos.
III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Campinas, 31 de maio de 2004.

BANCA EXAMINADORA

Professor Dr. Edson Rosa Pimentel.
(Orientador)

(Assinatura)

Professor Dr. Marcelo Esquisato

(Assinatura)

Professor Dr. Sebastião Roberto Taboga

(Assinatura)

Professor Dra. Laurecir Gomes

(Assinatura)

ÍNDICE

Resumo	13
Summary	15
Introdução	17
Objetivos	27
Referências bibliográficas	28
Artigo 1	33
Resumo	34
Introdução	35
Materiais e métodos	37
Resultados	40
Discussão	44
Figuras	54
Referências bibliográficas	60
Artigo 2	66
Resumo	67
Introdução	68
Materiais e métodos	71
Resultados	78
Discussão	80
Figuras	87
Referências bibliográficas	91
Conclusões	97

Menor que o meu sonho eu não posso ser.

Lindolf Bell

Deus ...

*Porque tu és a minha rocha e a minha fortaleza;
assim, por amor ao teu nome, guia-me e encaminha-me.*

(Salmo 31, 3)

Charles, meu grande companheiro, meu amor,
o meu muito obrigada por todo seu carinho e compreensão.

Tainan,

*filha amada, à você dedico a realização deste sonho, sem dúvida,
seu carinho e amor me deram forças e coragem para prosseguir e vencer.*

Muito obrigada, amor da minha vida....

À minha família,

*Maria (Cida), Mario e Especialmente a você Mãe, que é meu
porto seguro.*

Muito obrigada.

Um agradecimento Especial

Professor Edson,

obrigada por poder partilhar da companhia e orientação de uma pessoa tão especial como o senhor, sem dúvida uma orientação segura e dedicada. Obrigada por sempre compreender as adversidades que surgiram durante este tempo, sabendo sempre administrar da melhor forma possível. Sem dúvida o senhor é uma pessoa que sempre será um exemplo a ser seguido, e é com seus ensinamentos que pretendo seguir meus passos acadêmicos e profissionais daqui pra frente.

Muito obrigada por tudo.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Benedicto de Campos Vidal, pela co-orientação, por todo auxílio prestado com dedicação durante este período e também pelos seus ensinamentos e lições de vida.

À Dra. Laurecir Gomes, pelo auxílio e sugestões ao trabalho de bioquímica e pela ajuda prestada durante as eletroforeses. Muito obrigada Laure.

Aos Profs. Drs. Sebastião Roberto Taboga, Marcelo Esquisato e Profa. Dra. Laurecir Gomes, pela disponibilidade em participar da análise prévia deste trabalho.

Ao professor Dr. Hernandes F. de Carvalho por permitir o uso de sua infra-estrutura laboratorial para alguns ensaios preliminares para a realização do teste de hidroxiprolina.

À Heloísa Dela Colleta, Sílvia Pimentel e Eliane Antonioli, pela ajuda nos testes com condroitinases e por todas as vezes que recorri a vocês e sempre obtive auxílio.

À professora Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel por permitir o uso de sua infra-estrutura laboratorial, em especial a Ana Cristina Menoncelo por ter auxiliado no manuseio da Lupa para documentação fotográfica de algumas lâminas.

Ao técnico Francisco, pela inegável ajuda que sempre prestou durante este período, tendo paciência e dedicação para ensinar as técnicas e manuseios dos equipamentos de bioquímica. Muito obrigada.

Ao técnico Mario Bianchi, pela ajuda na realização das técnicas de histoquímica e preparo das lâminas.

Ao Gustavo P. Benevides, pela ajuda na realização dos primeiros testes com hidroxiprolina.

Ao amigo Alberto Moraes, pela grande ajuda nos programas de computação e por toda a ajuda prestada sempre da melhor forma possível. Muito obrigada.

Aos amigos Paulo, Lúcia (Lú, minha amiga), Tatiana (Tatinha, você é especial), muito obrigada por terem sempre dado apoio nos momentos mais difíceis, por terem oferecido o ombro pra chorar muitas vezes, mas por muito mais vezes terem oferecido momentos de muitas risadas. Sentirei muitas saudades, com certeza.

Aos amigos Marcela, André, Adriana, Antonella, Juliano e em especial a Flávia muito obrigada por estarem sempre ao meu lado tornando o caminho mais fácil de ser percorrido, sem dúvida sentirei saudades de vocês.

À Secretaria do Departamento de Biologia Celular, por todo apoio durante este período, em especial a Liliam Alves Senne Panagio e Sidnei Henrique Simões, pela inegável ajuda e auxílio prestados. Muito obrigada.

Ao Frigorífico e Abatedouro Marchiori, por cederem todas as vezes que solicitado, o espaço e os animais para a retirada do material para pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão da bolsa de mestrado.

E, a todos aqueles não mencionados especificamente, mas que de alguma forma estiveram presentes e contribuíram para a minha formação. Muito obrigada.

RESUMO

As cúspides da valva aórtica são constituídas principalmente de água (cerca de 80%), mas também contém proteínas colagênicas e não colagênicas, elastina, pequenos e grandes proteoglicanos, responsáveis por suas propriedades mecânicas. Estruturalmente são formadas por três camadas distintas, a fibrosa, a esponjosa e a ventricular. As camadas fibrosa e ventricular mantêm a integridade estrutural da valva, enquanto a esponjosa tem papel importante na absorção de forças mecânicas de tensão e compressão. As valvas aórticas de porco têm sido utilizadas para a produção de biopróteses, mas sua durabilidade tem sido prejudicada especialmente devido à calcificação, o que justifica a necessidade de um melhor conhecimento sobre seus aspectos organizacionais e composicionais. A montagem total dos folhetos valvares corados com azul de toluidina, mostrou uma estrutura fortemente corada, com componentes fibrosos e material metacromático acompanhando estes componentes. Estes componentes fibrosos emergiam das regiões de inserção da valva na parede da artéria, de ambos os lados do folheto e exibiram um trajeto preferencialmente longitudinal, seguindo o eixo mais longo do folheto. A análise em microscopia de polarização mostrou brilho intenso exibido pelas fibras e fibrilas evidenciando a distribuição altamente orientada dessas estruturas. A metacromasia foi intensa ao longo dos feixes de colágeno e em várias regiões distribuídas de maneira não uniforme no folheto. Análise de cortes histológicos mostrou as três camadas bem distintas do folheto, sendo duas fibrosas e uma intermediária com características de tecido conjuntivo frouxo. Os folhetos apresentaram grande quantidade de células com diferentes morfologias e distribuição, enquanto que, nas faces voltadas para a artéria aorta e para o ventrículo, foi encontrada uma

camada endotelial. Na camada fibrosa as células são alongadas, denominadas de fibroblastos, e apareceram dispostas ao longo dos feixes de colágeno. A camada ventricular apresentou células arredondadas, similares aos condrócitos. Na camada esponjosa foram encontrados os dois tipos celulares.

O estudo bioquímico mostrou a presença de proteínas não colagênicas que apresentaram massa molecular aparente entre 18 - 170kDa. Uma banda polidispersa em torno de 70kDa e outra na faixa de 80 a 100kDa possivelmente correspondam aos pequenos proteoglicanos fibromodulim e decorim, além da presença de proteoglicano de alto peso molecular. Condroitim sulfato e dermatam sulfato são os principais glicosaminoglicanos presentes nesse folheto.

Analizando os dados morfológicos e bioquímicos, podemos concluir que: 1) Pequenos e grandes proteoglicanos estão presentes na matriz extracelular da valva aórtica. 2) Os proteoglicanos estão preferencialmente distribuídos no folheto em certas regiões, devido a presença de intensas forças compressivas nestas regiões. 3) Feixes de colágeno estão distribuídos ao longo do maior eixo do folheto que se fundem formando uma estrutura entrelaçada para fornecer a sustentação da valva durante a sístole e a diástole.

SUMMARY

The cusps of the aortic valve are constituted mainly by water (approx. 80%), but also by collagen and noncollagenous proteins, elastin and proteoglycans, which are responsible for their mechanical properties. Structurally are formed by fibrous, spongy, and ventricular layers. Fibrous and ventricular layers maintain the structural integrity of the valve, while the spongy layer has an important role in absorption of tension and compression mechanical forces. The porcine aortic valves have been utilized for the production of bioprostheses, however its durability is reduced especially due to calcification process. Structural analyses of whole mounts of the valvar leaflets stained with toluidine blue showed strongly stained fibrous components and metachromatic material following the fibrillar components. The fibrous components emerged from the insertion regions of the valve at the aorta wall, from both sides of the leaflet and have exhibited a mainly longitudinal trajectory, according the main axis of the leaflet. Analysis in polarization microscopy showed an intense bright of the fibers and fibrils demonstrating the high molecular order of the collagen molecules in the fibrous components. Along the main axis of the collagen bundles intense metachromasy was observed. Several metachromatic regions were also found in a non-uniform distribution. Analysis of histological sections stained with toluidine blue showed the three well distinct layers of the leaflet. A great amount of cells was observed in the endothelial layer of the aortic and ventricular faces of the leaflet. Cells with different morphologies and distributions were also observed in the different layers. At the fibrous layer elongated cells, named fibroblasts, were found along

the collagen bundles. The ventricular layer showed round cells, similar to chondrocytes. At the spongy layer both types of cells were found.

The biochemical study consisted of extracting the extracellular matrix components using 4 M guanidine-chloride, fractionation in DEAE-Sephacel column and analysis in SDS-PAGE. The collagenic proteins found at the leaflets showed Mr values between 18-170 kDa. A polydisperse band with 70 kDa and another between 80 and 100 kDa were found and possibly are the small proteoglycans fibromodulin and decorin. The analysis of glycosaminoglycans in agarose-propylene diamine gel, after digestion with papain, revealed the presence of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. The analysis in agarose-polyacrylamide gel of the ultracentrifugation D1 fraction revealed a polydisperse and metachromatic band after toluidine blue staining, indicating the presence of proteoglycans of high molecular weight.

Analyzing the biochemical and morphological data, may be concluded that: 1) Small and large proteoglycans are present in the extracellular matrix of the aortic valve. 2) Proteoglycans are distributed preferentially in certain regions of the leaflet probably due a more intense presence of compressive forces in those regions. 3) Collagen bundles are distributed along the main axis of the leaflet but are also found forming an interwoven structure to provide sustentation of the valve during systole and diastole.

INTRODUÇÃO

A valva aórtica está localizada na raiz da artéria aorta sendo formada por três cúspides (semilunares), as quais se encontram fixadas inferiormente à parede interna do vaso, possuindo uma margem livre superior (DIDIO, 1974) (fig 1). A pressão relativamente alta na artéria aorta após a sístole provoca o fechamento abrupto da valva aórtica, o qual impede o retorno do sangue do vaso ao ventrículo esquerdo, mantendo o fluxo sanguíneo unidirecional (GUYTON & HALL, 2002).

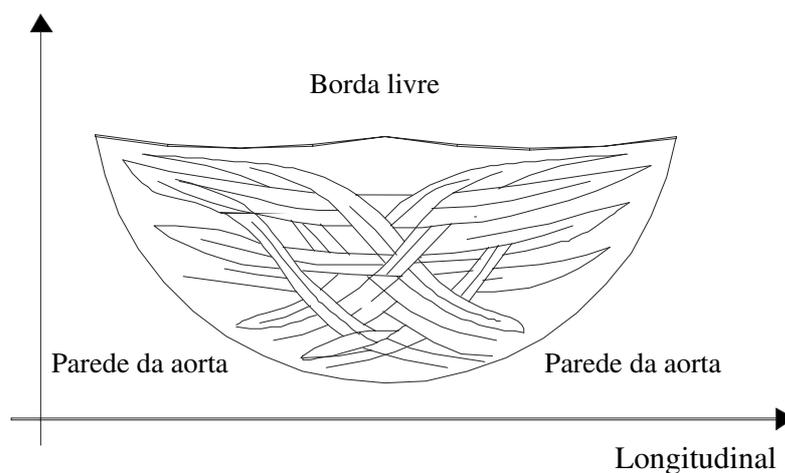


Fig 1. Esquema de um dos folhetos da valva aórtica de porco. A borda longitudinal se fixa à parede da aorta, enquanto a borda superior está livre para se abrir e permitir o fluxo de sangue durante a sístole, e se fechar durante a diástole. Os feixes de colágeno estão dispostos nas direções longitudinal e transversal.

Os folhetos da valva aórtica são formados por um sistema de malhas elásticas, reforçados por um denso feixe de fibras colágenas, arranjadas de forma orientada (VESELY, 1998). A invaginação desses feixes de colágeno atua como potentes redutores do estresse durante a ação mecânica da valva (SAUREN *et al.*, 1980). Todas as valvas exibem uma estrutura semelhante, em camadas, que consistem predominantemente em um núcleo denso, formado de fibras de colágeno, próximo à superfície de efluxo e contínuo com as estruturas de sustentação valvares. Também é encontrado um tecido conjuntivo frouxo (esponjoso) próximo à superfície de influxo. A porção fibrosa mantém a integridade estrutural da valva, enquanto a esponjosa tem papel importante na absorção de forças mecânicas de tensão e compressão (ROBBINS, 2000). Estas camadas por serem extremamente exigidas do ponto de vista biomecânico, devido a própria funcionalidade da valva, podem facilmente sofrer rupturas devido a compressão durante a flexura valvar na abertura ou no fechamento (VESELY, 1998).

As fixações dos folhetos que constituem a valva são feitas por estruturas fibrocartilagenosas contendo grande quantidade de fibras colágenas (SAUREN *et al.*, 1980), glicosaminoglicanos e elastina (McDONALD, *et al.*, 2002). O colágeno e as fibras elásticas fazem parte dos componentes fibrilares da matriz extracelular. A matriz, abundante nos tecidos conjuntivos, é constituída por complexos macromoleculares relativamente estáveis, formados por moléculas de colágeno, proteoglicanos e proteínas não-colagênicas produzidas e exportadas pelas células, modulando a estrutura, fisiologia e biomecânica dos tecidos (JOHANSSON, 1996).

O colágeno é um componente fibrilar da matriz extracelular, sua estrutura alongada é formada por três cadeias polipeptídicas (van der REST & GARRONE, 1991)

denominadas cadeias α , ricas em prolina e glicina, que formam uma tripla fita helicoidal (LINSENMAYER, 1985). Cada cadeia helicoidal é composta por uma tripla seqüência repetitiva de Gly - X- Y, onde X e Y podem ser qualquer aminoácido (LINSENMAYER, 1985), mas freqüentemente X é prolina e Y é hidroxiprolina (van der REST & GARRONE, 1991; LINSENMAYER, 1985). As moléculas de colágeno são glicosiladas, e a glicosilação ocorre nos resíduos de hidroxilisina (HAY, 1991).

Atualmente são conhecidos vinte e quatro tipos de colágenos, 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).

O papel atribuído ao colágeno é conhecidamente estrutural, mas também está envolvido direta ou indiretamente em processos de adesão e diferenciação celular, como agente quimiotático para macrófagos e fibroblastos e como antígeno nos processos imunológicos (LINSENMAYER, 1985).

A rede de colágeno depende do balanço entre a síntese e a degradação das fibrilas de colágeno, sendo que estes fatores podem ser modulados por enzimas de degradação e proteoglicanos (RADERMECKER, *et al.*, 2003).

Os proteoglicanos são constituídos basicamente por um esqueleto protéico central ao qual estão ligados covalentemente uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos, no espaço intercelular existem duas classes principais de proteoglicanos: os grandes, representados pelo agregam e versicam, e os pequenos proteoglicanos, onde se destacam o decorim, biglicam e fibromodulim (KUC & SCOTT, 1997). As diferenças observadas tanto no esqueleto protéico quanto nas classes de glicosaminoglicanos ligados, permitem que os

proteoglicanos desempenhem diversas funções no organismo (HASCALL & HASCALL, 1985). Os glicosaminoglicanos são cadeias polissacarídeas não ramificadas, compostas de unidades repetidas de dissacarídeos (HASCALL & HASCALL, 1985). Nos dois açúcares do dissacarídeo, um é sempre sulfatado e o outro é geralmente um ácido urônico, com exceção do queratam sulfato (no lugar do ácido urônico tem galactose). Devido aos grupos sulfato e carboxila que fazem parte da cadeia, os glicosaminoglicanos são carregados negativamente (HAY, 1991).

As diferentes características apresentadas pelos glicosaminoglicanos estão relacionadas a composição dissacarídica, ao tipo de ligação glicosídica entre eles e ao número e a localização dos radicais sulfato. Com base nestas características são conhecidos os seguintes glicosaminoglicanos: condroitim sulfato, dermatam sulfato, heparam sulfato, queratam sulfato e ácido hialurônico (COMPER, 1996).

Os pequenos proteoglicanos decorim e fibromodulim estão envolvidos na montagem das fibrilas de colágeno, podendo influenciar na organização e no diâmetro das mesmas (YAMADA, 1985; KUC & SCOTT, 1997). O decorim está presente provavelmente em todos os tecidos conjuntivos fibrosos (COMPER, 1996). Rico em leucina possui uma cadeia de glicosaminoglicanos que pode ser de condroitim ou de dermatam sulfato, dependendo do tecido em que se encontra. O decorim tem influência na fibrilogênese do colágeno tipo I e tipo II, e tem sido mostrado recentemente que tanto o decorim como o lumican, que também é um pequeno proteoglicano, têm diferentes efeitos na formação da fibrila bem como locais distintos de ligação na mesma (RADERMECKER *et al.*, 2003).

O fibromodulim tem sua distribuição mais restrita em relação ao decorim e biglicam. É abundante em cartilagem, tendões e esclera e pouco encontrado em ossos e pele

(FOSANG *et al.*, 1996). Provavelmente tem a função de regular o diâmetro das fibrilas de colágeno (KNUDSON & KNUDSON, 2001).

O biglicam da mesma forma que o decorim, também é rico em leucinas, mas possui duas cadeias de glicosaminoglicanos, e dependendo do tecido considerado, estas cadeias podem ser condroitim ou dermatam sulfato. Sua função pode estar relacionada à adesão celular e estruturação da matriz (FOSANG *et al.*, 1996; KNUDSON & KNUDSON, 2001).

Além de componentes como o colágeno e os proteoglicanos, a matriz extracelular contém proteínas não-colagênicas que na maioria, são multifuncionais, devido à presença de domínios estruturais dentro da mesma molécula. Essas proteínas estão envolvidas em fenômenos que contribuem para a interação célula-matriz permitindo uma sinalização bidirecional (MODIS, 1991; JOHANSSON, 1996). Proteínas não-colagênicas como a fibronectina e laminina, servem de mediadores da adesão celular com outros componentes da matriz (RUBIN *et al.*, 1996; JOHANSSON, 1996).

A fibronectina é uma molécula sintetizada por fibroblastos, células endoteliais, condrócitos, células gliais e miócitos. É abundante na matriz dos tecidos conjuntivos, membranas basais e fluidos corporais (PIEZ & REDDI, 1984). Participa de alguns processos básicos, como migração e diferenciação celular, desenvolvimento embrionário, coagulação sanguínea, formação de metástases e tumores celulares. Pode se ligar às integrinas, aos proteoglicanos, ao colágeno e a fibrina (JOHANSSON, 1996).

Além de fibronectina e laminina, outras proteínas não colagênicas têm sido identificadas como proteína oligomérica de matriz de cartilagem (HEDBOM *et al.*, 1992), proteína de matriz de cartilagem, proteínas de 58 e 36kDa (HEINEGÅRD & PIMENTEL, 1992), entre outras.

A matriz extracelular também é formada por um sistema elástico. A elastina é o principal componente de uma fibra elástica madura e sua composição é rica em glicina, prolina, lisina e aminoácidos hidrofóbicos. Estruturalmente as fibras elásticas são formadas por um cilindro central sólido composto por abundante material amorfo e homogêneo, a elastina, envolvido por microfibrilas formadas de glicoproteínas, entre elas a fibrilina (ROSS *et al.*, 1995). A presença de uma estrutura elástica permite à valva sofrer distensão durante o trabalho valvar (SCOTT & VESELY, 1996) permitindo que se distenda durante a passagem de sangue do ventrículo para a aorta.

A valva aórtica possui uma estrutura altamente viscoelástica exibindo um complexo comportamento anisotrópico e seu comportamento não pode ser explicado simplesmente devido ao colágeno. A longevidade desta estrutura depende da interação dos seus constituintes na matriz extracelular como o colágeno, a elastina e os proteoglicanos (SCOTT & VESELY, 1996).

As cúspides valvares contêm cerca de 50% de colágeno e apenas 13% de elastina do seu peso seco (BASHEY *et al.*, 1967). O principal colágeno presente na valva aórtica é o do tipo I, composto por duas cadeias distintas de polipeptídeos, a $\alpha 1$ (I) e a $\alpha 2$ (I). Também está presente o colágeno tipo III, composto de três cadeias $\alpha 1$ (BASHEY, *et al.*, 1978; MANNSCHOTT, *et al.*, 1976; SCOTT & VESELY, 1996). As fibras do colágeno funcionam como pontes de união dos folhetos valvares às paredes da aorta, comportando-se como cabos de uma suspensão, transmitindo as forças impostas aos folhetos, pelo retorno do sangue, à parede da aorta durante a diástole (LOVEKAMP & VYAVAHARE, 2001). As valvas estão sujeitas a intensos estresses mecânicos repetitivos, devido a 40 milhões de ciclos cardíacos/ano. Deformações teciduais significativas têm sido observadas a cada

ciclo, onde o gradiente de pressão para a valva aórtica é cerca de 80mm de mercúrio (ROBBINS, 2000), dessa forma, as valvas têm que apresentar uma estrutura capaz de suportar estas oscilações de pressão.

A valva do coração tem sido substituída em operações cardíacas no tratamento severo de doenças valvares (YE *et al.*, 2000) ocasionadas por alterações nas células e na matriz extracelular como: degeneração das fibras de colágeno, aumento da elastina e alterações nos proteoglicanos (SUNG, *et al.*, 1999; McDONALD, *et al.*, 2002). Essas doenças incluem alterações como estenose, causada pela calcificação distrófica da valva, resultando na incapacidade da valva de se abrir por completo, ou ainda alterações que causam a insuficiência valvar, que impede a mesma de fechar por completo, resultando na doença intrínseca das cúspides valvares ou na deformação das estruturas de sustentação (ROBBINS, 2000).

Em geral a estenose das valvas aórticas pode ser congênita ou adquirida, entretanto a imensa maioria dos casos representa uma calcificação degenerativa relacionada com a idade (ROBBINS, 2000). No caso da estenose aórtica reumática que pode permanecer durante anos no organismo sem que o paciente perceba, são produzidos efeitos secundários no coração, vasos sanguíneos e em outros órgãos tanto distais como proximais à lesão valvar (FARIA *et al.*, 1999; ROBBINS, 2000). O comprometimento das valvas por focos inflamatórios (febre reumática aguda) consiste tipicamente em necrose fibrinóide no interior das cúspides onde são encontradas “verrugas” ao longo das linhas de fechamento; estas projeções verrucosas provavelmente resultam da precipitação de fibrina (LEHNER *et al.*, 1997). Também pode haver formação de depósitos calcificados degenerativos nos folhetos da valva aórtica, que podem ser visualizados macroscopicamente sob a forma de

nódulos irregulares (VILLALBA *et al.*, 2001), pétreos e em certas ocasiões ulcerados (ROBBINS, 2000). Estes depósitos de cálcio podem causar até mesmo morte súbita se atingirem uma profundidade suficiente para comprometer o sistema de condução (MOORE & ADAMS, 2001).

Como os nódulos ulcerados podem propiciar um local para trombos que podem embolizar, alguns pacientes com calcificação dos folhetos valvares apresentam riscos aumentados de acidente vascular cerebral. Estes nódulos também podem constituir sítios para uma endocardite infecciosa (FARIA *et al.*, 1999).

Uma das mais graves de todas as infecções valvares se caracteriza pela colonização ou invasão das valvas cardíacas, do endocárdio mural e de outros locais cardiovasculares por um agente microbiológico caracterizando a endocardite infecciosa (TOLSTRUP *et al.*, 2002). Tanto na forma aguda como sub-aguda da doença, nas valvas cardíacas são observadas vegetações friáveis, volumosas e potencialmente destrutivas, que contém fibrina, células inflamatórias e bactérias ou outros microorganismos, que podem causar até mesmo erosão ou perfuração das cúspides (FARIA *et al.*, 1999; ROBBINS, 2000).

A variedade de biomateriais utilizados em laboratório inclui as biopróteses de valvas cardíacas (FISHBEIN *et al.*, 1982), estas fornecem durabilidade boa comparada com válvulas mecânicas (SUNG *et al.*, 1999). Nos últimos trinta anos, as valvas cardíacas têm sido clinicamente substituídas (LEHNER *et al.*, 1997) por diferentes tecidos biológicos, que podem ser homólogos, como a fâscia lata, o peritônio e o pericárdio, tecidos heterólogos como enxertos de valvas aórticas ou ainda tecidos autólogos como valvas pulmonares (ZERBINI, 1975). As próteses também podem ser mecânicas (ROBBINS, 2000). De modo geral são utilizados biopróteses de valvas cardíacas de porco, devido a similaridade em

tamanho e forma com a humana (SAUREN *et al.*, 1980a; VALENT *et al.*, 1985; COLOMB *et al.*, 1987; SUNG, *et al.*, 1999; KIM, 2002; MOORE & ADAMS, 2002).

A limitação da prótese valvar está relacionada com a deterioração do tecido da cúspide (SINGLA & LEE, 2002) seguido usualmente de violenta estenose cuspal, muitas vezes com regurgitação sanguínea (CHEM *et al.*, 1997), ou tem sido limitado devido a calcificações que ocorrem nos folhetos (YE *et al.*, 2000). Esta calcificação pode ser consequência da interação da valva com o receptor, do próprio implante ou de fatores mecânicos (CHEM *et al.*, 1997). Essa calcificação do tecido valvar é comum devido ao envelhecimento, às doenças como aterosclerose, diabetes, estenose aórtica e outras (SINGLA & LEE, 2002). Para que ocorra um efeito clínico viável na substituição das valvas quanto a sua eficiência e durabilidade, muitas pesquisas visam conter o processo de mineralização (CHEM *et al.*, 1997), isolando componentes envolvidos na ancoragem das células que podem estar associados a componentes estruturais do tecido, facilitando a calcificação (YE *et al.*, 2000; SINGLA & LEE, 2002).

Os estudos quanto ao reparo dos defeitos da matriz em biopróteses (VILLALBA *et al.*, 2001) ainda são incompletos no sentido de se obter uma bioprótese em condições de ser usada de forma eficiente, ou seja, ser resistente a uma possível ação degradativa e ao mesmo tempo manter as propriedades mecânicas que permitam sua funcionalidade (KIM, 2002).

Cerca de 60 % dos pacientes que receberam próteses valvares apresentam lesões relacionadas com a prótese dentro de um período de dez anos após a cirurgia. Entre as consequências devido às falhas nas próteses, estão: trombose, hemorragia relacionada a anticoagulantes, endocardite da prótese valvar, deterioração estrutural (intrínseca),

calcificação, disfunção não-estrutural como extravasamento paravalvar, anemia hemolítica. As falhas nas biopróteses são devido a problemas estruturais como fratura, falha de encaixe, dilaceração da cúspide, desproporção, desgaste e ruído (ROBBINS, 2000). Vários estudos têm mostrado que a utilização de válvulas mecânicas trazem desvantagens como tromboembolismo e infecções, com conseqüente redução do tempo de utilização da valva. Ultimamente tem sido intensificado os estudos com biopróteses (LEHNER et al, 1997; SAMOUILLAN et al, 2000; YE et al, 2000), utilizando valva cardíaca de porco. Contudo os resultados ainda não são satisfatórios devido a falhas no processo de desvitalização do material, induzidas pela presença de fixadores como o glutaraldeído.

Acreditamos que os procedimentos para a produção de biopróteses de valvas de porco, para serem mais eficientes em termos de durabilidade e redução dos processos de calcificações, requerem um melhor conhecimento sobre os aspectos organizacionais e composicionais destas valvas.

OBJETIVOS

1. Estudar aspectos estruturais da valva aórtica de porco, especialmente aqueles relacionados à organização e distribuição dos componentes da matriz extracelular.
2. Extrair, fracionar e identificar os principais componentes presentes na matriz extracelular do tecido conjuntivo presente nesta valva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASHEY, R. I., TORII, S., ANGRIST, A. 1967.** Age-related collagen and elastin content of human heart valves. *J Gerontol* 20: 203 - 208.
- BASHEY, R. I., BASHEY, H. M., JIMENEZ, A. S. 1978.** Characterization of pepsin-solubilized bovine heart-valve collagen. *Biochem J* 173: 885 - 894.
- CHEN, W., SCHOEN, F. J., MYERS, D. J., LEVY, R. J. 1997.** Synergistic inhibition of calcification of porcine aortic root with preincubation in FeCl₃ and α -amino oleic acid in rat subdermal model. *J Biomed Mater Res* 38: 43 - 48.
- COLOMB, G., SHOEN, F. J., SMITH, M. S., LINDEN, J., DIXON, M., LEVY, R. J. 1987.** The role of glutaraldehyde-induced cross-links in calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprosthesis. *Am J Pathol* 127: 122-130.
- COMPER, W. D. 1996.** Water: Dynamic Aspects. In: COMPER W. D. *Extracellular matrix : Molecular components and interactions*. Harwood Academic Publishers: Amsterdam, vol.2., p., 386, p. 1-21.
- DIDIO, L. J. A., 1974.** Angiologia. In: DIDIO, L. J. A. *Sinopse de anatomia*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan S.A., 525p., p. 325-343.
- FARIA, J. L. de, 1999.** Aparelho Cardiovascular. In: FARIA, J. L. *Patologia especial: com aplicação clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan S.A., 687p., p. 11-67.
- FISHBEIN, M. C., LEVY, R. J., FERRANS, V. J. 1982.** Calcification of cardiac valve bioprostheses. Biochemical, histologic, and ultrastructural observations in a subcutaneous implantation model system. *J Thorac Cardiovasc Surg* 83: 602-609.

- FOSANG, A. J., HARDINGHAM, T. E. 1996.** Matrix Proteoglycans. *In: COMPER, W. D. Extracellular matrix : Molecular components and interactions.* Harwood Academic Publishers: Amsterdam, vol.2, p., 386, p. 68 – 77.
- GUYTON, A. C., HALL, J. E. 2002.** O músculo cardíaco; o coração como uma bomba. *In: GUYTON, A. C., HALL, J. E. Tratado de Fisiologia médica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 973p. p. 98-105.
- HAY, E. D., 1985.** *Cell biology of extracellular matrix.* New York: Plenum Press. 417p.
- HASCALL, V. C.; HASCALL, K. G. 1985.** Proteoglycans. *In: HAY, E. D. Cell biology of extracellular matrix.* New York: Plenum Press. 417p., p 39-63.
- HEDBOM, E., HEINERGÅRD, D. 1992.** Binding of fibromodulin and decorin to separate sites on fibrillar collagens. *J Biol Chem* 268: 27307 – 27312.
- HEINERGÅRD, D., PIMENTEL E. R. 1992.** Cartilage matrix proteins. *In: KUTTNER K. E., SCHELEYERBACH R., PEYRON J. G., HASCALL V. C. Articular cartilage and Osteoarthritis.* New York, p.95 - 111.
- JOHANSSON, S. 1996.** Non-collagenous proteins matrix. *In: Extracellular matrix.* Ed. 2^a, COMPER, W. D. Harwood Academic Amsterdam. N. T., vol 1, p., 476, p. 68 – 77.
- KIM, K. M. 2002.** Cells, rather than extracellular matrix, nucleate apatite in glutaraldehyde-treated vascular tissue. *J Biomed Mater Res* 59: 639 - 645.
- KNUDSON, C. B., KNUDSON, W. 2001.** Cartilage proteoglycans. *Cell & Dev Biology* 12: 67-78.
- KUC, I. M., SCOTT, P.G. 1997.** Increased diameters of collagen fibrils precipitated *in vitro* in the presence of decorin from various connective tissues. *Connect Tissue Res* 36: 287-296.

- LEHNER, G., FISCHLEIN, T., BARETTON, G., MURPHY, J. G., REICHART, B. 1997.** Endothelialized biological heart valve prostheses in the non-human primate model. *Eur J Cardiothorac Surg* 11: 493 - 504.
- LINSENMAYER, T. F., 1985.** Collagen. In: HAY, E. D. *Cell biology of extracellular matrix*. New York: Plenum Press. 417p., p 5-37.
- LOVEKAMP, J., VYAVAHARE, N. 2001.** Periodate-mediated glycosaminoglycan stabilization in bioprosthetic heart valves. *J Biomed Mater Res* 56(4): 478 - 486.
- MANNSCHOTT, P., HERBAGE, D., WEISS, M., BUFFEVANT, C. 1976.** Collagen heterogeneity in pig heart valves. *Biochim Biophys Acta* 434: 177 - 183.
- McDONALD, P. C., WILSON, J. E., McNEILL, S., GAO, M., SPINELLI, J. J., ROSENBERG, F., WIEBE, H., McMANUS, B. M. 2002.** The challenge of defining normality for human mitral and aortic valves. *Cardiovasc Pathol*. 11: 193-209.
- MODIS, L. 1991.** A short overview of major constituents of the extracellular matrix. In: *Organization of the extracellular matrix: A polarization microscopic approach*. CRC Press, Florida. 287p., p. 2 – 7.
- MOORE, M. A., ADAMS, A. K. 2001.** Calcification resistance, biostability, and low immunogenic potential of porcine heart valves modified by dye-mediated photooxidation. *J. Biomed. Mater. Res.* 66 (5): 378 – 384.
- PIEZ, K. A., REDDI, A. H. 1984.** Fibronectin, laminin, and other extracellular glycoproteins. In: HAKAMORI, S., FUKUDA, M., SEKIGUCHI, K., CARTER, W. G. *Extracellular Matrix Biochemistry*. New York: Elsevier Science. 452p. p. 288 – 305.

RADERMECKER, M. A., LIMET, R., LAPIERE, C. M., NUSGENS, B. 2003.

Increased mRNA expression of decorin in the prolapsing posterior leaflet of the mitral valve. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2: 389 – 394..

van der REST, M., GARRONE, R. 1991. Collagen family of proteins. *FASEB J* 5: 2814 - 2823.

ROBBINS, S. L., 2000. O coração. In: ROBBINS, S. L. *Patologia estrutural e funcional*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000. 1251p., p. 488-525.

ROSS, M. H., ROMPELL, L. J., KAYE, G. I. 1995. *Histology a text and atlas* Baltimore, Williams & Wilkins 3ª ed p.95.

RUBIN, K., GULLBERG, D., TOMASINI-JOHANSSON, B., REED, R. K., RYDÉN, C., BORG, T. K. 1996. Molecular recognition of the extracellular matrix by cell surface receptors. In: COMPER, W. D. *Extracellular matrix : Molecular components and interactions*. Harwood Academic Publishers: Amsterdam, vol.2, p. 262 – 295.

SAMOUILLAN, V., LAMUREA, A., MAUREL, E., DANDURAND, J., LACABANNE, C., BALLARIN, F., SPINA, M. 2000. Characterisation of elastin and collagen in aortic bioprostheses. *Med & Biol Eng Comput* 38: 226-31.

SAUREN, A. A. H. J., KUIJPERS, W., van STEENHOVEN, A. A., VELDPAUS, F. F. 1980a. Aortic valve histology and its relation with mechanics – preliminary report. *J Biomech* 13: 97 - 104.

SAUREN, A. A. H. J., van STEENHOVEN, A. A., VELDPAUS, F. F. 1980b. A biomechanical analysis of aortic valve histology. *J Biomech* 13: 810 - 811.

SCOTT, M. J., VESELY, I. 1996. Morphology of porcine aortic valve cusp elastin. *J Heart Valve Dis* 5 (5): 464 - 471.

- SINGLA, A., LEE, C. H. 2002.** Effect of elastin on the calcification rate of collagen-elastin matrix systems. *J Biomed Mater Res* 60: 368 - 374.
- SUNG, H. W., CHANG, Y., CHIU, C-T., CHEN C-N., LIANG, H-C. 1999.** Mechanical properties of a porcine aortic valve fixed with a naturally occurring crosslinking agent. *Ann Thorac Surg* 8: 407 - 414.
- TOLSTRUP, K., ROLDAN, C. A., QUALLS, C. R., CRAWFORD, M. H. 2002.** Aortic valve sclerosis, mitral annular calcium, and aortic root sclerosis as markers of atherosclerosis in men. *Am J Cardiol* 89: 1030 - 1034.
- VALENTE, M., BORTOLOTTI, U., THIENE, G. 1985.** Ultrastructural substrates of dystrophic calcification in porcine bioprosthetic valve failure. *Am J Pathol* 119: 12-21.
- VESELY, I. 1998.** The role of elastin in aortic valve mechanics. *J Biomech* 31: 115-123.
- VILLALBA, R., PEÑA, J., LUQUE, E., VILLAGRÁN, J. L. G. 2001.** Characterization of ultrastructural damage of valves cryopreserved under standard conditions. *Cryobiology* 43: 81 - 84.
- YAMADA, K. M. 1985.** Fibronectin and other structural proteins. In: HAY E. D. *Cell biology of extracellular matrix*. Plenum Press: New York, 417p., p. 95-111.
- YE, Q., ZUND, G., BENEDIKT, P., JOCKENHOEVEL, S., HOERSTRUP, S. P., SAKYAMA, S., HUBBELL, J. A., TURINA, M. 2000.** Fibrin gel as a three dimensional matrix in cardiovascular tissue engineering. *Eur J Cardiothorac Surg* 17: 587 - 591.
- ZERBINI, E. J., NUNO-CONCEIÇÃO, A., PUIG, L. B., VERGINELLI, G., IRUIA, K., BITTENCOURT, D. 1975.** Homologous dura mater cardiac valves. Structural aspects of eight implanted valves. *J Thorac Cardiovasc Surg* 70(3): 499 – 508.

**ORDEM MOLECULAR DE FEIXES DE COLÁGENO E DISTRIBUIÇÃO
DE PROTEOGLICANOS EM VALVA AÓRTICA DE PORCO**

RESUMO

Análise estrutural das cúspides da valva aórtica, através da montagem total dos folhetos valvares fixados em solução de paraformaldeído a 4% e corados com azul de toluidina pH 4,0, mostrou que estes folhetos são formados por componentes fibrosos e por material metacromático encontrado tanto concentrado em algumas regiões do folheto como acompanhando as estruturas fibrosas. Os componentes fibrosos emergiam das regiões de inserção da valva na parede da artéria, de ambos os lados do folheto e exibiram um trajeto preferencialmente longitudinal, segundo o eixo mais longo do folheto. A metacromasia foi observada nos feixes de colágeno e também de maneira não uniforme em várias regiões do folheto. O folheto é composto por três camadas bem distintas, sendo duas fibrosas e uma intermediária com características de tecido conjuntivo frouxo. As estruturas fibrilares e as células presentes nestas camadas apareceram fortemente coradas pelo azul de toluidina. A intensa metacromasia observada em várias regiões da valva, foi abolida após tratamento com hialuronidase testicular, devido à remoção total dos glicosaminoglicanos. Análise em microscopia de polarização mostrou brilho intenso típico de feixes de colágeno, exibido pelas fibras e fibrilas evidenciando sua distribuição altamente orientada. A disposição organizada das fibras de colágeno também foi encontrada nos cortes impregnados com prata. Análise em microscopia de polarização mostrou o dicroísmo linear positivo, observado quando os feixes de colágeno foram posicionados paralelamente (A_{\parallel}) e perpendicularmente (A_{\perp}) ao azimute do polarizador. Na camada intermediária foram encontradas fibras coradas em preto que correspondem às fibras reticulares. Nos cortes corados com HE foram observadas células com diferentes formas e distribuições.

INTRODUÇÃO

A valva aórtica é uma das quatro valvas que controlam o fluxo de sangue no coração. Está localizada em uma abertura do ventrículo esquerdo, que permite a passagem de sangue do ventrículo para a aorta durante a sístole. A calcificação desta valva, que pode ser causada por má formação congênita, idade ou um processo inflamatório, (Sung *et al.*, 1999; Kim, 2001) geralmente culmina com sua substituição, que tem sido realizada nos últimos trinta anos por uma variedade de biomateriais incluindo as biopróteses de valvas cardíacas (Fishbein *et al.*, 1982), que permitem maior durabilidade comparada com válvulas mecânicas (Sung *et al.*, 1999). De modo geral são utilizados biopróteses de valvas cardíacas de porco, devido a similaridade em tamanho e forma com a humana (Sauren *et al.*, 1980b; Valent *et al.*, 1985; Colomb *et al.*, 1987; Sung, *et al.*, 1999; Kim, 2002; Moore & Adams, 2002).

Todavia o bom funcionamento das próteses valvares tem sido limitado devido a calcificações que ocorrem nos folhetos (Ye *et al.*, 2000) resultando em deterioração do tecido da cúspide (Singla & Lee, 2002) seguido usualmente de acentuada estenose cuspal, muitas vezes com regurgitação sangüínea (Chen *et al.*, 1997). Embora não se conheça claramente o mecanismo molecular da calcificação, este processo parece ocorrer devido à alguma rejeição por parte do paciente ou a algum outro fator originado do próprio implante (Chen *et al.*, 1997; Colomb *et al.*, 1987).

Para que ocorra um efeito clínico viável na substituição das valvas quanto a sua eficiência e durabilidade, muitas pesquisas visam conter o processo de mineralização bloqueando componentes envolvidos na ancoragem das células (Ye *et al.*, 2000) que

poderiam estar associados a componentes estruturais do tecido e desse modo facilitar a calcificação (Singla & Lee, 2002), mas ainda não se tem resultados satisfatórios.

A valva consiste em três cúspides localizadas no interior da artéria aorta e estruturadas por três camadas distintas, a fibrosa, a esponjosa e a ventricular. As camadas fibrosas, são compostas por uma camada denominada fibrosa (voltada para a artéria aorta) e outra denominada ventricular (voltada para o ventrículo). Essas camadas mantêm a integridade estrutural da valva e possuem fibras de colágeno dispostas de forma orientada, permitindo que os feixes arranjados de maneira ondulada possam expandir-se durante o trabalho da valva, bem como auxiliar o acoplamento dos três folhetos selando o orifício valvar (Scott & Vesely, 1996; Vesely, 1998). Entre a fibrosa e a ventricular encontra-se uma camada de tecido frouxamente organizado denominada de esponjosa, com papel importante na absorção de forças mecânicas de tensão e compressão (Robbins, 2000). O colágeno e as fibras elásticas fazem parte dos componentes fibrilares da matriz extracelular. Além destes, também estão presentes os proteoglicanos, que junto com componentes fibrilares modulam a estrutura, fisiologia e biomecânica dos tecidos. Em razão das camadas da valva serem extremamente exigidas do ponto de vista biomecânico, devido à própria funcionalidade da valva, podem ocorrer rupturas durante a flexura valvar na abertura ou no fechamento (Vesely, 1998).

No presente trabalho apresentamos um estudo sobre a organização estrutural da valva aórtica de porco utilizando a microscopia convencional e a microscopia de polarização.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material Biológico

Foram utilizadas valvas aórticas de oito corações de porcos da linhagem Large-White com idade entre 4 e 6 meses provenientes do Abatedouro Marchiori da cidade de Amparo - SP. As valvas foram retiradas imediatamente após o abate, lavadas em solução fisiológica 4°C e colocadas em solução fixadora.

Fixação das Valvas

As valvas foram fixadas em solução de paraformaldeído a 4% em tampão McIlvaine 0,1M, pH 7,2 a vácuo por uma hora. Em seguida foram transferidas para a geladeira onde permaneceram no fixador por mais 24 horas. Após a fixação, as valvas foram processadas 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 foram utilizados para montagem total em lâminas.

Coloração

1. Azul de Toluidina pH 4.0

Montagem total de folhetos inteiros e cortes histológicos, foram corados em solução de azul de toluidina a 0,025% em tampão McIlvaine 0,1M pH 4,0 por 15 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em tampão McIlvaine 0,1M pH 4,0, secas ao ar,

mergulhadas rapidamente em xilol e montadas em bálsamo do Canadá (Mello & Vidal, 1980), que tem o índice de refração igual ou próxima das estruturas dos tecidos, o que evita artefatos de refração. Algumas lâminas com cortes histológicos foram previamente tratadas com hialuronidase testicular e posteriormente coradas com azul de toluidina.

2. Hematoxilina e Eosina

Alguns cortes foram corados com solução de Hematoxilina de Erlich durante 2 minutos e posteriormente corados em solução alcoólica de eosina por 1 minuto (Kiernan, 1981). Em seguida, as lâminas foram desidratadas em uma sequência de álcoois 70, 80, 95 e 100%, mergulhadas rapidamente em xilol e montadas em bálsamo do Canadá.

Digestão Enzimática pela Hialuronidase Testicular

Cortes histológicos foram mergulhados, rapidamente, em celoidina, deixados à secar de modo a formar uma película de proteção, 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.

Impregnação com Prata

A solução de carbonato de prata amoniacal foi preparada utilizando 15mL de carbonato de sódio a 5% para 5mL de nitrato de prata a 10%. O resultado imediato é a formação de um precipitado amarelo-esbranquiçado. Durante a reação o sobrenadante é

removido e o precipitado lavado e ressuspenso ao volume inicial de 20mL. Neste foi adicionado gota-a-gota uma solução de hidróxido de amônia em constante agitação. O volume final da solução foi completado para 30mL com água destilada. A solução foi recentemente preparada antes do uso. Outras soluções requeridas pelo método incluem a solução de redução de formoldeído a 10% e solução de tiosulfato de sódio a 5%. Os cortes foram cobertos com solução de carbonato de prata amoniacal até ficarem amarelados ou amarelo-escuro. Após utilizou-se a solução redutora de 1-5 minutos, lavados em água destilada várias vezes e após embebido em solução de tiosulfato de sódio a 5% depois desidratados, diafanizados e montados em bálsamo do Canadá (Vidal, 2003b).

Documentação Fotográfica

Para documentação do material foi utilizado Lupa Zoom Stereo Microscope SZ 4060 acoplada com PM 20 Photomicrographic System e microscópio Zeiss Axioplan 2, equipado com objetivas Neofluar 2,5X, 10X, 20X e 40X, optovar fator 2,5 e condensador 1,4. Acoplado ao microscópio, o dispositivo Axiophot 2 (Zeiss), ambos suprido com filme Kodak Gold ISSO 100.

RESULTADOS

Cortes corados com HE mostraram a estrutura geral do folheto, em que as três camadas na região central apresentam-se com grande quantidade de células (fig 1a). A camada fibrosa, voltada para a aorta, e a esponjosa aparecem fortemente coradas pela eosina, já a face ventricular, próxima à inserção aparece fracamente corada (fig 1b), evidenciando uma composição diferente dos elementos da matriz extracelular, como também se pode verificar nos cortes corados com a AT (fig 4c, d). O folheto possui a presença de células com diferentes morfologias e distribuições. Na camada esponjosa foram encontradas células alongadas, semelhantes aos fibroblastos, e arredondadas, semelhantes a condrócitos (fig 1a, b), em maior aumento, células semelhantes aos fibroblastos aparecem dispostas ao longo dos feixes de colágeno (fig 1c, d). A camada ventricular apresentou células arredondadas, similares aos condrócitos (fig 1b).

Montagem total do folheto valvar corado com azul de toluidina (AT) e observado com pequeno aumento (fig. 2a), mostrou uma estrutura fortemente corada, com componentes fibrosos e material metacromático acompanhando estes componentes. As fibras pareciam ter um componente corado ortocromaticamente com azul de toluidina (fig 2b). Estas fibras que emergem das regiões de inserção da valva na parede da artéria, de ambos os lados do folheto, exibe um trajeto preferencialmente longitudinal, segundo o eixo mais longo do folheto. Ao se dirigirem para o centro do folheto, abrem-se formando uma rede de fibrilas que se entrelaçam e podem ser vistos em diferentes profundidades, na montagem total e nos cortes (fig 4).

Observando os feixes e fibrilas principalmente nas regiões de inserção da valva junto à parede da aorta (fig 4c) e no centro (fig 2a, 4a) do folheto, pôde-se notar presença de grumos metacromáticos nessas regiões. A borda livre do folheto apresenta-se fortemente corada com AT, mas não exibiu metacromasia.

Observação do mesmo material em microscópio de luz comum (fig 2b), mostrou que as fibras abrem-se em outras menores e distribuem-se em diferentes direções no folheto, mas em alguns locais estas ramificam-se dispendo-se de forma inclinada em relação à borda livre da valva que apresenta regiões metacromáticas. Quando analisado em microscopia de polarização foi observado o brilho intenso exibido pelas fibras e fibrilas posicionadas à 45° do plano do polarizador (fig 2c) ou paralelamente a um dos planos de polarização (fig 2d), ficando evidente a natureza colagênica das fibras e fibrilas. Neste último, o brilho foi devido aos segmentos dos feixes de colágeno, mais precisamente às porções do “crimp” (estrutura ondulada, morfo-funcional) que estavam dispostas à 45° em relação aos polarizadores. A birrefringência das fibrilas de colágeno foi observada em toda extensão do folheto (fig 2d). A ondulação repetitiva presente nos feixes de colágeno revela a organização das fibrilas de colágeno que fazem parte deste feixe quando este encontra-se à 45° (fig 2e) ou paralelo aos planos do polarizador (fig 2f).

Intensa metacromasia devido à ligação das moléculas de AT com estruturas aniônicas, associadas ao longo dos feixes de colágeno (fig 3a). Várias regiões metacromáticas estavam distribuídas de maneira não uniforme no folheto (fig 3b).

Cortes histológicos transversais ao folheto, corados com azul de toluidina, mostraram as três camadas distintas do folheto: as fibrosas (fibrosa e ventricular) e a esponjosa (fig 4a). Em toda extensão do corte foi observado grande quantidade de células, e

nas faces do folheto voltadas para a artéria aorta e para o ventrículo foi encontrado uma camada endotelial. As estruturas fibrilares e as células presentes nestas camadas apresentam metacromasia quando coradas pelo AT. Análise em microscopia de polarização mostrou que a disposição da grande maioria das fibras de colágeno acompanhava o eixo mais longo do folheto, tal como se observa na vista panorâmica da valva (fig 2), mas que em algumas regiões, como na que está voltada para o ventrículo, algumas destas fibras assumiam diferentes direções (fig 4b). Próximo à inserção na parede da aorta (fig 4c) a disposição dos elementos fibrilares do folheto é diferente do encontrado na região central (fig 4a). Metacromasia intensa foi observada nas três camadas e a camada intermediária não apresenta-se tão esparsa e com malhas frouxas, mas com um aspecto fibrilar mais compacto como as outras camadas. Análise ao microscópio de polarização mostrou material fibrilar birrefringente na posição intermediária indicando a presença de feixes de colágeno altamente orientados (fig 4d). Os feixes de colágeno embora estejam todos orientados predominantemente em uma única direção, exibiram um aspecto imbricado entre si, com feixes se entrelaçando e assumindo uma complexa estrutura tridimensional. Na camada ventricular os pontos brilhantes mostraram uma disposição diferente das fibras do colágeno onde as cores da birrefringência se devem também à presença de proteoglicanos nesta região.

Tratamento de cortes do folheto com hialuronidase testicular e coloração com AT resultou na remoção total dos glicosaminoglicanos, ficando apenas em evidência o núcleo das células (fig 5a). Observação em microscopia de polarização, com as fibras do colágeno à 45° dos planos do polarizador, mostrou que o tratamento enzimático não alterou o “crimp” das fibras de colágeno (fig 5b).

A mesma disposição das fibras do colágeno já descritas acima, foi também encontrada nos cortes impregnados com prata, onde as fibras do colágeno aparecem coradas em amarelo-escuro e/ou marron-claro. Dicroísmo linear (DL) foi observado quando cortes foram posicionados de modo que os feixes de colágeno estivessem paralelamente (A_{\parallel}) (fig 6a) e perpendicularmente (A_{\perp}) (fig 6b) ao azimute do polarizador. O DL encontrado foi positivo ($A_{\parallel} > A_{\perp}$). Na camada esponjosa foram encontradas fibras coradas em preto que correspondem às fibras reticulares (fig 6c). Nesta camada também foi observado a presença de feixes mais estreitos de colágeno, que pareciam interligar feixes maiores (fig 6c).

DISCUSSÃO

Os métodos citoquímicos para análise da metacromasia utilizaram o azul de toluidina, um corante catiônico, do grupo dos corantes tiazínicos, cuja molécula é planar e obedece a lei da química supra-molecular. Este corante possui excelentes propriedades anisotrópicas, permitindo a determinação da ordem molecular em biopolímeros poli-aniônicos (Vidal, 1987; Módis, 1991). As informações obtidas com a microscopia de polarização, através da birrefringência, permitem a visualização dos componentes fibrilares da matriz extracelular, uma vez que a birrefringência é determinada pela orientação e pela força de oscilação de todas as transições eletrônicas das moléculas que compõem as fibrilas colagênicas (Vidal, 1964, 1986). A ordem molecular é a fonte das propriedades piezoelétricas, presentes em estruturas cujos componentes moleculares geram um campo elétrico quando submetidos a deformações, e das propriedades piroelétricas, cujos componentes desenvolvem uma polarização espontaneamente e formam dipolos permanentes em sua estrutura (Athenstaed, 1974; Fukada, 1974; Jaworeck et al., 1998), sendo a microscopia de polarização um dos meios de pesquisa adequado para este gênero de estudo.

A microscopia de polarização é uma ferramenta que pode dar informações de natureza micromorfológica porque evidencia a fibra de colágeno pela sua birrefringência, que é causada devido a fatores da birrefringência intrínseca e textural ou de forma. A birrefringência intrínseca corresponde às médias de todas as transições de elétrons entre as ligações peptídicas, estabelecendo informações sobre a direção de vibração e ressonância dos elétrons da região de ligação peptídica na molécula de colágeno ao longo da fibra. A

birrefringência textural ou de forma por outro lado depende da geometria das moléculas, das concentrações dos componentes dos feixes de colágeno e das diferenças entre seus índices de refração (Vidal, 1987). Nas condições do presente trabalho, o único material birrefringente é o colágeno. Assim, os detalhes morfológicos encontrados permitiram analisar a importância dos feixes de colágeno na organização estrutural da valva aórtica.

A arquitetura dos feixes de colágeno valvar funciona como “cabos de uma ponte suspensa”, transmitindo à parede da artéria aorta as forças de tensão impostas aos folhetos durante a fase diastólica (Vesely, 2001). Nesta fase, os três folhetos se acoplam em resposta ao fluxo sanguíneo (Fishbein *et al.*, 1982; Lovekamp & Vyavahare, 2001), impondo uma biomecânica que depende muito da distribuição da malha dos feixes longitudinais de colágeno, na região central de cada folheto, proporcionando à valva resistência necessária para suportar as variações de forças que surgem neste processo.

Análise da montagem total do folheto valvar em microscopia de polarização, mostrou que os feixes de colágeno exibem birrefringência, que é causada por uma ordem molecular (Vidal, 1986). Os feixes de colágeno exibem estruturas onduladas, que evidenciam uma super estrutura helical tri-dimensional que provavelmente corresponde à exigência termodinâmica criada pela demanda biomecânica do tecido, a exemplo do que já foi encontrado em tendões flexores de porco (Feitosa *et al.*, 2002). A birrefringência exibida mostrou uma estrutura ondulada, morfo-funcional conhecida como “crimp” (Gathercole & Keller, 1991; Vidal, 1995). Os feixes e fibras inseridos na parede da aorta formariam uma hemicesta de malhas com espessuras variáveis, cujas malhas mais finas se entrecruzam no centro. Deste modo forma uma estrutura viscoelástica apropriada a ceder a

passagem da coluna sanguínea e voltar à posição diastólica, suportando agora, a pressão (impacto) do retorno.

Além do colágeno, a matriz extracelular da valva contém os proteoglicanos, evidenciados pela metacromasia do azul de toluidina que é um corante catiônico, com estrutura molecular planar, que se liga a substratos com carga negativa (Vidal, 1980). No tecido, em pH 4,0, o corante se liga preferencialmente aos grupamentos fosfatos dos ácidos nucléicos e aos carboxila e sulfato das cadeias de glicosaminoglicanos na matriz extracelular, sendo que tais cadeias se dispõem helicilmente ao longo do eixo principal das fibras de colágeno (Mello & Vidal, 2003). Os proteoglicanos estão inclinados ao longo do eixo principal das fibrilas do colágeno em tendões (Vidal & Mello, 1984) e cartilagem articular (Vidal, 1963; 1964; Vidal & Vilarta, 1988; Vilarta & Vidal, 1989). Os resultados obtidos estão de acordo com a literatura onde os feixes de colágeno aparentemente corados com azul de toluidina, 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 negativas das glicanas ácidas (Vidal & Mello, 1970; Mello & Vidal, 1973). A forte metacromasia devido ao empilhamento das moléculas do AT, mais concentradas em determinadas regiões do folheto valvar, indica que nestas regiões existe uma maior concentração de proteoglicanos, possivelmente como consequência da presença mais intensa de forças compressivas. A existência dessas forças compressivas induziria as células a produzirem proteoglicanos, mesmo em tecidos predominantemente fibrosos como em regiões que recebem compressão como em tendões de anfíbios (Carvalho & Vidal, 1994), coelhos (Merrilees & Flint, 1980) bovinos (Vogel *et al.*, 1994, Koob & Vogel, 1987b) e suínos (Feitosa *et al.*, 2002).

No caso da análise dos cortes de valva corados com AT, foram observadas nitidamente a camada fibrosa, voltada para a artéria aorta, a ventricular voltada para o ventrículo e entre as duas camadas fibrosas, a malha frouxa denominada esponjosa (Sauren *et al.*, 1980b; Scott & Vesely, 1996; Vesely, 1998; Mc Donald *et al.*, 2002; Bertipaglia *et al.*, 2003).

Alguns autores sugerem que as fibras de colágeno na região central do folheto, são circunferenciais, e na região próxima à inserção na parede da aorta, são radiais (Sauren *et al.*, 1980a; Scott & Vesely, 1996; Vesely, 1998; Mc Donald *et al.*, 2002; Bertipaglia *et al.*, 2003). Contudo nossas observações mostraram que as fibras de colágeno assumem várias direções, embora haja um predomínio da direção longitudinal para as fibras da região central, e inclinados, em diferentes ângulos na região próxima à inserção na aorta. Este arranjo juntamente com a elastina, permitiria ancorar o folheto valvar em todas as direções, estruturando eficientemente a valva e evitando rupturas do folheto durante o trabalho mecânico da valva.

A análise dos cortes corados com AT mostrou intensa metacromasia em toda extensão da camada fibrosa, ou seja, a voltada para a aorta, enquanto que na camada ventricular, a metacromasia estava presente apenas próxima à inserção na aorta. Essas diferenças regionais na ocorrência de metacromasia, resultam da presença mais significativa de proteoglicanos nestas regiões, provavelmente devido a ação de forças compressivas que ocorrem de maneira uniforme durante a abertura e fechamento da valva.

A funcionalidade da valva depende do movimento relativo entre as fibras de colágeno e fibras elásticas, que juntamente com o efeito hidratante e lubrificante dos

proteoglicanos minimiza o estresse sofrido pelo folheto (Scott & Vesely, 1996; McDonald *et al.*, 2000).

Na região central do folheto, a camada esponjosa aparece formada por feixes de colágeno mais finos e esparsos do que no restante da valva, que conecta as camadas fibrosa e ventricular (Scott & Vesely, 1996). Nossos resultados sugerem que haja um entrecruzamento de fibras nesta região, promovendo uma distribuição adequada de forças, compatíveis à viscoelasticidade da estrutura, o que garante a qualidade biomecânica do folheto. Este aspecto contudo muda na porção mais próxima da inserção do folheto na parede da aorta, onde os feixes de colágeno aparecem altamente compactos, como demonstrado pelas imagens de birrefringência. Esta mudança na estruturação do folheto está provavelmente relacionada a uma maior necessidade de reforço biomecânico nesta região.

Extrações enzimáticas com maior ou menor especificidade permitem o controle das reações de basofilia e metacromasia, de modo a identificar quais substâncias são responsáveis pela ligação do corante (Vidal & Mello, 1987). A hialuronidase testicular é um tratamento histoquímico efetivo na remoção de glicosaminoglicanos, abolindo totalmente a metacromasia exibida pelo folheto quando corado com AT deixando visível no folheto valvar somente os núcleos. Sua ação causa a despolimerização do ácido hialurônico e do condroitim sulfato (Vidal, 1976), sugerindo que um destes ou ambos estão presentes no tecido.

A impregnação com prata dos componentes da matriz extracelular pode não ser específica, entretanto a ligação da prata com a super estrutura do colágeno pode prover um ordenado complexo metal-biopolímero (Vidal, 2003a), mostrando a distribuição,

variabilidade e orientação macromolecular das fibras do colágeno na valva. A impregnação por prata apresenta o mesmo padrão já demonstrado em colorações com AT, onde as três camadas do folheto valvar aparecem estruturadas diferentemente com relação aos seus componentes fibrilares. Medidas das propriedades anisotrópicas ópticas do DL, dispersão anômala de birrefringência e curvas de birrefringência textural de fibras de colágeno de tendões impregnados com prata, têm sugerido que as partículas da prata estão distribuídas paralelamente ao longo do eixo principal das fibras do colágeno (Mello & Vidal, 1972; Vidal *et al.*, 1975). Um diferencial da prata é permitir que as fibras reticulares, colágeno tipo III, sejam distinguidas das fibras de colágeno I, ficando evidente a participação de fibras reticulares na estruturação em particular da camada esponjosa do folheto. O DL positivo ($A_{\parallel} > A_{\perp}$) encontrado para os feixes de colágeno impregnados com prata, confirma que estes feixes estão orientados em uma direção preferencial na valva. O dicroísmo linear em fibras de colágeno impregnadas com prata é causado por uma ligação ordenada das nanopartículas da prata nas moléculas de colágeno, de modo a permitir a detecção e medição da ordem molecular das fibras de colágeno no tecido (Vidal & Joazeiro, 2002).

Os fibroblastos, células intertissuais da valva (Sung *et al.*, 1999; Kim, 2001; McDonald *et al.*, 2002; Bertipaglia *et al.*, 2003), vistos principalmente na camada fibrosa acompanhando as fibras de colágeno e dispersamente na camada esponjosa, possivelmente tenham um comportamento multifuncional, como de comunicação célula-célula, migração e reparo de ferimentos, sendo de fundamental importância em alterações da valva relacionadas com a idade (McDonald *et al.*, 2002). A presença de células semelhantes à condrócitos em determinadas regiões do folheto se deve provavelmente a existência de forças compressivas nestas regiões, como ocorre em tendões de ratos que demonstraram a

existência de modificações fenotípicas de acordo com o grau de força compressiva a que foram submetidos (Ralphs et al., 1991; 1992; Rufai et al., 1992).

LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1 - Cortes tranvesal (**A** e **B**) e longitudinal (**C** e **D**) corados com HE, vistos em microscopia convencional (**A** - **C**) e microscopia de polarização (**D**). **A** – Corte da região central do folheto, mostrando grande quantidade de células nas três camadas do folheto. **B** – Corte da região do folheto próximo à inserção na parede da aorta. Notar mudança na organização tecidual quando se compara a camada esponjosa e a ventricular. Na esponjosa aparecem fibroblastos (f) e células arredondadas (ch) semelhante a condrócitos, enquanto na ventricular somente células arredondadas (ch) foram notadas. **C** - Presença de fibroblastos (f) dispostos ao longo dos feixes de colágeno. **D** – Mesma que **C**, sob luz polarizada, onde pode ser observado os feixes de colágeno que estão posicionados à 45° dos polarizadores.

Barras = 70µm.

Figura 2 - Montagem total do folheto valvar corado com azul de toluidina e observado com o auxílio de lupa (**A**), em microscopia convencional (**B**) e microscopia de polarização (**C** - **F**), sob a perspectiva da face aórtica. **A** - Feixes de colágeno (c) dispostos longitudinalmente no folheto partindo das inserções na parede da aorta entrecruzando e abrindo em leque na região central do folheto. Observe material metacromático (m) entre os feixes de colágeno por todo o folheto. **B** - Detalhe da montagem total do folheto valvar mostrando os feixes de colágeno dispostos longitudinalmente (seta) e transversalmente (cabeça de seta). Na montagem total do folheto pode ser visto em **C** - Fibras de colágeno

posicionadas à 45° dos planos do polarizador, e em **D** - Fibras de colágeno posicionadas paralelas aos planos do polarizador. **E e F** - Detalhe da figura 1c mostrando um feixe de colágeno (c) disposto à 45° (**E**) e paralelo (**F**) aos planos do polarizador.

Barras: A = 0,2cm, B-D = 1000 μ m, E e F = 50 μ m.

Figura 3 - Montagem total do folheto valvar corado com azul de toluidina, visto pela face aórtica. **A** - Detalhe da montagem total vista em microscopia de polarização com os feixes dispostos à 45° dos planos do polarizador. Observar grande quantidade de grumos metacromáticos (seta) que estão dispostos ao longo dos feixes de colágeno. **B** - Detalhe de **A** mostrando grumos intensamente metacromáticos (seta).

Barras: A = 600 μ m, B = 20 μ m.

Figura 4 - Corte transversal do folheto valvar corado com azul de toluidina. **A**- Corte da região central do folheto da valva mostrando as camadas fibrosa (f), esponjosa (s) e ventricular (v). **B** - Mesmo que anterior, visto em microscopia de polarização, paralelamente aos planos do polarizador. **C** - Corte da região de inserção do folheto valvar na parede da artéria aorta. Metacromasia (m) foi observada em todas as camadas do folheto. **D** - Disposição longitudinal (seta) das fibras de colágeno nas camadas fibrosa (f) e esponjosa (s) com disposição transversal das fibras de colágeno na camada ventricular (v).

Barras = 70 μ m.

Figura 5 - Corte longitudinal do folheto valvar tratado com hialuronidase testicular e corado com azul de toluidina. **A** - Observação em microscopia convencional. Notar a ausência de metacromasia após o tratamento com a enzima. **B** - Mesma que **A** visto em microscopia de polarização e com os feixes de colágeno posicionados à 45° em relação aos polarizadores. A birrefringência observada é devida somente às fibras colágenas.

Barras = 80µm.

Figura 6 - Corte longitudinal do folheto valvar impregnados com prata, visto sob microscopias de polarização (**A** e **B**) e convencional (**C**). **A** e **B** - Dicroísmo linear positivo. **A** - Feixes de colágeno paralelos ao azimute do polarizador. **B** - Feixes de colágeno perpendiculares ao azimute do polarizador. **C** - Fibras reticulares (seta) coradas em preto e outras fibras de colágeno provavelmente tipo I, coradas em amarelo-escuro e/ou marron-claro, dispostas longitudinalmente no folheto.

Barras: A e B = 70µm, C = 40µm.

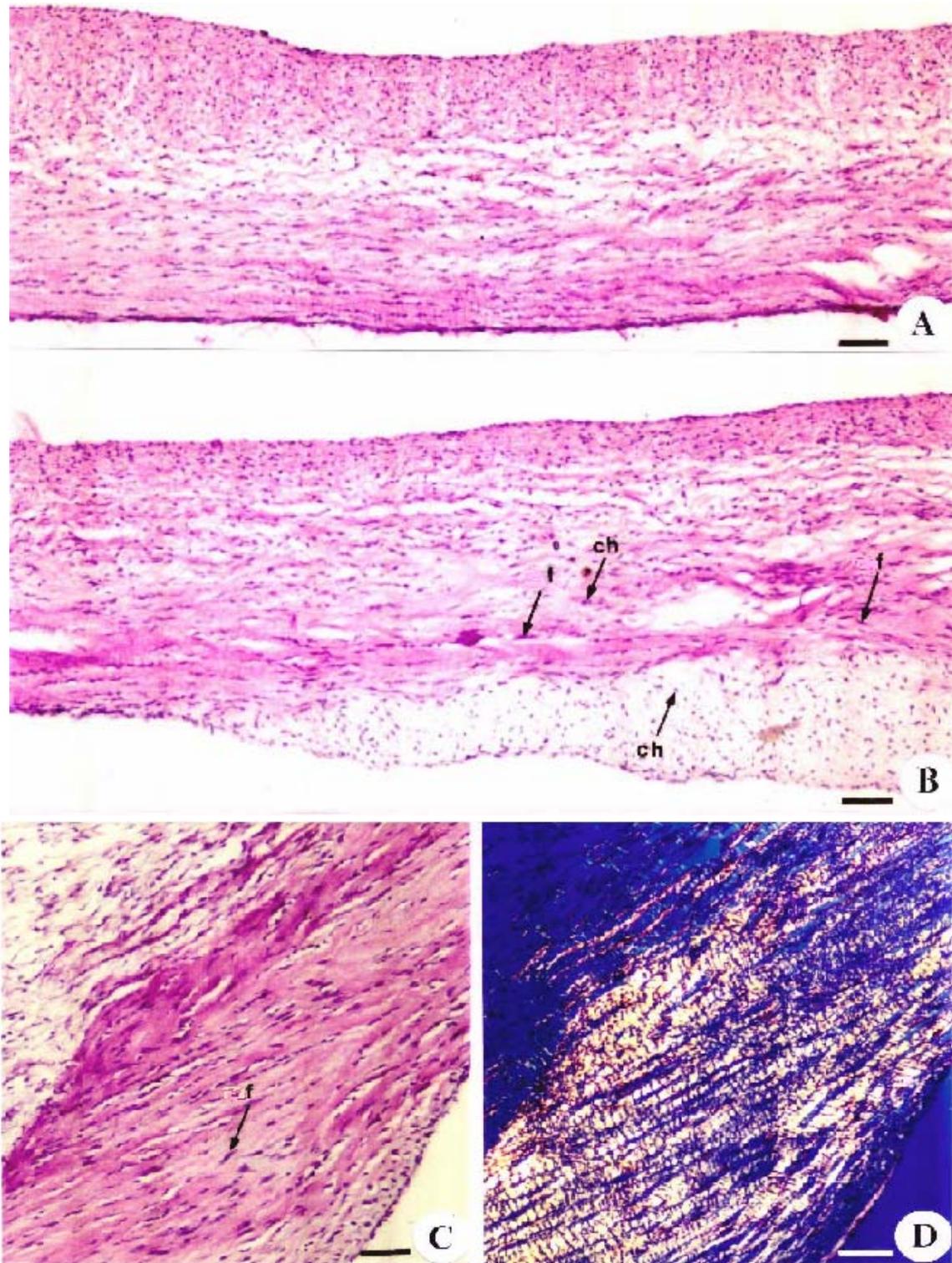


Fig. 1

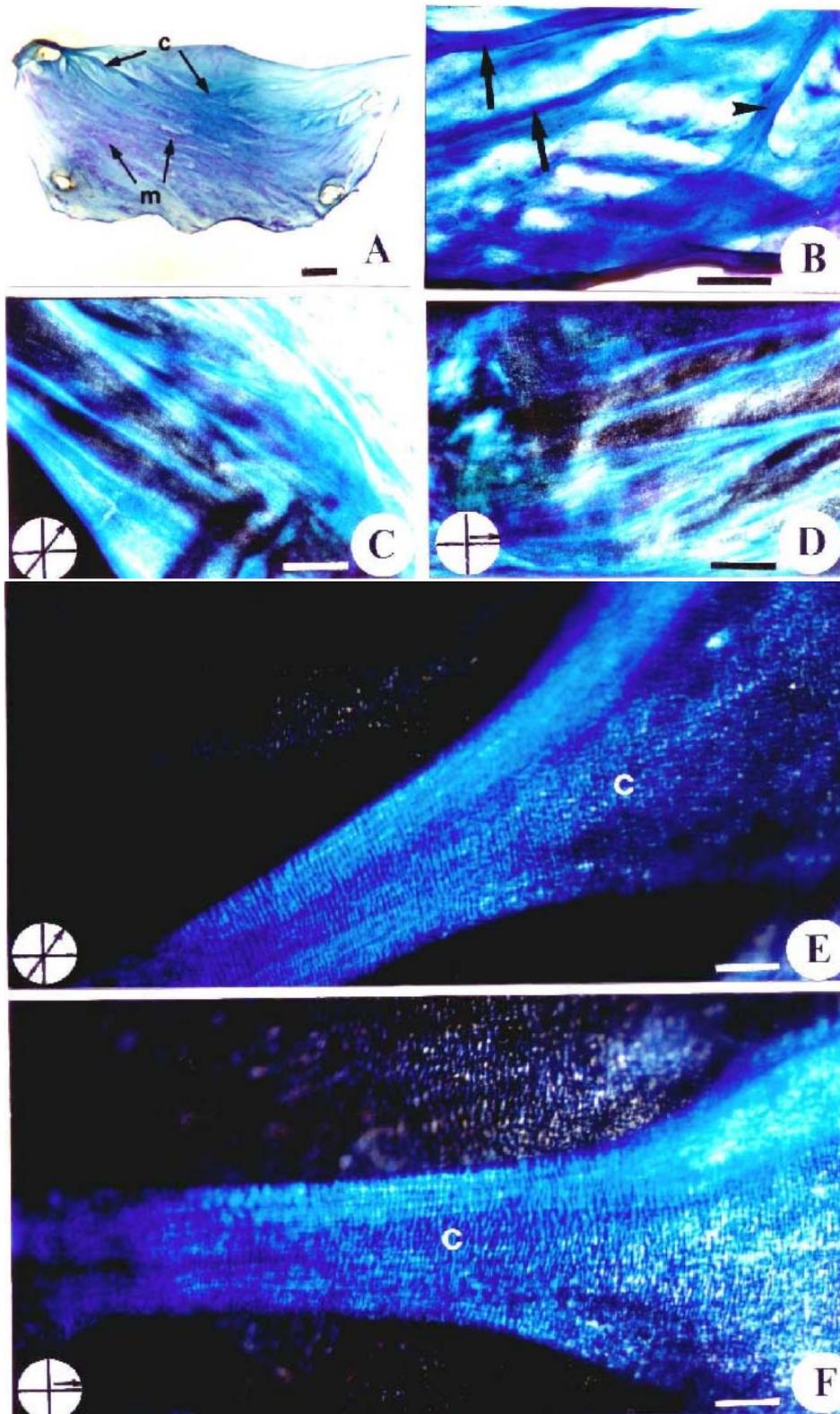


Fig. 2

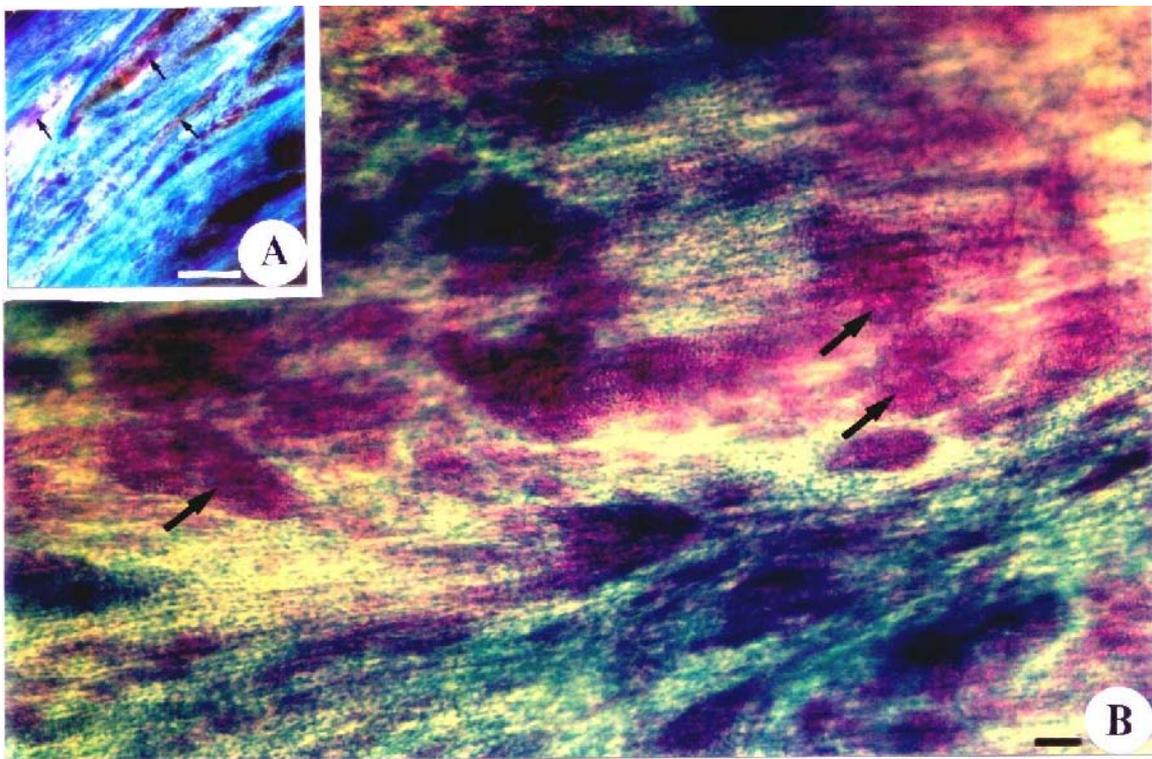


Fig. 3

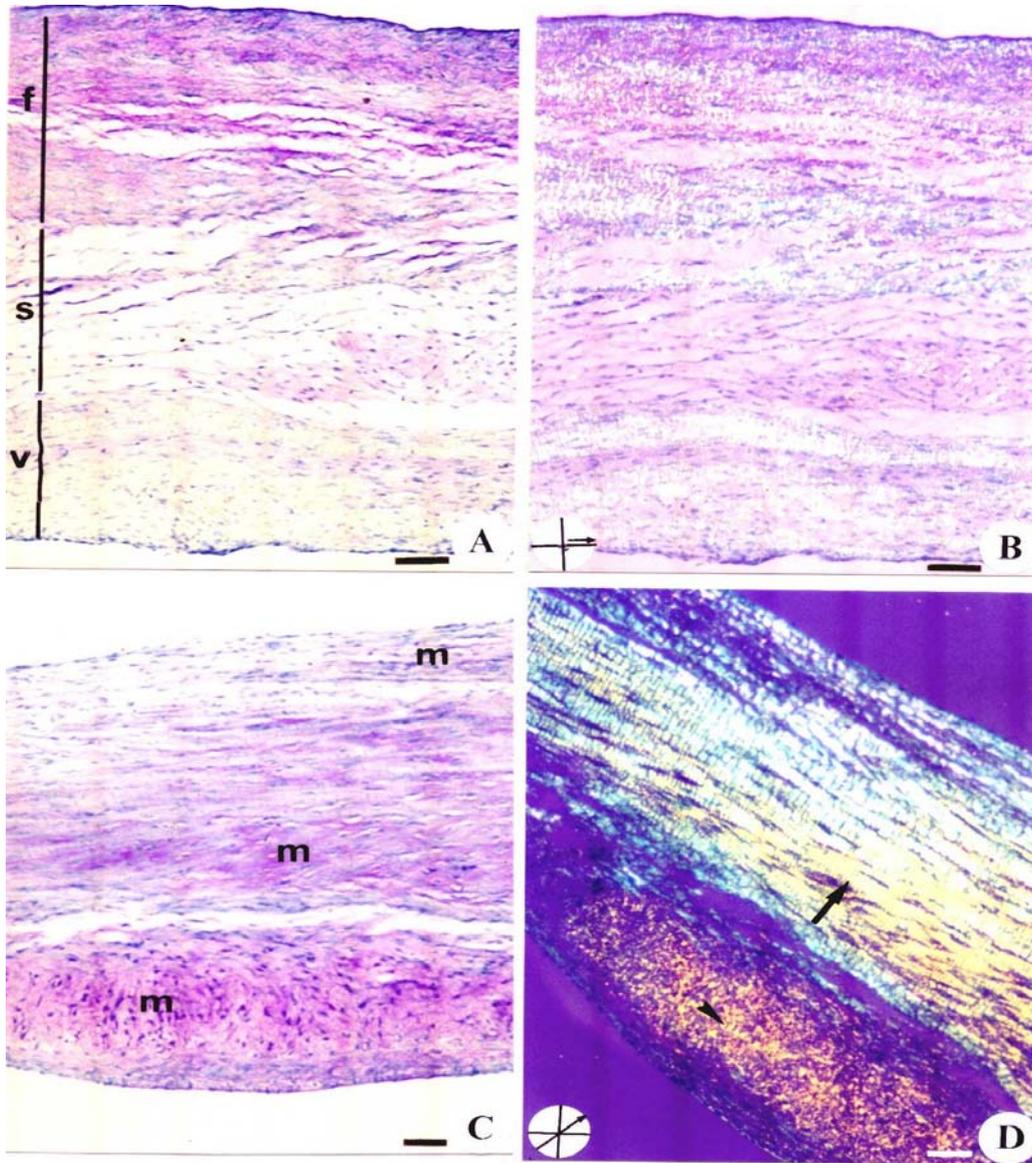


Fig. 4

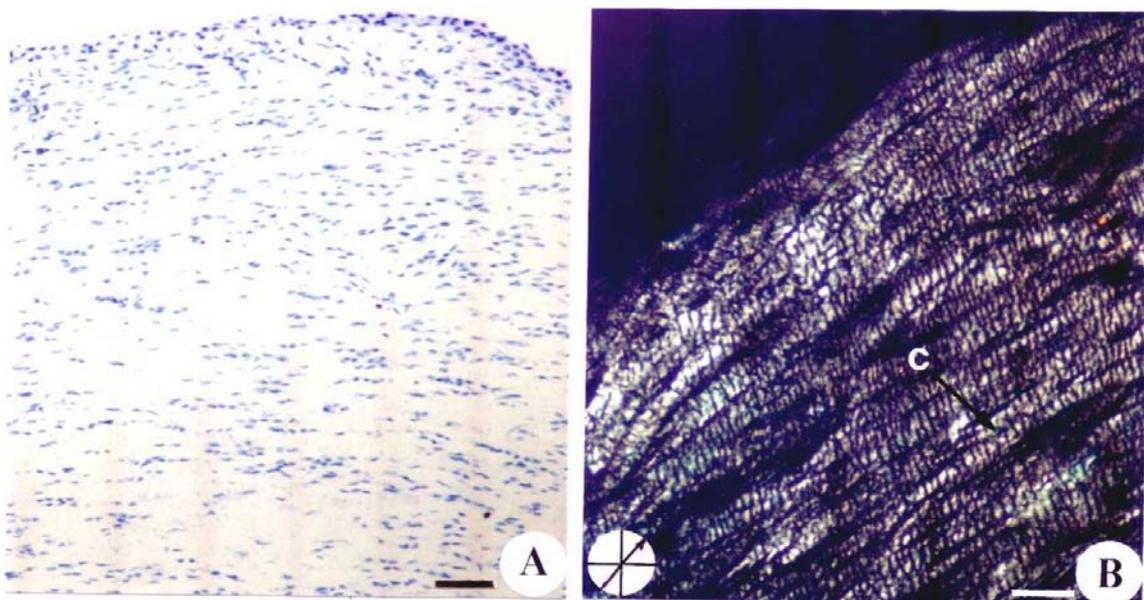


Fig. 5

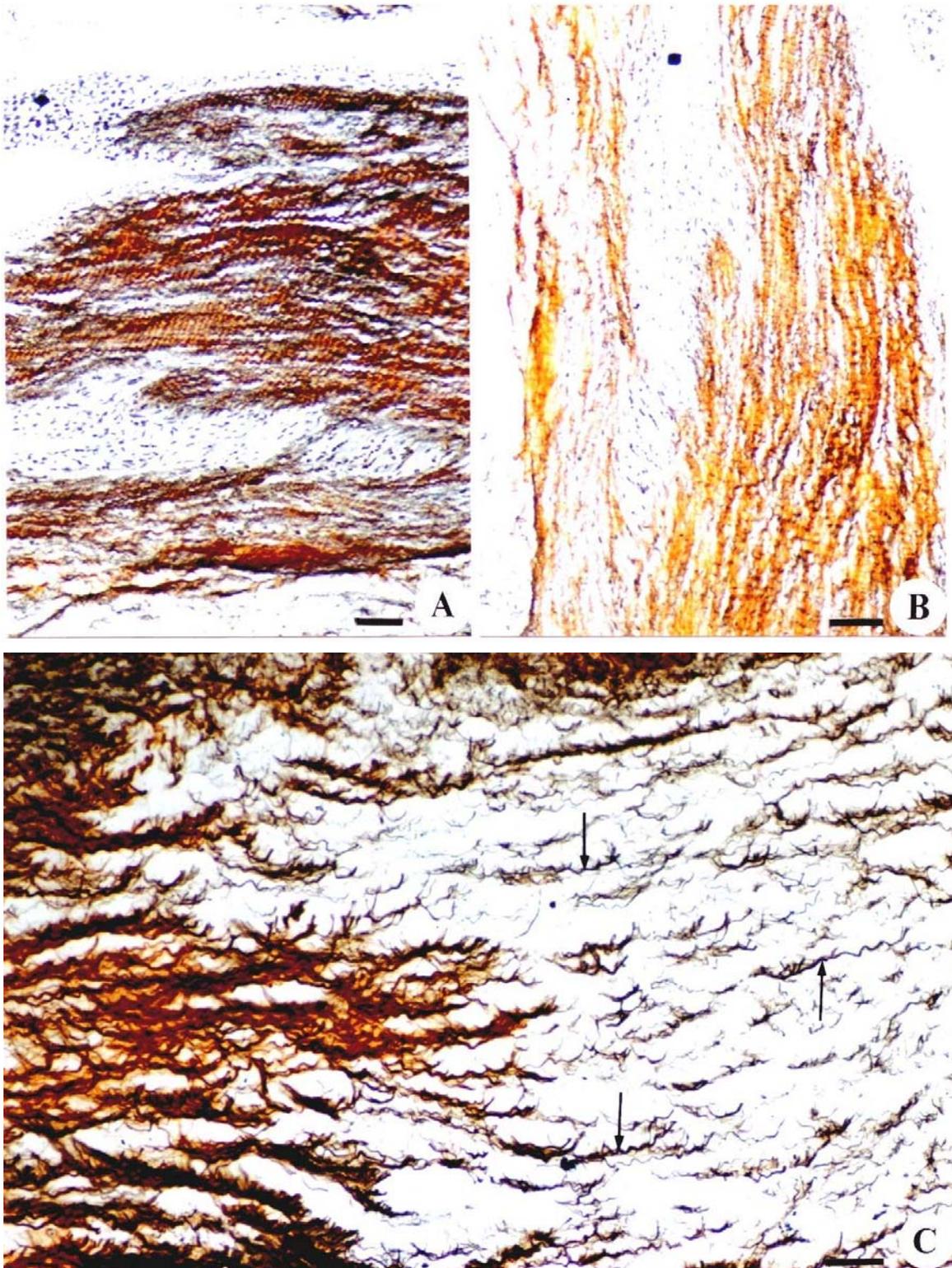


Fig. 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Athenstaed, H., 1974. Pyroelectric and piezoelectric properties of vertebrates. *Ann. N. Y. Acad Sciences*, 238:68–94.
- Bertipaglia, B., Ortolani, F., Petrelli, L., Gerosa, G., Spina, M., Pauletto, P., Casarotto, D., Marchini, M., Sartore, S. 2003. Cell characterization of porcine aortic valve and decellularized leaflets repopulated with aortic valve interstitial cells: the VESALIO project (*Vitalitate exornatum succedaneum aorticum labore ingenioso obtenibitur*). *Ann Thorac Surg* 75: 1274 - 82.
- Carvalho, H. F., Vidal, B. C. 1994. Cell types and evidence for traumatic cell death in a pressure-bearing tendon of *Rana catesbeiana*. *Tissue Cell* 26: 841 -8 48.
- Chen, W., Schoen, F. J., Myers, D. J., Levy, R. J. 1997. Synergistic inhibition of calcification of porcine aortic root with preincubation in FeCl₃ and α -amino oleic acid in rat subdermal model. *J. Biomed Mater Res* 38: 43 - 48.
- Colomb, G., Shoen, F. J., Smith, M. S., Linden, J., Dixon, M., Levy, R. J. 1987. The role of glutaraldehyde-induced cross-links in calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprosthesis. *Am J Pathol* 127: 122-130.
- Feitosa, V. L. C., Vidal, B. C., Pimentel, E. R. 2002. Optical anisotropy of a pig tendon under compression. *J Anat* 200: 105 - 111.
- Fishbein, M. C., Levy, R. J., Ferrans, V. J. 1982. Calcification of cardiac valve bioprostheses. Biochemical, histologic, and ultrastructural observations in a subcutaneous implantation model system. *J Thorac Cardiovasc Surg* 83: 602-609.

- Fukada, E., 1974. Piezoelectric properties of organic polymers. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 238:7-25.
- Gathercole, L. J., Keller, A. 1991. Crimp morphology in the fibre forming collagens. *Matrix* 11: 214 – 234.
- Jaworeck, T., Neher, D., Wegner, G., Wiringa, R.H., Schouten, A.J., 1998. Electromechanical properties of an ultrathin layer of directionally aligned helical polypeptides. *Science* 279:57–60.
- Kiernan, J.A. 1981. *Histological and Histochemical Methods*, p.166. Oxford: Pergamon Press.
- Kim, K. M. 2001. Cells, rather than extracellular matrix, nucleate apatite in glutaraldehyde-treated vascular tissue. *J Biomed Mater Res* 59: 639 - 645.
- Koob, T.J., Vogel, K.G. 1987a. Site related variations in glycosaminoglycan content and swelling properties of bovine flexor tendon. *J Orthopaed Res* 5: 414-424.
- Koob, T.J., Vogel, K.G. 1987b. Proteoglycan synthesis in organ cultures from regions of bovine tendon subjected to different mechanical forces. *Biochem J* 246: 589-598.
- Lovekamp, J., Vyavahare, N. 2001. Periodate-mediated glycosaminoglycan stabilization in bioprosthetic heart valves. *J Biomed Mater Res* 56(4): 478 - 486.
- McDonald, P. C., Wilson, J. E., McNeill, S., Gao, M., Spinelli, J. J., Rosenberg, F., Wiebe, H., McManus, B. M. 2002. The challenge of defining normality for human mitral and aortic valves. *Cardiovasc Pathol* 11: 193-209.
- Mello, M.L.S., Vidal, B.C. 1972. Evaluation of dichroism and anomalous dispersion of the birefringence on collagen subjected to metal impregnations. *Ann Histochem* 17: 333 - 340.

- Mello, M.L.S., Vidal, B.C. 1973. Anisotropic properties of toluidine blue-stained collagen. *Ann Histochem* 18: 103 - 122.
- Mello, M.L.S., Vidal, B.C. 1980. *Práticas de Biologia Celular*. São Paulo; Edgar Blücher, Campinas, SP; Funcamp. p.:71.
- Mello, M. L. S, Vidal, B. C. 2003. Experimental tendon repair: glycosaminoglycan arrangement in newly synthesized collagen fibers. *Cell Molec Biol* 49(4): 579 - 585.
- Merrilees, M. J., Flint, M. H. 1980. Ultrastructural study of tension and pressure zones in a rabbit flexor tendon. *Am J Anat* 157: 87 – 106.
- Módis, L. 1991. Organization of the extracellular matrix: A polarization microscopic approach. *CRC Press. pp 2-37; 287p*.
- Moore, M. A., Adams, A. K. 2001. Calcification resistance, biostability, and low immunogenic potential of porcine heart valves modified by dye-mediated photooxidation. *J Biomed Mater Res* 66 (5): 378 – 384.
- Ralphs, J. R., Benjamin, M., Thornett, A. 1991. Cell and matrix biology of the suprapatella in the rat: a structure and immunocytochemical study of fibrocartilage in a tendon subjected to compression. *Anat. Rec.* 231: 167-177.
- Ralphs, J. R., Tyers, R. N. S., Benjamin, M. 1992. Development of functionally distinct fibrocartilages at two sites in the quadriceps tendon of the rat. The suprapatella and the attachment at the patella. *Anat. Embryol* 185: 181-187.
- Rufai, A., Benjamin, M., Ralphs, J. R. 1992. Developmental and ageing of phenotypically distinct fibrocartilages associated with the rat Achilles tendon. *Anat Embryol* 186, 611-618.

- Robbins, S. L., 2000. O coração. In: ROBBINS, S. L. *Patologia estrutural e funcional*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000. 1251p. p. 488-525.
- Samouillan, V., Lamurea, A., Maurel, E., Dandurand, J., Lacabanne, C., Ballarin, F., Spina, M. 2000. Characterisation of elastin and collagen in aortic bioprostheses. *Med Biol Eng Comp* 38: 226-31.
- Sauren, A. A. H. J., Kuijpers, W., van Steenhoven, A. A., Veldpaus, F. F. 1980a. Aortic valve histology and its relation with mechanics – preliminary report. *J Biomech* 13: 97 - 104.
- Sauren, A. A. H. J., van Steenhoven, A. A., Veldpaus, F. F. 1980b. A biomechanical analysis of aortic valve histology. *J Biomech* 13: 810 - 811.
- Scott, M. J., Vesely, I. 1996. Morphology of porcine aortic valve cusp elastin. *J Heart Valve Dis* 5 (5): 464 - 471.
- Singla, A., Lee, C. H. 2002. Effect of elastin on the calcification rate of collagen-elastin matrix systems. *J Biomed Mater Res* 60: 368 - 374.
- Sung, H. W., Chang, Y., Chiu, C-T., Chen C-N., Liang, H-C. 1999. Mechanical properties of a porcine aortic valve fixed with a naturally occurring crosslinking agent. *Ann Thorac Surg* 8: 407 - 414.
- Valente, M., Bortolotti, U., Thiene, G. 1985. Ultrastructural substrates of dystrophic calcification in porcine bioprosthetic valve failure. *Am J Pathol* 119: 12-21.
- Vesely, I. 1998. The role of elastin in aortic valve mechanics. *J Biomech* 31: 115-123.
- Vesely, I. 2001. The influence of design on bioprosthetic valve durability. *J Long-Term Effects Med Implants* 11: 137-149.

- Vidal, B. C. 1963. Pleochoism in tendon and its bearing to acid mucopolysacarides. *Protoplasma* 56: 529 - 536.
- Vidal, B. C. 1964. The part played by the mucopolysacharides in the from birefringence of the collagen. *Protoplasma* 59: 472 - 479.
- Vidal, B. C., Mello, M. L. S. 1970. Absorption spectral curves of dichroism on collagen bundles. *Histochemie* 23: 176 - 179.
- Vidal, B. C., Mello, M. L. S., Godo, A. C., Caseiro, F^o., Abujadi, J. M. 1975. Anisotropic properties of silver plus gold-impregnated collagen bundles: ADB and form birefringence curves. *Ann Histochem* 20: 15 - 26.
- Vidal, B. C. 1976. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. *Cell Molec Biol* 22: 45 - 64.
- Vidal, B. C. 1980. The part played by proteoglycans and structural glycoproteins in the macromolecular orientation of collagen bundles. *Cell Molec Biol* 26: 415 - 421.
- Vidal, B.C., Mello, M. L. S. 1984. Proteoglycan arrangement in tendon collagen bundles. *Cell Molec Biol* 30: 195-204.
- Vidal, B.C., 1986. Evaluation of carbohydrate role in the molecular order of collagen bundles: microphotometric measurements of textural birefringence. *Cell Molec Biol* 32:527-535.
- Vidal, B.C. 1987. Métodos em Biologia Celular. *In: Vidal & Mello Biologia Celular*. Atheneu; Rio de Janeiro, pp. 17-25.

- Vidal, B. C., Vilarta, R., 1988. Articular cartilage: collagen II-proteoglycan interactions. Availability of reactive groups. Variation in birefringence and differences as compared to collagen I. *Acta Histochem* 83: 189 - 205.
- Vidal, B. C. 1995. Crimp as part of a helice structure. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sci. la Vie/Life Sci.* 318: 173 - 178.
- Vidal, B. C., Joazeiro, P. 2002. Electron microscopic determination of silver incorporation in collagen fibers as a model of organic-metal chiral supramolecular structure with optical anisotropic properties. *Micron* 33: 507 - 509.
- Vidal, B. C. 2003a. Image analisys of linear dichroism in collagen-nono-silver complexes. *Micros Analysis* 97: 21 - 23.
- Vidal, B. C. 2003b. Reticulin morphometry and collagen fibers optical anisotropy as assessed by image analysis after silver impregnation. *Braz J Morphol* 20: 121 - 124.
- Vilarta, R., Vidal, B. C. 1989. Anisotropic and biomechanical properties of tendons modified by exercise and denervation: aggregation and macromolecular order in collagen bundles. *Matrix* 9: 55 - 61.
- Vogel, K. G., Sandy, J. D., Pogány, G., Robbins, J. R. 1994. Aggrecan in bovine tendon. *Matrix* 14: 171 -179.
- Ye, Q., Zund, G., Benedikt, P., Jockenhoevel, S., Hoerstrup, S. P., Sakyama, S., Hubbell, J. A., Turina, M. 2000. Fibrin gel as a three dimensional matrix in cardiovascular tissue engineering. *Eur J Cardiothorac Surg* 17: 587 – 591.

**PROTEÍNAS NÃO COLAGÊNICAS E PROTEOGLICANOS DA VALVA
AÓRTICA DE PORCO**

RESUMO

Vários estudos com valvas aórticas têm mostrado a importância das moléculas de colágeno e elastina, mas pouco tem sido publicado sobre proteoglicanos e proteínas não colagênicas. Assim, neste trabalho os componentes da matriz extracelular de valva aórtica de porco foram extraídos com GuHCl 4M, fracionados em coluna de DEAE-Sephacel, e analisados em SDS-PAGE. Também foram identificados os tipos de glicosaminoglicanos presentes. As proteínas não colagênicas encontradas nos folhetos apresentaram massa molecular aparente entre 18 e 170 kDa. Uma banda polidispersa em torno de 70 kDa e outra na faixa de 80 a 100 kDa foram encontradas e possivelmente sejam os pequenos proteoglicanos fibromodulim e decorim. A análise de glicosaminoglicanos em gel de agarose-propilenodiamino após digestão do tecido com papaína revelou a presença de condroitim sulfato e dermatam sulfato. Análise em gel de agarose-propilenodiamino de frações ricas em componente de 80 – 100 kDa, submetidas a β -eliminação e tratadas com condroitinases ABC e AC, demonstrou que o componente polidisperso contém o glicosaminoglicano dermatam sulfato. A análise em gel de agarose-poliacrilamida, da fração D1 de ultracentrifugação, revelou uma banda polidispersa e metacromática após coloração com azul de toluidina, indicando a presença de proteoglicano de alto peso molecular. A presença de condroitim sulfato reforça esta idéia. Estes proteoglicanos de alto peso, sugerem que forças compressivas ocorram no folheto. As proteínas não colagênicas até agora não detectadas em valva aórtica de porco, podem ter papel estrutural ou regulador e juntamente com os pequenos e grandes proteoglicanos podem modular a fisiologia e biomecânica da valva.

INTRODUÇÃO

A valva aórtica é formada por três folhetos de tecido conjuntivo, denominados cúspides, fixados à parede da artéria aorta, que se abrem para permitir a passagem de sangue do ventrículo para a aorta, e se acoplam (ou fecham) durante a diástole. As cúspides da valva aórtica são constituídas principalmente de água (cerca de 80%), mas também contém proteínas colagênicas e não colagênicas, elastina, pequenos e grandes proteoglicanos, que lhes conferem propriedades mecânicas peculiares. O colágeno compõe cerca de 50% do peso seco do folheto valvar, enquanto a elastina representa cerca de 13% (Bashey *et al.*, 1967). O colágeno tipo I, encontrado principalmente em tendão, osso e pele é o mais abundante na valva, mas também está presente o colágeno tipo III (Mannschott, *et al.*, 1976; Bashey, *et al.*, 1978; Scott & Vesely, 1996) comumente encontrado em pele, vasos, membranas fetais e órgãos hemocitopoiéticos. A presença de fibras elásticas permite à valva sofrer distensão durante a abertura dos folhetos (Scott & Vesely, 1996). Na valva de coração de porco, as fibras do colágeno funcionam como pontes de união dos folhetos valvares às paredes da aorta, comportando-se como cabos de suspensão, que mantêm os folhetos ligados à parede da aorta e dão sustentação ao tecido durante a diástole (Lovekamp & Vyahare, 2001). Os proteoglicanos de alto e baixo peso como o versicam e o decorim são encontrados em valva aórtica (Rothenburger *et al.*, 2002), sendo que este último deve participar como organizador tecidual atuando na fibrilogênese do colágeno no folheto valvar a exemplo do que ocorre em cartilagem (Knudson & Knudson, 2001). O decorim tem influência na fibrilogênese do colágeno tipo I e tipo II (Radermecker *et al.*, 2003) enquanto o fibromodulim tem provavelmente a função de regular o diâmetro das fibrilas de

colágeno (Knudson & Knudson, 2001). Proteoglicanos de alto peso molecular, ricos em condroitim sulfato, fazem parte da matriz extracelular da valva (Rothenburger *et al.*, 2002), uma vez que esta recebe forças compressivas, devido ao aumento da pressão sanguínea na fase diastólica, estimulando as células a produzir proteoglicanos de alto peso molecular, como ocorre em tendões (Vogel *et al.*, 1994, Koob & Vogel, 1987b), e desse modo oferecer resistência à carga compressiva. Os efeitos lubrificante e hidratante dos proteoglicanos também teriam o papel de minimizar o estresse sofrido pelo folheto, durante o rearranjo das fibras de colágeno, quando estas se movimentam sobre as fibras elásticas (Scott & Vesely, 1996; McDonald *et al.*, 2002). A síntese dos diferentes componentes da matriz extracelular da valva aórtica em humanos pode sofrer alterações com a idade, tendo sido observado que a síntese de glicosaminoglicanos aumenta entre 30 e 60 anos de idade, concomitantemente ocorre decréscimo da proporção de colágeno e aumento na porcentagem de elastina (McDonald, *et al.*, 2002).

As proteínas não colagênicas, formam um importante grupo de proteínas que podem servir como mediadores da adesão celular na matriz extracelular (Comper, 1996), como proteínas estruturais ou proteínas com papel regulador do metabolismo da matriz da valva aórtica.

A valva aórtica de porco tem sido utilizada na construção das biopróteses pela facilidade de encontrá-las frescas e disponíveis nos variados tamanhos, e por serem consideradas anatomicamente muito similares à valva aórtica humana. A variedade de biomateriais utilizados em laboratório inclui as biopróteses de valvas cardíacas (Fishbein *et al.*, 1982), que são de boa durabilidade comparada às outras valvas de tecido e eliminam a necessidade de terapia com anticoagulante requerida pelas valvas mecânicas.

Os estudos com biopróteses utilizando valva cardíaca de porco, têm sido realizados (Lehner et al., 1997; Samouillan et al., 2000; Ye et al., 2000), contudo os resultados ainda não são satisfatórios, possivelmente devido a falhas no processo de fixação, e também pela falta de conhecimento sobre a composição da matriz extracelular dessa valva.

Assim estamos apresentando neste trabalho os resultados da análise dos componentes da matriz extracelular da valva aórtica de porco, procurando estabelecer correlações com dados morfológicos de pesquisa em andamento em nosso laboratório.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material Biológico

Foram utilizadas valvas aórticas de coração de 50 porcos da linhagem Large-White com idade entre 4 e 6 meses provenientes do Abatedouro Marchiori da cidade de Amparo - SP. As valvas foram retiradas imediatamente após o abate, lavadas em solução fisiológica em 4°C e depois congeladas, em temperatura de -70° (fig 1).

Extração dos componentes da matriz extracelular

A valva foi picada em pequenos pedaços e homogenizada em PBS, com homogenizador Polytron-Aggregate 12mm, por três vezes consecutivas com intensidade igual a cinco por 40 segundos cada, com um intervalo de 15 segundos. 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).

Para extração, o material ficou 48 horas sob constante agitação e em banho de gelo. Após esse tempo o material foi submetido à centrifugação com 18.000 rpm (centrífuga Beckman J2-21 – rotor JA-20) por 50 minutos. O sobrenadante foi utilizado para as análises bioquímicas.

Ultracentrifugação

O 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 34.000 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.

Dosagens

Para dosagem de proteínas solúveis utilizamos o método de Bradford (1976), usando albumina de soro bovino (BSA) para curva padrão, e a leitura foi em 596nm. A quantificação de glicosaminoglicanos sulfatados foi feita segundo Farndale et al., (1986), utilizado o azul de dimetilmetileno (DMMB). Para curva padrão foi utilizado o condroitim sulfato e a leitura foi em 526nm. Para as duas dosagens foi utilizado o espectrofotômetro Hewlet Packard 8452A.

Cromatografia de Troca Iônica

Uma amostra de 3mL do extrato total em GuHCl 4M, foi dialisada contra 20 volumes de uréia 7M, em tampão Tris-acetato 0,05M pH 8,0. Foram realizadas quatro trocas. A amostra foi fracionada em coluna de troca iônica com DEAE-Sephacel (1,5x2,7 cm), a qual foi 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 absorvância em 230 e 280 nm em espectrofotômetro (Hewlet Packard 8452A).

Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)

A eletroforese foi realizada conforme Zingales (1984). As amostras obtidas da cromatografia de troca iônica foram analisadas em gradiente de 4 - 16% de acrilamida em presença de SDS usando o sistema de tampão de acordo com Laemmli (1970). Amostras (3 x 114 μ L) das frações de cromatografia foram precipitadas em etanol-acetato (Heinergård & Sommarin, 1987), e então centrifugadas em Microcentrífuga Fisher Scientific Model 235 Va 8000, a 8.000 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 coloração foi feita pelo Coomassie Brilliant Blue. As massas moleculares aparentes foram inferidas por cálculo de Rf e curva de regressão dos marcadores de peso molecular (Klaus & Osborn, 1969).

Cromatografia de Interação hidrofóbica

A fração D4 rica em proteoglicanos de baixa massa molecular obtidas na ultracentrifugação, foi dialisada em tampão acetato de sódio 50mM, pH 6,3, contendo 2M GuHCl, e aplicadas em uma coluna de interação hidrofóbica de Octyl-Sepharose equilibrada com o mesmo tampão utilizado para diálise. Para eluição das frações foi utilizado um gradiente de GuHCl 2-6M em tampão acetato de sódio 50mM, pH 6,3. Todas

as frações foram analisadas em SDS-PAGE. O método utilizado para revelação das bandas foi a impregnação com prata (Blum *et al.*, 1987).

β-eliminação

Para liberação das cadeias de glicosaminoglicanos da proteína central dos proteoglicanos eluídos da cromatografia de troca iônica, amostras foram precipitadas em acetato-etanol, como descrito 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 glicosaminoglicanos obtidas foram analisadas em gel de agarose-propilenodiamino. Em alguns experimentos, os glicosaminoglicanos foram tratados com condroitinases ABC/AC.

Eletroforese em gel de Agarose-propilenodiamino

Para análise dos glicosaminoglicanos totais, o tecido foi deixado em acetona “overnight” a 4°C, e em seguida 24 horas de estufa a 37°C. Depois de seco e picado, foi digerido com papaína na proporção de 40mg/g de tecido, em tampão citrato de sódio 0,03M pH 3,5 contendo EDTA 0,04M e β-Me 0,08M (80μL/1mL). O preparado foi incubado em banho maria a 50°C/24 horas. Ao sobrenadante após centrifugação em microcentrífuga Fisher a 8.000 rpm 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 (Michelacci & Horton, 1989). Os glicosaminoglicanos obtidos após digestão com papaína foram suspensos em 400μL de água e analisados em gel de agarose. O gel foi preparado como descrito por

Dietrich & Dietrich, 1976. O tampão utilizado foi o propilenodiamino 50mM, pH 9,0. As condições de corrida foram 0,1A e 100 V. A seguir os géis foram fixados em brometo de cetiltrimetilamonio (Cetavlon) 0,1% e corados com azul de toluidina 0,1% em etanol 50% e ácido acético 1%. Padrões conhecidos de glicosaminoglicanos contendo condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS) e heparam sulfato (HS) foram aplicados paralelamente.

Quantificação de Hidroxiprolina

Fragmentos da valva foram hidrolisadas em HCl 6N (1mL/10mg de tecido) por 4h a 130°C. A seguir foi acrescentado uma solução contendo 1,41g de cloramina-T, 10 mL de água, 10 mL de n-propanol e 80 mL de tampão (50g de ácido cítrico, 12 mL de ácido acético, 120g de acetato de sódio e 34 g de hidróxido de sódio, pH6,0). Após 20 minutos de incubação foi adicionado 1 mL de solução de ácido perclórico/aldeído (15g de p-dimetilamino benzaldeído, 60 mL de n-propanol, 26 mL de ácido perclórico a 60% e n-propanol para completar 100 mL). O material foi incubado por 15 minutos em 60°C, resfriado e a absorbância lida em espectrofotômetro em 550nm (Stegemann & Karlheinz, 1967).

Digestão com Colagenase

Algumas frações obtidas da cromatografia de troca iônica foram precipitadas em etanol como descrito acima, suspensas em 10µL da enzima Colagenase tipo VI, 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 0,25 mg a 2 mg/mL de proteoglicanos. 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 10 mL de água dos quais utilizamos 1,64 mL, 0,0115g de TritonX-100 e 49µL de TEMED. Solução agarose 0,0786g de agarose em 7,376 mL de tampão estoque e 0,0393g de PAM em 0,983 mL 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. Para saber se o proteoglicano obtido era agregante ou não, parte da amostra contendo proteoglicanos foi incubada com ácido hialurônico de alto peso molecular (20% do peso do proteoglicano) à 4°C “overnight”. Após incubar, foi adicionado igual volume de sacarose 60%, 0,1% Triton X-100 e 0,05% de azul de bromofenol.

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 *et al.*, 1979). As condições para gel e eletroforese foram as mesmas descritas acima.

Digestão com Condroitinases

Para digestão com condroitinase ABC, 6,15 μ g de glicosaminoglicanos foram suspensos em tampão acetato de sódio 50mM, EDTA 10mM e Tris 50mM pH 8,0. A digestão foi à 37°C durante 2 horas. Em seguida foi feita a precipitação em etanol, e o precipitado suspenso em 5 μ L de água para análise em gel. No caso da Chase AC 6,15 μ g de glicosaminoglicanos foram suspensos em tampão acetato de sódio 50mM, EDTA 10mM e Tris 50mM pH 6,0. As condições de digestão foram as mesmas que a anterior.

RESULTADOS

Dosagem de proteínas, glicosaminoglicanos e colágeno

As dosagens obtidas a partir de extratos em GuHCl 4M, resultaram em $8,77 \pm 0,78$ e $2,10 \pm 0,37$ mg/g de tecido, respectivamente para proteínas e glicosaminoglicanos sulfatados. No caso de colágeno, quantificado a partir de hidrolisado de fragmentos da valva, foi $275 \pm 0,94$ mg/g de tecido úmido.

Cromatografia de Troca Iônica e SDS-PAGE

Os componentes ligados ao DEAE e eluídos com um gradiente NaCl (fig 2A) foram analisados em gel de SDS-poliacrilamida (Fig 2B) A partir dos padrões de pesos moleculares e valores de Rf das bandas visualizadas no gel, foram identificadas proteínas com massa molecular aparente de 170, 156, 85, 73, 58, 40, 24 e 18 kDa. Cadeias α_1 e α_2 correspondentes ao colágeno I foram encontradas nas frações coletadas antes da aplicação do gradiente de NaCl. Resultado do tratamento com colagenase das proteínas presentes em duas frações da cromatografia, mostrou que as proteínas de 170 e 156 kDa não são colagênicas (fig 3C) e nem mesmo oligoméricas, uma vez que não mostraram subunidades quando a eletroforese ocorreu em presença de β -mercaptoetanol. Mesmo resultado foi encontrado no gel de SDS-PAGE da cromatografia da fração D4 da ultracentrifugação (não mostrado). Uma banda polidispersa em torno de 70 kDa e outra na faixa de 80 a 100 kDa foram encontradas e possivelmente sejam os pequenos proteoglicanos fibromodulim e decorim.

Gel de Agarose-Propilenodiamino

A análise de glicosaminoglicanos em gel de agarose-propilenodiamino após digestão do tecido com papaína revelou a presença de condroitim sulfato e de dermatam sulfato (fig 3A). Condroitim sulfato aparece em maior quantidade do que dermatam sulfato. Amostras reunidas de frações ricas no componente de 80 – 100kDa tratadas com condroitinases ABC e AC analisadas em gel (fig 3B), demonstraram que este componente polidisperso contém glicosaminoglicano tipo DS.

Gel de Agarose-poliacrilamida

Para avaliar a presença de proteoglicanos de alto peso molecular, amostras da fração D1 da ultracentrifugação do extrato total foram analisadas em gel de agarose-poliacrilamida (fig 4) após tratamento com SDS 0,5% e com Triton X-100 0,1%. Uma banda polidispersa e metacromática após coloração com azul de toluidina foi encontrada. O comportamento de migração no gel não alterou quando a amostra de D1 foi previamente incubada com ácido hialurônico após tratamento com Triton X-100.

DISCUSSÃO

A análise dos resultados de eletroforese das frações eluídas de DEAE-Sephacel, mostrou que além de proteoglicanos e colágeno, a valva aórtica contém pelo menos oito proteínas não-colagênicas, com valores de Mr na faixa de 18 a 170 kDa. As mesmas proteínas foram encontradas em todos os extratos analisados, indicando que são componentes constantes da matriz extracelular da valva aórtica. Estas proteínas, até agora não detectadas em valva aórtica de porco, podem ter papel estrutural ou regulador, e também podem estar envolvidas na função de modular a fisiologia e biomecânica da valva. A valva aórtica possui uma estrutura altamente viscoelástica e apresenta anisotropia óptica (Mazon, et al., 2004 – o outro artigo que consta desta tese), propriedades que provavelmente não se devem só aos feixes de colágeno, mas a um complexo supramolecular, formado por colágeno, proteoglicanos e proteínas não-colagênicas, identificadas nos géis de eletroforese. Segundo Scott & Vesely (1996), as interações entre proteoglicanos, colágeno e elastina, seriam responsáveis pela longevidade da valva, além de permitir que a valva suporte as oscilações de pressão devido ao ciclo cardíaco. Acreditamos que as proteínas não-colagênicas de 18-170 kDa encontradas aqui, também tenham influência neste processo, pois são integrantes da matriz extracelular e cada uma interage fortemente com os outros componentes da matriz, só sendo extraídas em presença de um forte agente caotrópico como o cloreto de guanidina. É possível que estas proteínas não-colagênicas tenham papel regulador do metabolismo da matriz extracelular. O fato das proteínas com 170 e 156 kDa, não terem sido digeridas pela colagenase indica que não se

trata de colágeno e nem de proteína oligomérica já que sua migração no gel não mudou quando a corrida se deu em presença de β -mercaptoetanol.

A banda polidispersa com 80-100 kDa, tem um comportamento eletroforético muito parecido ao pequeno proteoglicano decorim encontrado em tendões (Vogel et al., 1994), cartilagem (Heinergård & Pimentel, 1992;), pele (Kuc & Scott, 1997) e esclera (Coster & Fransson, 1981). A digestão do tecido com papaína e os experimentos com condroitinases ABC e AC em glicosaminoglicanos liberados do componente polidisperso de 80-100 kDa, mostrou que dermatam sulfato é o glicosaminoglicano presente neste composto. Este resultado reforça a indicação de que este pequeno proteoglicano seja o decorim, pois em todos os casos de tecidos moles já estudados, o decorim possui dermatam sulfato sendo condroitim sulfato, somente encontrado em decorim de osso (Fisher, 1999). Estudos ultraestruturais em tendões tem sugerido a interação entre decorim e colágeno em tecidos conjuntivos (Pringle & Dodd, 1990; Scott, 1992). A interação deste pequeno proteoglicano com as moléculas de colágeno tipo I e II, ocorre através da porção protéica central e não das cadeias de glicosaminoglicanos, embora estas possam desempenhar algum papel nessas interações (Hedbom & Heinergård, 1993) e são importantes para a organização espacial da matriz extracelular (Sini *et al.*, 1997). A presença do decorim bem como sua interação com as fibrilas de colágeno da valva é estruturalmente importante, considerando que o decorim tem papel relevante na regulação do crescimento em diâmetro das fibrilas de colágeno *in vitro* (Brown & Vogel, 1989; Hedbom & Heinergård, 1989; Hedbom & Heinergård, 1993) e provavelmente *in vivo* (Birk *et al.*, 1995).

Outro componente polidisperso, com massa molecular aparente em torno de 70 kDa, mas com uma presença mais discreta do que a banda de 80-100 kDa, foi detectado em frações de DEAE-Sephacel e em fração D4 de ultracentrifugação. Embora este componente tenha um aspecto polidisperso muito semelhante ao fibromodulim, um proteoglicano rico em keratam sulfato, em SDS-PAGE migrou mais lentamente do que o fibromodulim de bovinos, onde o valor de Mr está em torno de 59 kDa (Heinergård & Oldeberg, 1989). A falta de anti-fibromodulim disponível também impede que seja feito um teste imunocitoquímico como o Western-blotting. O fibromodulim da mesma forma que o decorim tem grande contribuição para a manutenção e organização das fibras de colágeno da matriz extracelular (Hedbom & Heinergård, 1989; Oldeberg *et al.*, 1989), sendo importante na modulação da fibrilogênese do colágeno, *in vitro* (Hedlund *et al.*, 1994; Hocking *et al.*, 1998). Estudos com cartilagens tem mostrado a associação deste proteoglicano com os colágenos tipo I e tipo II (Roughley *et al.*, 1996).

A interação do decorim e do fibromodulim com o colágeno se dá em sítios diferentes para cada molécula (Hedbom & Heinergård, 1993). Esses componentes são normalmente detectados em extrato total e fração D4 de ultracentrifugação, mas podem também ser encontrados em D2, devido a agregação entre essas moléculas e os monômeros de proteoglicano de alto peso molecular (Roughley & White, 1989). As interações entre os componentes valvares em especial os proteoglicanos e os feixes de colágeno fornecem à valva resistência às forças compressivas e tensionais que incidem sobre ela, devido a própria funcionalidade da valva (Vesely, 1998).

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 da valva aórtica, como mostrado nos resultados de eletroforese em gel de agarose-poliacrilamida, onde ocorre a presença de um único componente polidisperso metacromático. O condroitim sulfato, um glicosaminoglicano abundante em grandes proteoglicanos, é responsável pelo alto grau de hidratação nesses tecidos (Lohnmander, 1998).

A existência de forças compressivas induz as células a produzirem proteoglicanos, mesmo em tecidos predominantemente fibrosos como em tendões de anfíbios (Carvalho & Vidal, 1995), coelhos (Merrilees and Flint, 1980) bovinos (Vogel *et al.*, 1994, Koob & Vogel, 1987b) e suínos (Feitosa *et al.*, 2002). No caso dos folhetos da valva, a presença de grandes proteoglicanos com cadeias tipo condroitim sulfato era esperado, uma vez que a valva aórtica recebe forças compressivas da pressão sanguínea na fase diastólica, que são capazes de estimular as células a produzir esses grandes proteoglicanos ricos em condroitim sulfato, mostrado em gel de agarose propilenodiamino. A análise deste proteoglicano quando incubado com ácido hialurônico revelou que o proteoglicano não migrou de forma mais lenta, sugerindo que se trata de um proteoglicano de alto peso molecular, mas não agregante.

Além dos proteoglicanos de alto peso molecular, também foram encontrados os de baixo peso, e proteínas não-colagênicas que estão interagindo fortemente entre si, e devem ter papel importante na estrutura desta valva, como sugerem os dados de birrefringência que vem sendo obtidos em um trabalho em paralelo, onde as cadeias glicânicas de parte da população de proteoglicanos, aparecem dispostas paralelamente às fibrilas de colágeno. Além da participação estrutural, estamos levantando a hipótese de que os

glicosaminoglicanos dos proteoglicanos possam ter papel anti-aglutinante ou ainda participar em de processos de calcificação como tem sido verificado em biopróteses.

LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1 – Vista da valva aórtica de porco, voltada para a artéria aorta. Notar os três folhetos (*) que compõem a valva, com suas bordas livres unidas. À esquerda vê-se o tronco pulmonar e à direita, parte da aurícula.

Figura 2 – Cromatografia e eletroforese. **A** – Cromatograma das frações obtidas em DEAE-Sephacel. G – início do gradiente com NaCl (0,1 – 1,0M). **B** - Eletroforese em SDS-Poliacrilamida. Observar as proteínas com 170, 156, 85,58, 40, 24 e 18 kDa (setas). Bandas polidispersas com 70kDa e 80-100 kDa podem ser vistas. À esquerda estão os marcadores de peso molecular (PM) e à direita o padrão de colágeno (Col). **C** – Eletroforese em SDS-poliacrilamida de proteínas com 170 e 156kDa (setas), tratadas (+) e não tratadas (-) com colagenase. Observe que estas proteínas não foram digeridas pela enzima.

Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose-propilenodiamino. **A** – Glicosaminoglicanos obtidos após digestão total com papaína do tecido, desidratado (1) e úmido (2). Nos dois casos pôde-se detectar condroitim sulfato e dermatam sulfato. **B** – Glicosaminoglicanos obtidos após β -eliminação de frações de DEAE – Sephacel contendo componente polidisperso de 80 – 100kDa. Em 2 e 3 o material foi tratado com condroitinases AC e ABC respectivamente. Em 1 não houve tratamento com condroitinases.

À esquerda em **A** e **B**, estão os padrões de glicosaminoglicanos: condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS) e heparam sulfato (HS). A seta indica a direção de corrida.

Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose-poliacrilamida. As bandas polidispersas correspondem a proteoglicano de alto peso molecular, sem (1) e com (2) tratamento com ácido hialurônico. Nenhuma modificação na migração do material foi observada.



Fig. 1

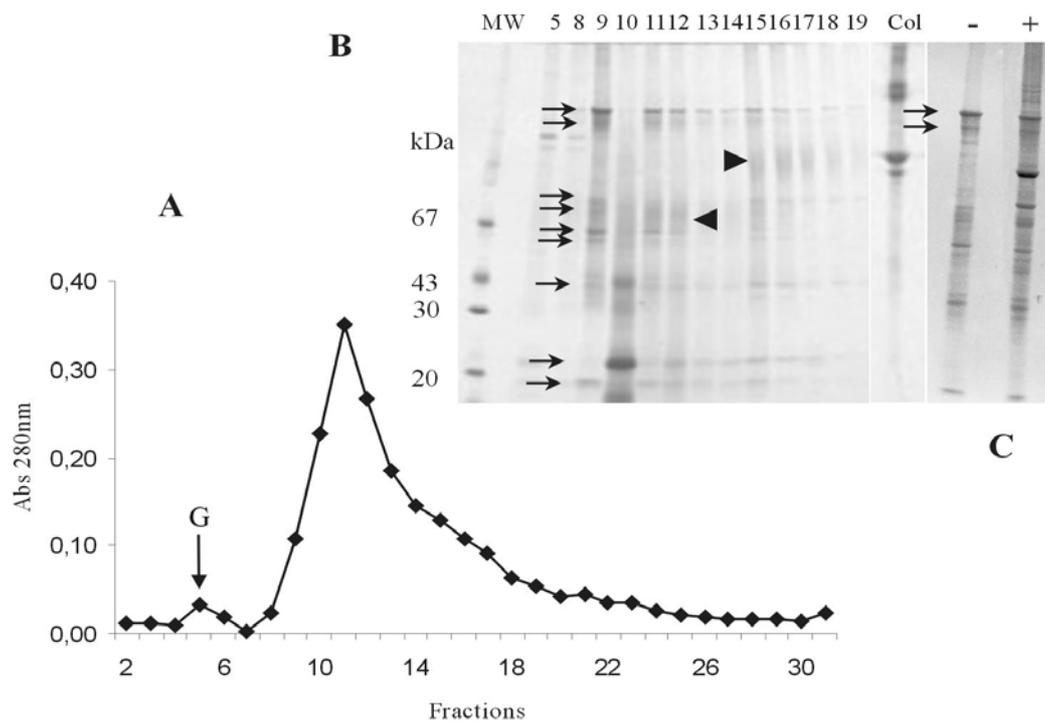


Fig. 2

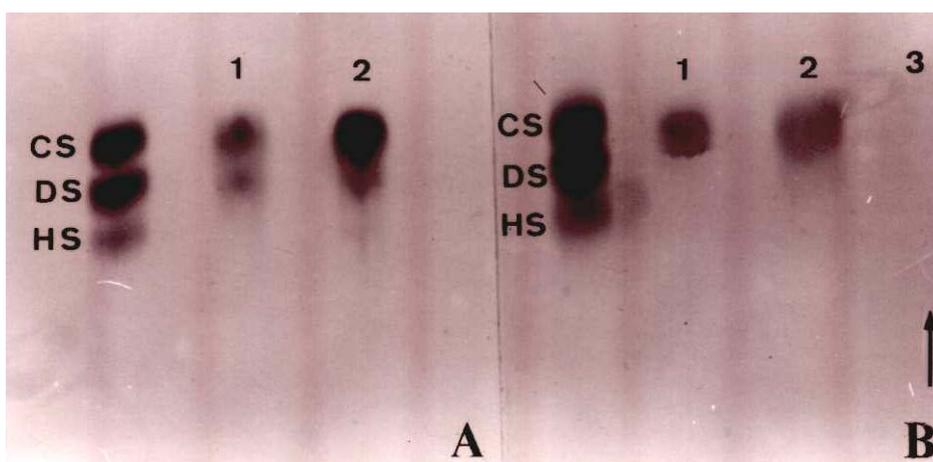


Fig. 3

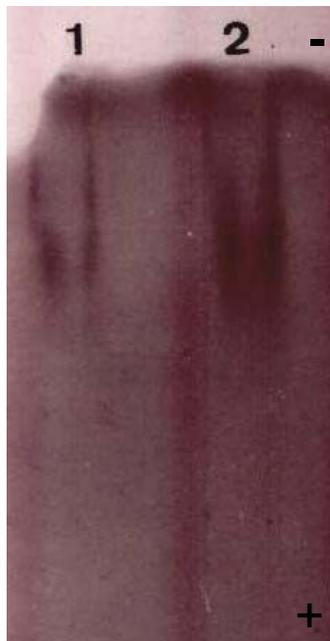


Fig. 4

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bashey, R. I., Torii, S., Angrist, A. 1967. Age-related collagen and elastin content of human heart valves. *J of Gerontology* 20: 203 - 208.
- Bashey, R. I., Bashey, H. M., Jimenez, A. S. 1978. Characterization of pepsin-solubilized bovine heart-valve collagen. *Biochem J* 173: 885 - 894.
- Birk D. E., Nurminskaya, M. U., Zycband, E. I. 1975. Collagen fibrillogenesis *in situ*: fibrils segments undergo post-depositional modifications resulting in linear and lateral growth during matrix development. *Develop Dynamic* 202: 229 - 243.
- Blum, B. , Beier, H., Gross, H. J. 1987. Improved silver staining of plant proteins RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Bichem* 72: 248 - 254.
- Brown, D. C., Vogel, K. G. 1989. Characteristics of the *In Vitro* interaction of a small proteoglycan (PGII) of bovine tendon type I collagen. *Matrix* 9: 468 - 79.
- Carvalho, H. F., Vidal, B. C. 1995. The elastic system of a pressure-bearing tendon of the bullfrog *Rana catesbeiana*. *Ann Anat* 177: 397 - 404.
- Comper, W. D. 1996. Water: Dynamic Aspects. In: COMPER, W. D. *Extracellular matrix : Molecular components and interactions*. Harwood Academic Publishers: Amsterdam. vol.2., p. 356, p. 1-21.
- Coster, L., Fransson, L. A., 1981. Isolation and characterization of dermatan sulfate proteoglycans from bovine sclera. *Biochem J* 193: 143 – 153.

- Dietrich, C. P., Dietrich S. M. C., 1976. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. *Anal Biochem* 70: 645-647.
- Evanko, S. P. & Vogel, K. G., 1990. Ultrastructure and proteoglycan composition in the developing fibrocartilaginous region of bovine tendon. *Matrix* 10: 420 - 436.
- Farndale, R. W., Buttle, D. J., Barret, A. J. 1986. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochem Biophys Acta* 883: 173-177.
- Feitosa, V. L. C., Vidal, B. C., Pimentel, E. R. 2002. Optical anisotropy of a pig tendon under compression. *J Anat* 200: 105 - 111.
- Fishbein, M. C., Levy, R. J., Ferrans, V. J. 1982. Calcification of cardiac valve bioprostheses. Biochemical, histologic, and ultrastructural observations in a subcutaneous implantation model system. *J Thorac Cardiovasc Surg* 83: 602-609.
- Fisher, L. W. 1999. Decorin. *In: Extracellular matrix, Anchor, and Adhesion Proteins.* (Kreis T., Vale R.). San Francisco, 358p. p. 241 – 254.
- Hascall, V. C., Sajdera, S. W. 1969. Protein polysaccharide complex from bovine nasal cartilage: the function of glycoprotein in the formation of aggregates. *J Biol Chem* 244: 2384 – 2396.
- Hedbom, E., Heinegård, D. 1989. Interaction of a 59kDa connective tissue matrix protein with collagen I and II. *J Biol Chem* 264: 6869 – 6905.
- Hedbom, E., Heinegård, D. 1993. Binding of fibromodulin and decorin to separate sites on fibrillar collagens. *J Biol Chem* 268: 27307 – 27312.
- Hedlund, H., Mengarelli-Widholm, S., Heinegård, D., Reinholt, F. D., Swensson, O. 1994. Fibromodulin distribution and association with collagen. *Matrix Biol* 14: 227 – 233.

- Heinegård, D., Sommarin, Y. 1987. Proteoglycans: an overview. *Methods in Enzymol* 144: 305 – 372.
- 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.
- Heinegård, D., Oldberg Å 1989. Structure and biology of cartilage and bone matrix non collagenous macromolecules. *FASEB J* 3: 2042-2051.
- Heinegård, D., Pimentel, E. R. 1992. Cartilage matrix proteins. *In: Knetner. Cartilage and Osteoarthritis*. NY. Raven Press., p. 95 – 111.
- Hocking, A., Shinomura, T., Mcquillan, D. 1998. Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. *Matrix Biol* 17: 1 – 19.
- Klaus, W., Osborn, M. 1969. The reability of molecular weigth determinations by dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 244: 4406 - 4412.
- Koob, T.J., Vogel, K.G. 1987a. Site related variations in glycosaminoglycan content and swelling properties of bovine flexor tendon. *J Orthopaed Res* 5: 414-424.
- Koob, T.J., Vogel, K.G. 1987b. Proteoglycan synthesis in organ cultures from regions of bovine tendon subjected to different mechanical forces. *Biochem J* 246: 589-598.
- Kuc, I. M., Scott, P.G. 1997. Increased diameters of collagen fibrils precipitated *in vitro* in the presence of decorin from various connective tissues. *Connec Tissue Res* 36: 287-296.
- Knudson, C. B., Knudson, W. 2001. Cartilage proteoglycans. *Cell & Develop Biol* 12: 67-78.
- Laemmli, V. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage ty. *Nature* 227: 680-685.

- Lehner, G., Fischlein, T., Baretton, G., Murphy, J. G., Reichart, B. 1997. Endothelialized biological heart valve prostheses in the non-human primate model. *Europ J Cardiothoracic Surg* 11: 493 - 504.
- Lohmander, S. 1988. Proteoglycans of joint cartilages-structure, function, turnover and role as markers of joint disease. *Barlliére's Clin Reumatol* 2: 37 – 62.
- Lovekamp, J., Vyavahare, N. 2001. Periodate-mediated glycosaminoglycan stabilization in bioprosthetic heart valves. *J Biomed Mater Res* 56(4): 478 - 486.
- Mannschott, P., Herbage, D., Weiss, M., Buffevant, C. 1976. Collagen heterogeneity in pig heart valves. *Biochim Biophys Acta* 434: 177 - 183.
- Mazon, J., Vidal, B. C., Pimentel, E. R. 2004. Distribution of proteoglycans and molecular order of collagen in pig aortic valve. *Submitted Article*.
- McDonald, P. C., Wilson, J. E., McNeill, S., Gao, M., Spinelli, J. J., Rosenberg, F., Wiebe, H., McManus, B. M. 2002. The challenge of defining normality for human mitral and aortic valves. *Cardiovasc Pathol* 11: 193-209.
- Merrilees, M. J., Flint, M. H. 1980. Ultrastructural study of tension and pressure zones in a rabbit flexor tendon. *Am J Anat* 157: 87 – 106.
- Michelacci, Y. M., Horton D.S.P.Q., 1989. Proteoglycans from the cartilage of young hammerhead shark *Sphyrna lewini*. *Comp Biochem Physiol.* 92B: 651-658.
- Oegema, T. R., 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.

- Oldeberg, A., Antonsson, P., Lindblom, K., Heinegård, D. 1989. A collagen-binding 59kDa protein (fibromodulin) is structurally related to the small interstitial proteoglycans PG-S1 and PG-S2 (decorin). *EMBO J* 8: 2601 – 2604.
- Pringle G. A., Dodd C. M. 1990. Immunoelectron microscopic localization of the core protein of decorin near the d and e bands of the tendon collagen fibrils by use of monoclonal antibodies. *J Histoche Cytochem* 38: 1405 – 1411..
- Radermecker, M. A., Limet, R., Lapiere, C. M., Nusgens, B. 2003. Increased mRNA expression of decorin in the prolapsing posterior leaflet of the mitral valve. *Interact. Cardiovasc Thorac Surg* 2: 389 – 394..
- Rothenburger, M., Volker, W., Vischer, P., Berendes, E., Glasmacher, B., Scheld, H. H., Deiwick, M. 2002. Tissue engineering of heart valves: formation of a three-dimensional tissue using porcine heart valve cells. *ASAIO J* 48: 586 – 591.
- Roughley, P. J., White, R. J., Cs-Czabor, G., Mont, J. S. 1996. Changes with age in the structure of fibromodulin in human articular cartilage. *Osteoarth cartilage* 4: 153 – 161.
- Samouillan, V., Lamurea, A., Maurel, E., Dandurand, J., Lacabanne, C., Ballarin, F., Spina, M. 2000. Characterisation of elastin and collagen in aortic bioprostheses. *Medical Biol Eng Comp* 38: 226-31.
- Scott, J. E. 1992. Supramolecular organization of extracellular matrix glycosaminoglycans, *in vitro* and the tissues. *FASEB J* 6: 2639 – 2645.
- Scott, M. J., Vesely, I. 1996. Morphology of porcine aortic valve cusp elastin. *J Heart Valve Dis* 5 (5): 464 - 471.
- Sini, P., Denti, A., Tira, M. E., Balduini, C. 1997. Role of decorin on in vitro fibrillogenesis of type I collagen. *Glycoconj J* 14: 871 – 874.

- Stegemann, H. & Stalder, K., 1967. Determination of Hidroxyproline. . *Clin Chimica Acta* 18: 267 - 273.
- Velling, T., Risteli, J., Wennerberg, R., Mosher, D.F., Johansson, S. 2002. Polimerization of type I and III collagens is dependent on fibronectin and enhanced by integrins $\alpha_1\beta_1$ and $\alpha_2\beta_1$. *J Biol Chem* 40: 37377- 37381.
- Vesely, I. 1998. The role of elastin in aortic valve mechanics. *J. of Biomech.* 31: 115-123.
- Vogel, K. J., Sandy, J. D., Pogány, G., Robbins, J. R. 1994. Aggrecan in bovine tendon . *Matrix Biol* 14: 171 – 179.
- Ye, Q., Zund, G., Benedikt, P., Jockenhovel, S., Hoerstrup, S. P., Sakyama, S., Hubbell, J. A., Turina, M. 2000. Fibrin gel as a three dimensional matrix in cardiovascular tissue engineering. *Eur J Cardiothoracic Surg* 17: 587 - 591.
- Zingales, B 1984. Analysis of protein sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. *In: Genes and antigens of parasites.* Rio de Janeiro, Fiocruz, 357-363.

CONCLUSÕES

Os folhetos apresentam 3 camadas bem distintas, 2 fibrosas e uma intermediária com característica de tecido conjuntivo frouxo.

Os feixes de colágeno altamente orientados, em sua maioria acompanham o eixo mais longo do folheto. Aparecem espessos na região de inserção da valva na parede da aorta, mas se ramificam e se entrelaçam na porção central da valva, assumindo um arranjo semelhante a um cesto.

Material birrefringente observado na camada intermediária, revela que os feixes de colágeno estão altamente orientados também nesta camada.

A metacromasia detectada ao longo dos feixes de colágeno indica que proteoglicanos estão associados a estes feixes.

Imagens de difração linear, mostram que os glicosaminoglicanos dos proteoglicanos associados aos feixes de colágeno estão posicionados paralelamente ao eixo mais longo daqueles feixes.

O padrão de “crimp” dos feixes de colágeno não é alterado pela remoção de glicosaminoglicanos.

Grandes proteoglicanos aparecem concentrados em determinadas áreas do folheto indicando existência de compressão mais intensa nestas regiões.

A matriz extracelular da valva aórtica de porco possui 8 proteínas não colagênicas com Mr de 170, 156, 85, 73, 58, 40, 24, e 18 kDa.

O componente polidisperso com Mr de 80-100 kDa, apresenta o glicosaminoglicano dermatam sulfato.

A presença de condroitim sulfato é notavelmente mais marcante do que a de dermatam sulfato.