



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Raquel Libanesa Rosario Beltré

**Distribuição de proteoglicanos e outros componentes da matriz  
extracelular em artérias normais de adultos jovens**

Rio de Janeiro

2019

Raquel Libanesa Rosario Beltré

**Distribuição de proteoglicanos e outros componentes da matriz extracelular  
em artérias normais de adultos jovens**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Eduardo M. Cardoso

Rio de Janeiro

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

B453 Beltré, Raquel Libanesa Rosário.

Distribuição de proteoglicanos e outros componentes da matriz extracelular em artérias normais de adultos jovens / Raquel Libanesa Rosário Beltré. – 2019.

76 f.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Eduardo Macedo Cardoso

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Artérias – Teses. 2. Proteoglicanos – Teses. 3. Matriz extracelular – Teses. 4. Aterosclerose – Teses. 5. Tecido conjuntivo – Teses. I. Silva, José Roberto Machado e. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.13

Bibliotecária: Thais Ferreira Vieira – CRB7/5302

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Raquel Libanesa Rosario Beltré

**Distribuição de proteoglicanos e outros componentes da matriz extracelular  
em artérias normais de adultos jovens**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 18 de fevereiro de 2019.

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Luiz Eduardo Macedo Cardoso (Orientador)  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof. Dr. Daniel Arthur Barata Kasal  
Faculdade de de Ciências Médicas – UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Luiza Bastos  
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro  
2019

## DEDICATÓRIA

Aos pacientes com doenças cardiovasculares e aqueles que encontraram a morte por causa delas. Toñito Rosario e Elsy María Rosario em memória sua.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha Família, que incentivou-me ao estudo, criando assim uma paixão pela pesquisa científica . Obrigada pelo seu apoio incondicional.

Ao Ex-diretor do Instituto Médico Legal Afrânio Peixoto o Dr. Reginaldo Franklin Pereira, aos peritos e técnicos de necropsia, pelo seu apoio para a realização do estudo.

Ao Prof. Dr. Luiz E. M. Cardoso, pela sua orientação e treinamento no escopo da ciência e pesquisa translacional .

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim e os professores do Programa de Biologia Humana e Experimental, pelos seus ensinamentos na sala de aula.

Aos meus colegas e os técnicos do Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doenças Cardiovasculares, pelo seu carinho, compreensão e ensinamentos.

Aos meus alunos de Iniciação Científica, pela gratificação de poder ensinar.

À Universidade do Estado do Rio de Janeiro, por me permitir participar de um programa de Pós-graduação de tão conceituada casa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil 001 (CAPES) pelo apoio financeiro que permitiu a realização deste projeto.

Nunca es más oscuro que cuando va a amanecer

*Desconocido*

## RESUMO

Beltré, Raquel Libanesa Rosário. **Distribuição de proteoglicanos e outros componentes da matriz extracelular em artérias normais de adultos jovens.** 2019. 76 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Embora as doenças cardiovasculares sejam a principal causa de morte no mundo, os fatores que incidem na localização das diferentes lesões ateroscleróticas ainda não são bem compreendidos. Dos componentes da matriz extracelular arterial, acredita-se que os proteoglicanos estejam envolvidos na aterogênese pela ligação das lipoproteínas plasmáticas. O nosso estudo pesquisou a distribuição de proteoglicanos e outras proteínas do tecido conjuntivo nas artérias humanas normais e sua suscetibilidade à predisposição de uma artéria para desenvolver ateroscleroses. Amostras das artérias da aorta abdominal, coronária esquerda, ilíaca comum, renal direita, e tronco pulmonar foram obtidas durante as necropsias de 15 adultos jovens, homens, com idade entre 17-28 anos e morte por acidentes. A morfometria e identificação das características das túnicas arteriais foi realizada em secções de tecidos corados com hematoxilina-eosina, tricrômico de Masson, e resorcina-fucsina de Weigert, enquanto a imunohistoquímica foi realizada usando anticorpos primários contra os proteoglicanos decorin, lumican, biglican, e versican (V1), assim como contra a fibronectina e alfa actina de músculo liso com a quantificação da intensidade da imunomarcagem pela técnica de deconvolução de cores expressada em porcentagem. A concentração total de colágeno na parede arterial foi determinada por método bioquímico. Os dados foram analisados pela one-way ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. A expressão proteica dos proteoglicanos não diferiu entre as artérias, mas variou significativamente entre as túnicas arteriais. Em todas as artérias, o decorin foi expresso principalmente na túnica adventícia. A razão íntima/média foi maior nas artérias com predisposição à aterosclerose (coronárias, aorta abdominal), em comparação com artérias com resistência ao desenvolvimento precoce (renais, tronco pulmonar). A quantidade de colágeno foi semelhante em todas as artérias. As artérias com maior susceptibilidade para o desenvolvimento de aterosclerose consistentemente tiveram espessamento da túnica íntima sem variação na expressão de proteoglicanos e outras proteínas do tecido conjuntivo.

Palavras-chave: Proteoglicanos. Espessamento. Túnica íntima. Adultos jovens. Morfologia. Artérias.



## ABSTRACT

Rosario Beltré, Raquel Libanesa. **Proteoglycans and extracellular matrix components distribution in Young adults arteries.** 2019. 76 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Although cardiovascular diseases are the main cause death globally, factors affecting the differential location of atherosclerotic lesions are still not well understood. Of the arterial extracellular matrix components, proteoglycans are thought to be involved in atherogenesis by binding plasma lipoproteins. We thus investigated whether the distribution of proteoglycans and other proteins in normal human arteries correlates with the susceptibility of a given artery to atherosclerosis. Arterial samples from the left coronary, abdominal aorta, common iliac, right renal, and pulmonary trunk were obtained during autopsy of 15 males aged 17-28 years who had died of accidents. Morphometry of arterial layers was done on tissue sections stained with hematoxylin-eosin, Masson's trichrome, and Weigert's resorcin-fuchsin, while immunohistochemistry was carried out using primary antibodies against the proteoglycans decorin, lumican, biglycan, and versican (v1), as well as against fibronectin and smooth muscle alpha-actin. Total collagen concentration in the arterial wall was determined by a biochemical method, and the intensity of immunostaining was assessed by a color deconvolution technique. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by the Holm-Sidak multiple comparisons test. Protein expression of proteoglycans did not differ among the arteries, but varied significantly between layers. In all arteries, decorin was expressed mostly in the adventitia. The intima/media ratio was much higher in atherosclerosis-prone arteries (coronary, aorta) as compared to atherosclerosis-resistant vessels (renal, pulmonary trunk). Collagen content was similar in all arteries. Arteries at a higher risk for atherosclerosis consistently have thicker intimas, whereas their proteoglycan contents do not differ from those of vessels at a lower risk.

Keywords: Arteries. Atherosclerosis. Proteoglycans. Thickening of the intima. Young Adults. Morphology.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estruturas arteriais e espessamento difuso da túnica íntima.....	22
Figura 2 –	Esquema da cascata Inflamatória e estresse oxidativo desencadeado pelo endotélio nas doenças cardiovasculares....	24
Figura 3 –	Fotomicrografia da artéria coronária esquerda com espessamento difuso da túnica íntima.....	25
Figura 4 –	Fotomicrografia da artéria renal direita com evidência da túnica adventícia de tecido conjuntivo frouxo e compacto.....	26
Figura 5 –	Gráfico da razão íntima/média.....	41
Figura 6 –	Gráfico de comparações múltiplas da razão íntima/média.....	41
Figura 7 –	Fotomicrografias das cinco artérias indicando os locais de medida para obter a razão íntima/média.....	42
Figura 8 –	Fotomicrografias das cinco artérias mostrando a distribuição das fibras elásticas.....	43
Figura 9 –	Fotomicrografias representativas das lâminas elásticas presentes nas amostras.....	44
Figura 10 –	Fotomicrografia representativa de neoíntimas.....	45
Figura 11 –	Gráfico de barras da concentração total de colágeno das artérias	45
Figura 12 –	Fotomicrografias representativas da imunomarcação para Decorin.....	49
Figura 13 –	Gráficos da análise estatística da quantificação imunohistoquímica para o proteoglicano Versican (v1).....	50
Figura 14 –	Fotomicrografias representativas da imunomarcação para Versican.....	52
Figura 15 –	Gráficos da análise estatística da quantificação imunohistoquímica para o proteoglicano Lumican.....	53
Figura 16 –	Fotomicrografias representativas da imunomarcação para Lumican.....	55
Figura 17 –	Gráficos da análise estatística da quantificação imunohistoquímica para o proteoglicano Biglican .....	56

Figura 18 – Fotomicrografias representativas da imunomarcaçãõ para o proteoglicano Biglican.....	57
Figura 19 – Gráficos da análise estatística da quantificação imunohistoquímica para a proteína alfa actina de músculo liso.....	59
Figura 20 – Fotomicrografias representativas da imunomarcaçãõ para alfa actina de músculo liso.....	60
Figura 21 – Gráficos da análise estatística da quantificação imunohistoquímica para a proteína fibronectina.....	61
Figura 22 – Fotomicrografias representativas da imunomarcaçãõ para a proteína fibronectina.....	63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados demográficos e biométricos.....	40
Tabela 2 - Componentes da matriz extracelular e a alfa actina de músculo liso das diferentes túnicas das artérias humanas normais de adultos jovens....	46
Tabela 3 - Análise comparativa dos componentes da matriz extracelular e da proteína de alfa actina de músculo liso das túnicas íntima, média e adventícia das diferentes artérias normais de adultos jovens .....	47
Tabela 4 - Análises das comparações múltiplas das túnicas arteriais.....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOR	Artéria aorta abdominal.
CA	California
Cat	Catalogo
COR	Artéria coronária esquerda.
DAB	Diaminobencidina.
DABWt	Diaminobencina ponderada.
Dif	diferença
EGRF	Fator de crescimento epidermoide
EUA	Estados Unidos de America
GAG	Glicosaminoglicano.
HDL	Lipoproteína de alta densidade.
Hip	Hidroxiprolina
ILI	Artéria Ilíaca comum direita .
LDL	Lipoproteína de baixa densidade.
PBS	Solucao trabalho
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas.
PUL	Artéria do tronco pulmonar.
REN	Artéria renal direta.
SLRPS	Proteoglicanos com núcleo pequeno rico em leucina.
SMC	Células de músculo liso vasculares.
TGF-Beta	Fator de transformação de crescimento Beta.
TLR 2	Receptor Toll Like 2
V	versão
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade.
Vs	versus

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
mL	Mililitro
cm	Centímetro
α	Alfa
~	Ao redor de
C°	Celcius
mm	Milímetros
mM	Molar
pH	coeficiente que indica o grau de acidez ou alcalinidade
v/v	Volume por volume
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxido de Hidrogenio
N°	numero
X	vezes
mg	miligrama
	menor que
	maior que
µg	micrograma
µm	micrometros
K DA	kilo Dalton

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
1	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	21
1.1	<b>Estrutura vascular arterial dos seres humanos</b> .....	21
1.1.1	<u>Túnicas arteriais</u> .....	22
1.2	Propriedades da matriz extracelular das artérias.....	26
1.3	<b>Proteoglicanos</b> .....	28
1.3.1	<u>Versican</u> .....	28
1.3.2	<u>Decorin</u> .....	28
1.3.3	<u>Biglican</u> .....	29
1.3.4	<u>Lumican</u> .....	29
1.4	<b>Proteínas de adesão</b> .....	30
1.4.1	<u>Fibronectina</u> .....	30
1.5	<b>Aterosclerose</b> .....	30
1.5.1	<u>Fisiopatologia da aterosclerose</u> .....	30
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	33
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	34
3.1	<b>Amostras arteriais</b> .....	34
3.2	<b>Processamento histológico e imunohistoquímica</b> .....	35
3.3	<b>Morfometria</b> .....	36
3.4	<b>Quantificação de coloração imunohistoquímica</b> .....	37
3.5	<b>Ensaio bioquímico para colágeno total</b> .....	38
3.6	<b>Análise estatística</b> .....	38
4	<b>RESULTADOS</b> .....	40
4.1	<b>Dados demográficos</b> .....	40
4.2	<b>Histoquímica</b> .....	40
4.2.1	<u>Morfometria</u> .....	40
4.2.2	<u>Morfologia da Lâmina Elástica Interna</u> .....	43
4.2.3	<u>Presença de Neoíntimas</u> .....	44
4.2.4	<u>Concentração Total de Colágeno</u> .....	45
4.3	<b>Imunohistoquímica</b> .....	46
4.3.1	<u>Proteoglicanos</u> .....	49

4.3.2	<u>Alfa Actina de Músculo Liso</u> .....	58
4.3.3	<u>Fibronectina</u> .....	61
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	64
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	69
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	70
	<b>ANEXO</b> .....	76



## INTRODUÇÃO

Um levantamento recente sobre dados de saúde pública mundialmente mostrou que as taxas de mortalidade devido à doença cardiovasculares têm declinado nas últimas duas décadas nos países desenvolvidos, mantendo a mesma incidência e prevalência em países em desenvolvimento (Herrington et al., 2016). Apesar desses dados, que refletem maior conhecimento populacional sobre a doença, globalmente o infarto do miocárdio ainda é uma das principais causas de morte (Yusuf et al., 2014).

A aterosclerose tem fatores de risco bem conhecidos, os quais envolvem principalmente história familiar, hipertensão arterial, tabagismo, e níveis elevados de lipoproteínas plasmáticas de baixa densidade (LDL) (Rudolf & Lewandrowski, 2014). Um fator crucial na aterogênese é também a disfunção endotelial, a qual precede a formação da placa de ateroma, e está associada a um aumento da permeabilidade para lipoproteínas e à aderência e migração de células T e monócitos para o interior da túnica íntima (Matsuzawa & Lerman, 2014).

Uma das principais características da doença é de fato a infiltração de LDL para o interior da túnica íntima da parede arterial (Sakakura et al, 2013), o que provavelmente é facilitado pela disfunção endotelial (Matsuzawa & Lerman, 2014). A molécula de LDL entra assim em contato com a túnica íntima arterial, que contém uma matriz extracelular frouxa e enriquecida em proteoglicanos intersticiais (Borén & Williams, 2016).

Os proteoglicanos são glicoconjugados complexos que contêm uma cadeia central proteica e pelo menos uma cadeia lateral de um polissacarídeo denominado glicosaminoglicano (GAG). Nesses polissacarídeos, a unidade monomérica é um dissacarídeo que contém uma hexosamina e, na maioria das vezes, um ácido hexurônico. Esse dissacarídeo em geral possui um grupamento carboxila e quantidades variáveis de grupamentos sulfato, os quais conferem assim aos GAG uma alta densidade de cargas aniônicas. Variações específicas nessas estruturas químicas definem os diferentes tipos de GAG, como hialuronan, condroitim sulfato, dermatan sulfato, e heparan sulfato. Os proteoglicanos são expressos em todos os tipos de matriz extracelular, e sua parte proteica contém, por sua vez, quantidades variáveis de domínios de adesão. Os proteoglicanos têm, dessa forma, grande

capacidade de interações específicas com o meio circundante, e suas funções fisiológicas são basicamente decorrentes dessa propriedade. Devido a esse envolvimento de proteoglicanos e GAG com a biologia celular dos tecidos, as alterações na expressão e estrutura dessas moléculas estão associadas a diversas disfunções e ao desenvolvimento de patologias (Bertassoni & Swain, 2014).

Vários estudos histológicos têm mostrado que esses proteoglicanos na túnica íntima estão associados com a lesão aterosclerótica em humanos (Gutierrez et al., 1997; Fukuchi et al., 2002; Nakashima et al., 2007). Esses proteoglicanos possuem cadeias laterais de condroitim sulfato ou dermatan sulfato, as quais se ligam especificamente à LDL através de interações iônicas (Cardoso & Mourão, 1994).

A retenção de LDL na túnica íntima que se infiltra pelo endotélio, ou através dos vasa vasorum que penetram a túnica íntima espessada na suas camadas mais profundas, facilita a subsequente oxidação desta lipoproteína. Esses eventos dão início a uma complexa reação inflamatória na parede arterial, a qual por sua vez leva à formação da placa de ateroma (Khalil et al., 2004; Galkina & Ley, 2009; Fogelstrand & Borén, 2012; Tabas et al., 2007; Skalen et al., 2002; Ross R, 1999; Subbotin 2016).

Fatores regulatórios secretados nessa reação inflamatória, tais como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de transformação do crescimento beta (TGF-beta) não apenas aumentam a expressão de proteoglicanos na túnica íntima, mas também estimulam a elongação da cadeia de GAG. Essas cadeias também podem ter seus padrões de sulfatação modificados (Cardoso et al., 2010). Vale notar que, in vitro, cadeias mais longas de GAG têm maior afinidade por LDL (Cardoso & Mourão, 1994). Portanto, a reação inflamatória aumenta a aterogenicidade da túnica íntima.

Em humanos, os proteoglicanos versican, biglican e decorin têm localizações específicas na parede arterial normal e nas lesões ateroscleróticas. Por exemplo, nas coronárias de adultos jovens e idosos, o versican está mais localizado em áreas de maior densidade de células de músculo liso, incluindo a capa fibrosa, trombos, e em locais de áreas ricas em lipídeos das placas mais avançadas. Esse proteoglicano também é encontrado em áreas de tecido conjuntivo frouxo. Biglican tem uma distribuição semelhante, porém se expressa no interior das áreas lipídicas das placas avançadas, e está ausente nos trombos. Decorin, que pertence ao grupo do biglican (*small leucine-rich proteoglycans*), tem expressão semelhante a este

proteoglicano, mas está ausente em áreas mixóides da placa e tem marcação diminuída no espessamentos da túnica íntima (Gutierrez et al., 1997).

Em outro estudo utilizando artérias coronárias, mostrou-se que, em fases iniciais da aterogênese, o decorin e o biglican se localizam, juntamente com lipídeos extracelulares, na camada mais externa da túnica íntima (Nakashima et al., 2007).

Em humanos, um espessamento difuso e fisiológico da íntima ocorre antes do aparecimento da placa de ateroma, principalmente em artérias com maior susceptibilidade para o desenvolvimento de doença aterosclerótica. Essas alterações geralmente não são encontradas em modelos animais (Nakashima et al., 2008). Nas artérias coronárias, esse espessamento pode apresentar acúmulo de lipídeos, mas com pouca marcação para GAG sulfatados e o decorin (Fukuchi et al., 2002).

Em um importante estudo realizado em primatas (*Macaca nemestrina*), os fatores de crescimento PDGF e TGF-beta tiveram imunomarcação intensa em áreas onde se localizavam decorin, biglican, e versican, tanto em lesões intermediárias como avançadas da aorta. Além disso, a intensidade da marcação desses proteoglicanos variava com o estágio da lesão e a proximidade com os fatores de crescimento (Evanko et al., 1998). Esses resultados mostram, assim, a importância desses fatores inflamatórios no metabolismo de proteoglicanos durante a aterogênese, e confirmam diversos dados obtidos in vitro.

Os diversos dados discutidos acima evidenciam o papel crucial dos proteoglicanos arteriais na fisiopatologia da aterosclerose. Além disso, resultados de imunohistoquímica e bioquímica em humanos, tanto em artérias normais (Cardoso & Mourao, 1994; Talusan et al., 2005) quanto em lesões ateroscleróticas (Gutierrez et al., 1997; Evanko et al., 1998; Denswil et al., 2016), mostram que a localização específica dos diferentes tipos de proteoglicanos, tanto na placa de ateroma quanto em diferentes localizações anatômicas, também é importante para o entendimento da aterogênese. Entretanto, em humanos, o conhecimento da localização histológica de proteoglicanos está restrito às coronárias e, em poucos casos, à aorta. Além disso, a maioria desses dados são oriundos de pacientes idosos e com comorbidades associadas.

A hipótese geral do estudo é de que variações estruturais e bioquímicas entre as diversas artérias, inerentes à suas características morfológicas e a adaptações

hemodinâmicas, atuam como fatores associados ao desenvolvimento de lesões ateroscleróticas.

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1- Estrutura vascular arterial dos seres humanos

São conhecidos como artérias aquelas que histologicamente possuem túnicas concêntricas separadas entre elas por lâminas limitantes interna e externa e um lúmen arterial.

Todas as artérias que foram utilizadas no estudo contêm três túnicas, a túnica íntima, a túnica média e a túnica adventícia. Estas camadas estão separadas entre elas, na maioria das artérias, por uma estrutura conformada por fibras elásticas. Estas estruturas são denominadas lâminas limitantes, a limitante interna delimita a túnica íntima da túnica média e, a externa faz a delimitação da túnica média com a túnica adventícia (figura 1-a) estando esta última, muitas vezes, ausente.

Cada uma de estas camadas tem particularidades que influenciam diretamente na função e comportamento perante às diversas patologias vasculares. Por exemplo, as túnicas médias que contenham mais fibras de origem elásticas estarão presentes em locais em contato com maior pressão hidrostáticas, como no caso das artérias aorta (Townsend, 2013) e ilíacas. Aquelas aonde o fluxo arterial é menor e a sua pressão hidrostática deve ser regulada conjunto ao sistema nervoso autônomo, são ricas em células musculares lisas, sendo o caso das artérias coronárias e as renais. Estas classificações estão caracterizadas pelos componentes mais abundantes na túnica média e que são conhecidos como artérias elásticas e musculares respectivamente.

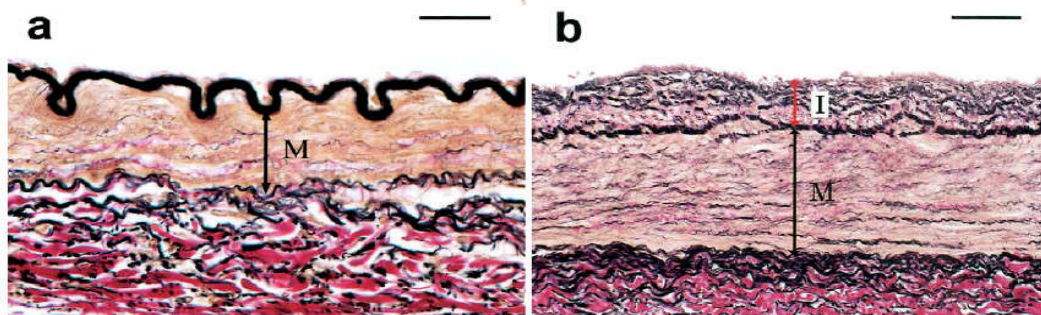
Já que nossa pesquisa parte de que, todas as artérias coletadas eram de pessoas sem patologias cardiovasculares aparentes e com morte por motivos não decorrentes de qualquer outra patologia de origem vascular, direcionaremos a revisão de literatura para as características próprias das túnicas que foram encontradas no nosso estudo, descrevendo algumas das estruturas morfológicas destes vasos.

### 1.1.1- Túnicas arteriais

A túnica íntima é uma estrutura avascular que faz parte da parede arterial mais interna descrita comumente como uma linha de células endoteliais enfileiradas em contato com a lâmina limitante interna (lâmina elástica interna) e com uma escassa matriz extracelular frouxa rica em proteoglicanos e proteínas de adesão. A definição antes exposta tem mudado através dos anos, com as novas pesquisas na área morfológica das artérias que mostra a variabilidade das suas paredes atreladas as diferentes funções hemodinâmicas.

Tem sido controverso durante décadas a especificação de considerar como adaptação fisiológica e não uma patologia da túnica íntima a presença de várias camadas de fibras elásticas, fibras colágenas e células musculares lisas, conformando uma túnica mais espessada produto dos eventos hemodinâmicos do meio, tais como o estresse ou dano endotelial (Nakashima et al., 2002; Subbotin, 2016). Este espessamento não possui características inflamatórias de deposição de outras moléculas que falariam a favor do início de doença aterosclerótica (figura 1).

Figura 1- Estruturas arteriais e espessamento difuso da túnica íntima



Legenda: a) - artéria coronária direita de uma menina de 5 anos, b) espessamento difuso da artéria coronária descendente anterior esquerda de uma menina de 7 anos. As barras de escala na imagem a e b representam 25  $\mu\text{m}$  e 50 $\mu\text{m}$  respectivamente. *I* íntima, *M* média.

Fonte: Adaptado de Nakashima et al., 2002

Na figura acima, a fotomicrografia (a) mostra a conformação da túnica íntima caracterizada por uma camada de células endoteliais em estreito contato com a lâmina limitante interna. Esta lâmina tem uma configuração estrutural contínua e engrossada (linha tortuosa na cor preta). Este tipo de conformação das túnicas arteriais são descritas usualmente nos livros e pesquisas. No entanto, na imagem (b) é apresentada uma fotomicrografia da artéria coronária com uma túnica íntima espessada difusamente, com a presença de várias fibras elásticas e outros componentes do tecido conjuntivo. Essas amostras são de seres humanos com dois anos de diferença entre as idades o que fala a favor de que, o espessamento da túnica íntima é insidioso, aparece nos primeiros anos de vida e evolui ao longo dos anos ( Mikko et al., 2001).

Este espessamento da túnica íntima tem sido alvo de inúmeras pesquisas e teorias. É considerado pelo consenso de 1992 da *American Heart Association* como uma adaptação fisiológica e não progressiva, classificado como tipo I (Stary et al., 1992), sendo que no ano de 2000, Virmani e colaboradores reclassificaram este tipo de lesão como no aterosclerótica descrevendo-a como o acúmulo normal de células musculares lisas na ausência de deposição de ácidos graxos, células do sistema imune ou células espumosas (macrófagos).

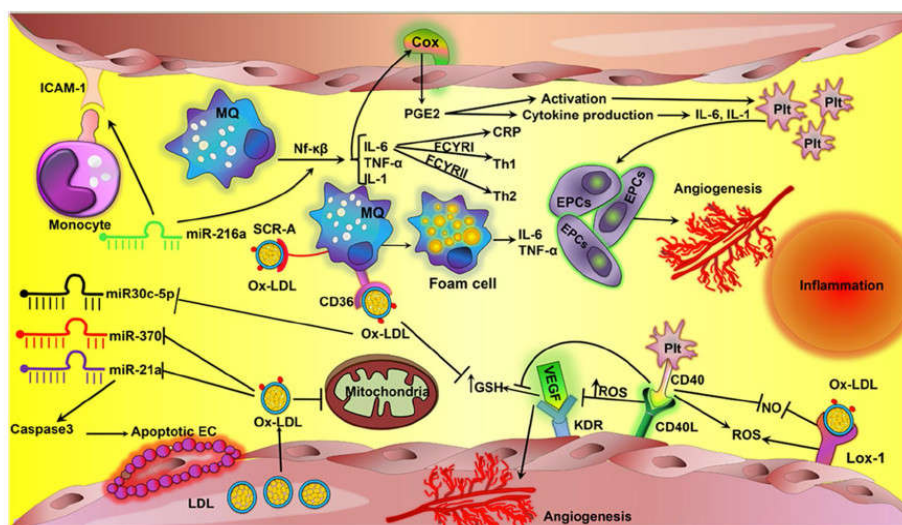
Estes parâmetros de classificação são aplicados a cada lesão da túnica íntima que não obedeça o padrão clássico da túnica íntima descrito anteriormente. Uma das perguntas feitas em diversos estudos é ao respeito do porquê do desenvolvimento do espessamento, seja este difuso ou excêntrico, e a sua distribuição nas diferentes artérias.

Alguns estudos reconhecem as células endoteliais e sua disfunção como as precursoras desta lesão (Haybar et al., 2018). Este tipo celular é encarregado de manter a estrutura vascular, produzindo vasodilatadores (óxido nítrico) e constritores como a endotelina. Esta estrutura celular além de evitar a agregação plaquetária, regulariza o tônus vascular.

É sabido que nas condições normais as células endoteliais não expressam fatores nem trombogênicos e nem de angiogênese. Após a camada de células endoteliais sofrer algum tipo de lesão estrutural, seja por mecanismos hemodinâmicos, fatores de expressão da matriz (proteína Angiopoetina-2 *like*, Endocan, Lisofosfolípídeos) ou substâncias externas presentes no sangue (arsênico, produtos da fumaça do cigarro ou poluição do ar), estas células perdem a sua

funcionalidade e é desencadeada uma cascata de fatores pró-inflamatórios, de angiogênese e de migração celular vindo do sistema imunológico ou das células musculares lisas adjacentes à túnica íntima (Figura 2).

Figura 2- Esquema da cascata Inflamatória e estresse oxidativo desencadeado pelo endotélio nas doenças cardiovasculares.



Legenda: Mecanismos inflamatórios e de estresse oxidativo na doença cardiovascular. Quando é ativada a via do fator Nuclear Kappa B, os macrófagos liberam interleucinas pró-inflamatórias que promovem a proteína c reativa. MQ macrófagos; ICAM-1 molécula de adesão intercelular-1; COX Ciclooxygenase; NF-κB fator nuclear Kappa beta; Th1, 2 T Helper; PGE2 Prostaglandinas E2; EPCs, células progenitoras endoteliais; SCR-A receptor scavenger A; ox-LDL lipoproteína de baixa densidade oxidada; GSH Glutathiona; ROS espécies reativas do oxigênio; NO óxido nítrico; LOX-1 receptor oxidado de LDL tipo lectina-1; KDR domínio do receptor de kinase

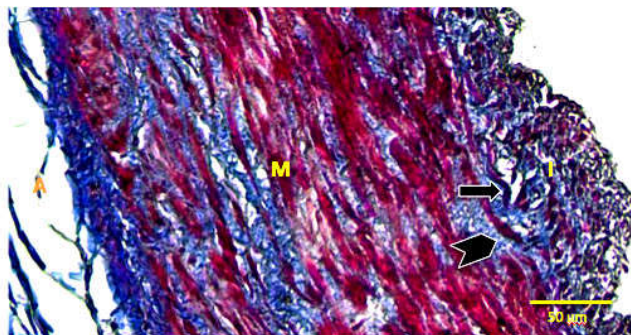
Fonte: Adaptado Haybar et al., 2018

Logo após da migração das células musculares lisas ao local, estas perdem a sua polaridade e funcionalidade e passam a secretar fatores que promovem a adesão de certas proteínas, além de ser precursoras da produção de uma matriz extracelular rica em colágeno do tipo I e III (Figura 3). Quando este ciclo de lesão e cicatrização é perpetuado, é desenvolvido o espessamento difuso da túnica íntima que está submetida à diversos estressores da mecânica hemodinâmica (óstios e bifurcações). O tipo de espessamento excêntrico da túnica íntima aparece com



maior frequência nos ramos terminais e este vai progredindo até causar lesões ateroscleróticas (Forte et al., 2012).

Figura 3- Fotomicrografia da artéria coronária esquerda com espessamento difuso da túnica íntima.

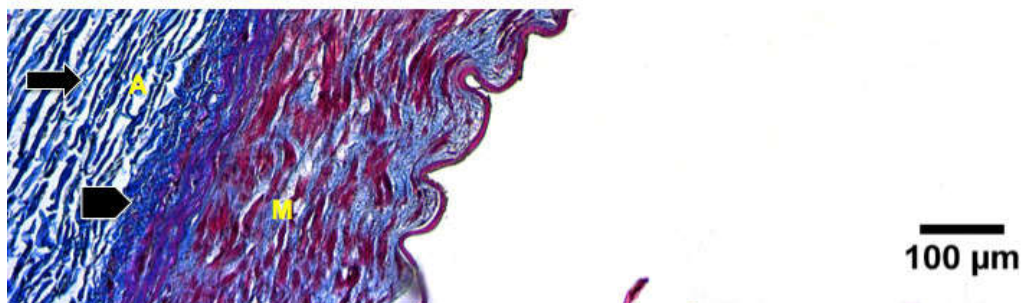


Legenda: Artéria coronária esquerda com evidência de espessamento da túnica íntima com células musculares lisas (seta) e migração de células musculares lisas da túnica média para a túnica íntima ( cabeça de seta). A coloração de tricrômico de Masson mostra a matriz de fibras colágenas em azul intenso e as células musculares lisas em vermelho no aumento de 200x. A= Adventícia, M= Média, I= Íntima.

Fonte: A Autora, 2018.

No caso da túnica adventícia, esta é considerada como a túnica mais externa composta por tecido conjuntivo frouxo rico em fibras colágenas. Este tecido possui a *vasa vasorum* (as artérias que nutrem as túnicas das arteriais), as veias que drenam o local e a inervação feitas por feixes de nervos do sistema autônomo. Além de possuir as características antes descritas, a túnica adventícia possui células de tecido adiposo, macrófagos e receptores próprios do local. (Oikonomous, E. & Antoniadis C., 2018) que podem influenciar na dinâmica vascular. Outros autores (Tonar et al., 2016; Kim et al., 2015), classificam a túnica adventícia em duas subdivisões, uma mais compacta aderida às lâminas elásticas externas ou células musculares lisa da túnica média (figura 4), e outra com uma composição de tecido conjuntivo mais frouxa contendo a *vasa vasorum* e demais componentes já mencionados.

Figura 4- Fotomicrografia da artéria renal direita com evidência da túnica adventícia e tecido conjuntivo frouxo e compacto.



Legenda: Na túnica adventícia é encontrado um tecido conjuntivo frouxo (seta) precedido por um tecido de fibras colágenas mais compacto (cabeça de seta) estreitamente unido à túnica média. Este padrão de distribuição foi evidente em todas as amostras do estudo, sendo nas artérias coronária e tronco pulmonar a presença frequente de tecido adiposo na camada mais frouxa. Coloração de tricrômico de Masson. A= Adventícia, M= Média.

Fonte: A Autora, 2018.

## 1.2- Propriedades da matriz extracelular das artérias

A matriz extracelular das túnicas arteriais está composta basicamente de elastina, proteínas de microfibrilas de fibras elásticas, fibrilina associada a glicoproteínas, fibulinas, os colágenos vasculares, proteoglicanos, entre outras. Este conjunto de proteínas mantêm a mecânica da complacência arterial necessária para as mudanças hemodinâmicos e a preservação da estrutura vascular (Wagenseil J. & Mecham R.,2009).

A elastina é uma das proteínas mais abundantes no meio vascular. É importante diferenciar entre os termos elastina, com uma aparência amorfa, e a fibra elástica já que, esta última é uma associação de elastina com microfibrilas de fibras elásticas com uma estrutura bem definida e que podemos observar inclusive nas fotomicrografias do estudo. A elastina é encontrada só nos vertebrados, ela é decodificada por um gene composto por 34 exons. Este gene decodifica a proteína protoelastina, sendo uma das proteínas de matriz extracelular em expressar-se prematuramente. A proteína de microfibrilas de fibras elásticas, um tipo de fibrilina, é a primeira em aparecer na matriz extracelular para a formação de fibras elásticas o que é quase impossível de encontrar elastina sem microfibrilas.

As fibrilinas são glicoproteínas de um peso aproximada de 350-kDa, com domínios para o fator de crescimento epidermóide dependente de cálcio o que proporciona uma rede de sustentação para a conformação das fibras elásticas pela união das proteínas tropoelastinas (Burton AC., 1954). A mutação dos seus genes leva ao desenvolvimento da Síndrome de Marfan, no caso da fibrilina-1. As microfibrilas associadas a glicoproteínas também são necessárias para a formação das estruturas constituídas por elastina e a sua deficiência pode levar a atraso no desenvolvimento vascular embrionário.

Outro componente da matriz extracelular são as fibulinas, estas estão presentes nos tecidos elásticos promovendo a integridade endotelial em mamíferos. Nos seres humanos as mutações nos genes que codificam esta proteína apresentam a doença autossômica recessiva da *Cutis Laxa*.

Uns dos componentes da matriz extracelular que teve importância no estudo foi o colágeno vascular e os proteoglicanos. Os colágenos mais abundantes são os tipos : I, III, IV, V e VI. Os colágenos do tipo I e III tem uma distribuição variável que dependerá da localização específica. Por exemplo, na aorta ascendente os colágenos do tipo I e III estão distribuídos mais amplamente na túnica média e adventícia.

Os proteoglicanos são descritos como moléculas que possuem um núcleo proteico e que um glicosaminoglicano (GAGs) unido por enlaces covalentes. Estes são classificados segundo o tipo de GAG que possuam. Estes GAGs podem ser condroitim sulfato e dermatan sulfato, compostos por dissacarídeos em repetição de galactossamina e ácido idurônico, a Heparina e heparan sulfato, constituídos por dissacarídeos de glucosamina e por último o keratan sulfato, constituído por dissacarídeos de glucosamina e galactose.

Existe uma ampla distribuição de proteoglicanos nas paredes arteriais sendo duas classes de proteoglicanos as que têm maior expressão: aqueles que interatuam com o ácido hialurônico (polímero linear composto por dissacarídeos de ácido glucurônico e *n*-acetilglucosamina) e aqueles com um núcleo pequeno rico em leucina, conhecidos como o *small leucine-rich proteoglycans* (SLRPs), (Iozzo & Schaefer, 2010) .

### 1.3- Proteoglicanos

#### 1.3.1- Versican

Este proteoglicano é considerado como o mais abundante nas paredes arteriais, tendo uma expressão tecidual reduzida na ausência de patologias. Suas funções vão desde promover adesão, proliferação e migração celular e quando expresso em grande quantidade, este diminui a expressão de elastina possivelmente pela presença do condroitim sulfato dos seus GAGs (Hinek A. et al.,1988). Este proteoglicano possui várias isoformas que variam no peso molecular dos seus núcleos e nas cadeias de GAGs que expressam, sendo a V0 e a V1 as mais abundantes nas diferentes doenças. Estas isoformas estão vinculadas à expressão sob diversas situações, sejam elas patológicas ou fisiológicas. Este proteoglicano tem uma carga negativa associada a suas cadeias de GAGs, o que facilita a interação com a fibronectina e a água, além de agir como reservatório de citosinas e fatores de crescimento que serão utilizadas em diversos momentos dos processo vasculares para controlar a atividade celular (Wight et al., 2014).

#### 1.3.2- Decorin

Faz parte da família denominada de *Small rich-leucine proteoglycans* (SRLPs) por possuir um núcleo rico em leucina enfileirada e um peso molecular de 36-42 kDa, semelhante ao lumican e o biglican. Este possui cadeias de GAGs de condroitin e dermatan sulfato, o que faz que pertença à família do tipo I de proteoglicanos. Este tem como função regular a fibrillogênese do colágeno, seu *turnover* (Marzoll et al., 2011) e a adesão do fator TGF-beta. Este proteoglicano é encontrando usualmente na adventícia das artérias normais pela sua função na sinalização para evitar a fibroses e fatores proliferativos interagindo diretamente com o receptor para o fator de crescimento epidérmico (EGFR). Ele é capaz de ativar a caspase-3 envolvida na morte programada celular induzindo à apoptose. Nas células endoteliais o Decorin

promove a adesão às fibras colágenas, a degradação da matriz extracelular e a migração de células do sistema imunológico (Iozzo & Schaefer, 2010).

### 1.3.3- Biglican

Este proteoglicano possui as características estruturais descritas antes (membro da família do tipo I), tendo funções de sinalizar moléculas específicas da imunidade inata, interagindo com os receptores *Toll Like* (TLR-2 e 4) dos macrófagos o que não requer de outras vias para a resposta pró-inflamatória (Nastasse et al., 2012). Quando os macrófagos estão ativados por citosinas pró-inflamatórias, é gerado o biglican, tendo uma maior associação às fibras elásticas, iniciando assim a resposta inflamatória com o recrutamento de células *natural killer* CD16(-). A sua interação com certos fatores próprios da inflamação induz a maturação das caspase -1 e a pró-interleucina 1 beta (Iozzo & Schaefer, 2010).

### 1.3.4- Lumican

Rico em sulfato de tirosina este proteoglicano pertence à família do tipo II dos SRLPs. O peso molecular do seu núcleo varia de 4-175 k-Da. Usualmente localizado nas partes mais externas da túnica média e da adventícia de artérias coronárias humanas normais (Onda M. et al., 2002), este participa ativamente na homeostase da matriz extracelular e, na expressão e migração de fibroblastos que expressam alfa actina de músculo liso (Karamanou et al., 2018). O lumican inibe o crescimento de células tumorais em ágar suave. Sua deficiência promove a formação de queratinócitos estromais e fibroblastos embrionários que podem afetar o mecanismo de adesão local. Este quando secretado pelas células endoteliais, promove a migração de neutrófilos via integrinas o que ajuda promover a reação inflamatória localizada (Iozzo & Schaefer, 2010).

## 1.4- Proteínas de adesão

### 1.4.1- Fibronectina

A fibronectina é uma proteína composta por um dímero que possui duas subunidades com um peso molecular de aproximadamente 250 k-Da. Cada um de seus monômeros tem três tipos de unidades. A tipo I tem 12 repetições e está composta por 40 aminoácidos unidos por duas ligações de sulfato. A tipo II tem 15-17 repetições e uma conformação de 60 aminoácidos com duas ligações de sulfatos e, a tipo III possui 90 repetições sem ligações de sulfatos (Pankov & Yamada, 2002).

Esta proteína é abundante no plasma na sua forma solúvel (produzido pelos hepatócitos) e na matriz extracelular na sua forma insolúvel. Esta última tem uma estrutura maior e mais heterogênea que pode alterar a composição da matriz extracelular quando necessário. A fibronectina pode interagir com os receptores das famílias das integrinas promovendo a adesão celular. Esta pode unir-se às moléculas de heparina, colágeno/gelatina e fibrinas. Estes domínios para heparina interagem com o heparan sulfato e condroitina dos proteoglicanos e outros GAGs (Yamada & Clark, 1996).

## 1.5- Aterosclerose

### 1.5.1- Fisiopatologia da aterosclerose

A aterosclerose é uma doença arterial de curso crônico e que tem o maior índice de mortalidade nos tempos modernos. Esta é desenvolvida ao longo da vida insidiosamente com uma vinculação estreita com o metabolismo do colesterol e das lipoproteínas (Barr A., 2018). As moléculas de colesterol são insolúveis em água, portanto, precisam de configurações próprias para o transporte plasmático tais como os quilomicrons, a lipoproteína de muito baixo densidade (VLDL), a lipoproteína de

baixa densidade (LDL) e a lipoproteína de alta densidade (HDL), todas estas baseadas no seu tamanho, a proteína que possui e sua composição lipídica.

Quando as gorduras são digeridas e absorvidas em forma de quilomicrons pelo intestino estes recebem varias apoproteínas para o seu transporte. Estas são apo B-48, apo A I, apo A II, apo C-II e a apo E. Quando estes estão na circulação em forma de triglicerídeos plasmáticos, as células endoteliais os degradam com a lipase para lipoproteína e os separa em ácidos graxos e glicerol. O LDL é o encarregado de levar o colesterol às células para sua integração à membrana plasmática e para a síntese de esteróides tendo na sua superfície a apo-100.

Quando ocorre a disfunção endotelial e são expressos os fatores descritos antes, é iniciada a retenção de LDL por vários mecanismos na túnica íntima das artérias (Fukuchi et al. 2002), que é oxidado desencadeando a via de estresse oxidativo. Estes mecanismos ativam a migração de células T e macrófagos do sistema imune, estes últimos, fazem a fagocitose dos ácidos graxos convertendo-se em células espumosas. A mediação por vários fatores proinflamatórios ativa a produção de matriz extracelular, a proliferação e migração das células musculares lisas, conformando uma das primeiras lesões da classificação de aterosclerose (Stary et al., 1992). Esta classificação foi atualizada em 2002 (Virmani et al., 2002) para evitar as constantes discrepâncias na identificação da morfologia das lesões e seus componentes em:

Lesões da túnica íntima não ateroscleróticas:

- a) Espessamento da túnica íntima: a concentração normal de células musculares lisas no local em ausência de deposição de ácidos graxos ou células espumosas.
- b) Xantoma da túnica íntima ou *Fatty Streak*: concentração luminal de células espumosas sem núcleo necrótico ou capa de fibrose. Estas lesões podem regredir.

Lesões ateroscleróticas progressivas:

- a) Espessamento patológico da túnica íntima: presença de células musculares lisas com uma matriz extracelular rica em proteoglicanos com locais de deposição de lipídeos sem área de necrose.
- b) Erosão: Trombose luminal, sem comunicação entre o trombo e o núcleo necrótico.

- c) Ateroma com uma capa de fibrose fina: presença de uma capa de fibrose fina acima do núcleo necrótico infiltrada por macrófagos e linfócitos, com raras células musculares lisas.
- d) Ruptura da placa ateromatosa: ruptura da capa que cobre o fibroateroma, com presença de comunicação entre o trombo luminal e o núcleo necrótico.
- e) Nódulo calcificado: calcificação com forma eruptiva e nodular com presença de placa fibrocalcificada embaixo.
- f) Placa fibrocalcificada: placa rica em colágeno com poucas células inflamatórias e possibilidades de encontrar ainda o núcleo necrótico.

Em outras pesquisas foram feitas outras classificações para este tipo de lesões já que, em muitas ocasiões não era evidente as características morfológicas, levando a classificações clínicas e histopatológicas da doença aterosclerótica nas artérias coronárias (Otsuka et al.,2014), aonde descrevem as lesões coronarianas sem muitos lipídeos, sendo a erosão da placa responsável pelos eventos clínicos. Usualmente estas lesões não possuem uma capa de fibrose fina, não tendo uma remodelação positiva sem obstrução crítica do lúmen da artéria. Até hoje continuam as diferenças entre várias teorias sobre a gênese da doença, a sua classificação e o possível manejo com novas técnicas não invasivas.



## 2 OBJETIVOS

O objetivo principal deste estudo foi identificar o padrão de distribuição histológica de proteoglicanos e outros componentes da matriz extracelular tais como, fibronectina e alfa actina de músculo liso, nas três túnicas arteriais, íntima, média e adventícia, de diversas artérias sem patologias evidentes de adultos jovens falecidos por morte acidentais. Foram incluídas artérias que, segundo a literatura (Robert et al., 1959), apresentam diferentes graus de susceptibilidades ao desenvolvimento de aterosclerose para investigar a distribuição de alguns componentes moleculares vinculados à doença na parede de cada uma destas artérias.

Após a obtenção dos segmentos de artérias com diferentes graus de predisposição para o desenvolvimento de aterosclerose foram identificadas a localização dos proteoglicanos versican, decorin, biglican e lumican pela marcação imunohistoquímica.

Também foi identificada a distribuição de fibras de músculos liso e fibras elásticas e a proteína de adesão fibronectina das túnicas da parede arterial utilizando métodos histológicos e imunohistoquímicos, além de mensurar a espessura das túnicas íntima e média para obter uma razão que ajudaria na classificação do espessamento da túnica íntima presente nas das diversas artérias. Para verificar se a presença e quantidade de colágeno influenciava no risco para o desenvolvimento de aterosclerose foi quantificado por método bioquímico o total de colágeno presente nessas artérias.

### 3- MATERIAL E MÉTODO

As autorizações oficiais para coleta de amostras arteriais foram obtidas de órgãos governamentais apropriados, e o projeto recebeu aprovação do comitê de ética local em experimentação com seres humanos (Hospital Universitário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, aprovação no 2.612.067).

#### 3.1- Amostras arteriais

Amostras macroscopicamente normais, foram obtidas durante a necropsia de 15 adultos com idades entre 17 e 28 anos com morte acidentais no período de 4 meses do ano 2017. Devido ao tamanho limitado e diverso das amostras, e das diferentes sensibilidades dos métodos utilizados, o número real de amostras variou de acordo com o experimento e é indicado quando apropriado. Cadáveres com período pós-morte maior que 8-12 horas, evidências macroscópicas de doenças metabólicas e índice de massa corporal fora do intervalo de 18,5 a 24,9 não foram incluídos no estudo. Amostras foram coletadas de cinco diferentes artérias, classificadas de acordo com sua suscetibilidade a lesões ateroscleróticas, utilizando dados de Roberts et al. (1959). As localizações anatômicas dos espécimes de tecido são as seguintes:

2.1.1- Alta suscetibilidade: (a) artéria coronária esquerda (COR), no ponto médio entre sua origem na aorta e a bifurcação de seus ramos circunflexo e interventricular anterior; e (b) aorta abdominal (AOR), no ponto médio entre a raiz da artéria mesentérica inferior e a bifurcação das artérias ilíacas comuns .

2.1.2- Suscetibilidade moderada: (a) Artéria ilíaca comum, no ponto médio entre sua origem na aorta abdominal e a bifurcação das artérias ilíacas externa e interna (ILI).

2.1.3- Baixa susceptibilidade: (a) Artéria renal direita, no ponto médio entre sua origem na aorta abdominal e a ramificação da artéria suprarrenal inferior (REN); e (b) Tronco pulmonar, no ponto médio entre a valva pulmonar e a bifurcação das artérias pulmonares direita e esquerda (PUL).

As amostras teciduais foram fixados em formalina tamponada neutra a 4% imediatamente após a excisão durante a necropsia, constituindo a circunferência total (segmento de ~ 7-10 mm) (REN, ILI, COR) ou num fragmento de parede (~ 10x10 mm) (AOR , PUL) da artéria. As amostras cobriram toda a profundidade das paredes arteriais, com a localizados o mais longe possível dos óstios e das ramificações, sem presença macroscópicas de estrias gordurosas.

### 3.2- Processamento histológico e imunohistoquímica

Cortes arteriais de 5 mm de espessura foram emblocados em Paraplast Plus (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) perpendicularmente ao eixo do lúmen do vaso, e foram rotineiramente processados para histologia e cortados com uma espessura de 5  $\mu$ m para histoquímica (hematoxilina e eosina, tricrômico de Masson e resorcina-fucsina de Weigert). Para a imunohistoquímica as secções de tecido foram desparafinadas, hidratadas e lavadas em PBS durante 10 minutos. Antes de prosseguir com a imunohistoquímica, a recuperação de antígeno mediada pelo calor foi realizada em todas as secções. Assim, as lâminas foram incubadas durante 20 minutos a 60°C em tampão citrato 10 mM, pH 6,0, e logo após, foram lavadas em PBS. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada incubando as lâminas no escuro durante 15 minutos numa solução 9:1 (v / v) de metanol: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e depois lavaram-se em PBS. Os antígenos não específicos foram também bloqueados tratando as secções com um soro de cavalo normal a 2,5% (kit Vectastain Universal Quick, cat. Nº PK-7800, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) durante 15 minutos à temperatura ambiente em câmara úmida.

As secções foram então tratadas em câmara úmida com os anticorpos primários, os quais foram os seguintes proteoglicanos: versican, isoforma v1 (Abcam, policlonal, cat. No. Ab19345, Cambridge, Massachusetts, EUA), com uma diluição de 1:200; decorin (Calbiochem, policlonal, número de catálogo PC673, Gibbston, EUA), a uma diluição de 1:100; biglican (R & D Systems, monoclonal, número de catálogo MAB2667, Minneapolis, EUA), diluído a 1:100; e lumican (Abcam, monoclonal, cat. no. ab186859), a uma diluição de 1:200. Também foram utilizados anticorpos primários contra as seguintes proteínas: fibronectina (Sigma-

Aldrich, monoclonal, cat. No. F7387, Saint Louis, Missouri, EUA), a uma diluição de 1:100; alfa-actina do músculo liso (Santa Cruz Biotechnology, monoclonal, número de catálogo SC-32251, Dallas, Texas, EUA), diluído a 1:75.

A incubação das secções de tecido com todos os anticorpos primários foi realizada durante à noite a 4°C. Os controles negativos foram tratados da mesma forma, mas com uma solução de soro de cavalo normal diluído à 1,5% com PBS em vez do anticorpo primário. As secções foram então lavadas em PBS, tratadas com anticorpo secundário biotilado e estreptavidina conjugada com peroxidase (kit Vectastain Universal Quick, número de catálogo PK-7800) e lavadas novamente com PBS, seguindo as instruções do fabricante. Esta reação final foi revelada com um kit de Substrato de Peroxidase DAB (número de catálogos SK-4100, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), no escuro e em câmara úmida, seguindo o protocolo do fabricante. As lâminas foram então brevemente lavadas em água destilada, contrastadas com hematoxilina por 5 minutos, desidratadas em etanol e montadas com Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha). Todas as imagens histológicas foram capturadas com uma resolução de 4080 x 3072 pixels usando uma câmara digital (DP71, Olympus, Tóquio, Japão) acoplada a um microscópio de luz (BX51, Olympus).

### 3.3- Morfometria

A espessura das túnicas íntima e média foi determinada em imagens digitais de lâminas histológicas coradas com tricrômico de Masson e capturadas com um aumento final de 100x (tronco pulmonar, aorta abdominal, artéria ilíaca comum direita) ou 200x (artéria renal direita e artéria coronária esquerda). As imagens foram então carregadas no software de análise de imagem ImageJ versão 1.52 (Rasband 2018) previamente calibrado. Definições e limites das camadas da parede arterial seguem Stary et al.,1992. A espessura das túnicas arteriais foi determinada pela medida das distâncias lineares, com base nos limites descritos por Nakashima et al., 2002. Por conseguinte, a túnica íntima foi medida a partir da superfície luminal da camada endotelial para a membrana elástica interna, quando esta última era contínua. A túnica média foi medida a partir da membrana elástica interna até a

borda mais externa da camada muscular lisa orientada circularmente. Quando a membrana elástica interna estava marcadamente descontínua (fragmentada), como na artéria coronária, a espessura da íntima foi mensurada a partir da superfície endotelial até a borda mais interna de células musculares lisas orientadas circularmente da camada média. Nestes casos, a túnica média foi medida a partir desta borda até a borda mais externa da mesma camada muscular. Para cada artéria, foram analisados dois cortes histológicos. Em cada seção, cinco campos foram examinados, e medidas da espessura de cada túnica foram feitas ao longo de cinco linhas que, foram uniformemente espaçadas ao longo do segmento arterial (Nakashima et al., 2002), ou circunferência das amostras arteriais. Essas linhas atravessaram toda a espessura da parede arterial aproximadamente perpendicular à superfície endotelial adjacente. Para cada amostra, as espessuras foi calculada segundo uma razão íntima/média, das médias obtidas (número de 10).

#### 3.4- Quantificação de coloração imunohistoquímica

Resumidamente, as imagens foram primeiramente carregadas no software GIMP (GNU Image Manipulation Program; <http://www.gimp.org>) versão 2.10, após o qual as túnicas íntima, média e adventícia foram delineadas manualmente seguindo seus limites histológicos (Nakashima et al. 2002). Estas túnicas delineadas foram então isoladas do restante da parede arterial e salvas separadamente. Em seguida, imagens das túnicas isoladas foram carregadas no ImageJ versão 1.52 (Rasband 2018) e processadas usando os seguintes plug-ins, que estão disponíveis no site do programa: (a) *Rolling Ball Background*, para reduzir grandes variações na intensidade da cor de fundo, para que todas as imagens tiveram origens semelhantes; e (b) *Colour Deconvolution*, que isola a intensidade no intervalo de cor de DAB e as converte em uma lista de valores em escala de cinza, cada um sendo emparelhado com seu respectivo número de pixels. Esses pares foram então utilizados para calcular a quantidade total de DAB (Helps et al., 2012), e foi então expressa como um percentual em relação ao "DAB máximo teórico" (ponderado) na imagem (DABwt%). A presença de marcação de alfa-actina de músculo liso na *vasa vasorum* da adventícia também foi levado em consideração ao quantificar esta

proteína. Para cada túnica arterial, cinco campos aleatórios foram analisados e um valor médio de imunomarcação foi então calculado a partir desses cinco campos.

### **3.5- Ensaio bioquímico para colágeno total**

A túnica adventícia das grandes artérias consiste em uma camada colágena interna, densa e bem definida, cercada por um tecido conjuntivo frouxo cujos limites não são claramente discerníveis e podem incluir tecido não arterial (Tonar et al., 2016). Assim, para evitar contaminantes de estruturas não vasculares aderentes e para focar nas túnicas arteriais mais diretamente envolvidas na aterogênese, a túnica adventícia foi macroscopicamente removida das amostras de tecido usadas neste ensaio (Cardoso & Mourão, 1994). A análise histológica das amostras resultantes confirmou que apenas a adventícia de tecido conjuntivo frouxo foi removida, enquanto a camada interna mais compacta foi consistentemente preservada (não mostrada) (Kim et al., 2015).

Os espécimes fixados em formol foram imersos em acetona por 24 horas, depois clivados e submetidos a duas trocas de 24 horas cada em 40 mL de clorofórmio / metanol (2: 1, v / v) à temperatura ambiente. O solvente foi retirado e as amostras foram incubadas a 60°C durante 30 minutos, obtendo uma preparação de tecido arterial seco e delipidado. A concentração de colágeno total foi então determinada nesta preparação por um ensaio colorimétrico de hidroxiprolina (Bergman & Loxley, 1963) após hidrólise de cerca de 5-10 mg das amostras de tecido seco (Cabral et al., 2003). Os resultados foram expressos em microgramas de hidroxiprolina por miligrama de tecido seco e delipidado.

### **3.6- Análise estatística**

O objetivo desta investigação foi verificar se as características estruturais e de composição da parede arterial varia entre as cinco artérias, em um projeto que assumiu que todas as artérias têm status experimental equivalente. Como tal, a

avaliação estatística exigiu comparações de todas as combinações possíveis de pares de artérias. Portanto, optamos pelo método Holm-Sidak, pois ele é menos sensível ao número de comparações, diminuindo assim a probabilidade de um erro estatístico do tipo II (Streiner, 2015). Os resultados numéricos são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (DP). Para cada variável analítica, os resultados para as cinco artérias foram primeiro analisados por ANOVA de um fator, seguido por comparações pareadas usando o método de Holm-Sidak. Os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o programa GraphPad Prism, v. 7.00 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA), e a significância estatística foi considerada quando  $p < 0,05$

## 4- RESULTADOS

### 4.1- Dados demográficos

A amostra foi homogênea, tendo maior incidência de afrodescentes, seguindo os critérios de inclusão e exclusão (tabela 1) .

Tabela1- Dados demográficos e biométricos.

<b>Parâmetros demográficos e biométricos</b>	<b>Media± SD</b>
Idade (anos)	21.93 ± 3.63
Índice de massa corporal	25.53± 1.67
	<b>Número de Indivíduos</b>
Raça	Branco:02, Negro:08, Pardo:05

Nota:A classificação dos indivíduos foi baseada apenas em cor da pele.  
Fonte: A Autora, 2018.

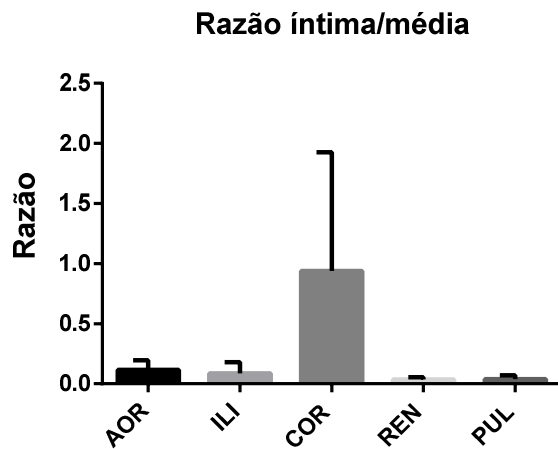
### 4.2- Histoquímica

#### 4.2.1- Morfometria

A artéria que apresentou a maior razão íntima/média foi a coronária esquerda com uma média de 0.93 e desvio padrão de 0.98. A artéria que apresentou menor razão foi a artéria renal direita (0.03± 0.01), figura 6. O resultado da ANOVA de um fator foi significativo,  $p = 0.001$ . Das comparações por teste de Holms Sidak, COR Vs. REN e COR Vs. PUL apresentou  $p = 0.001$ .



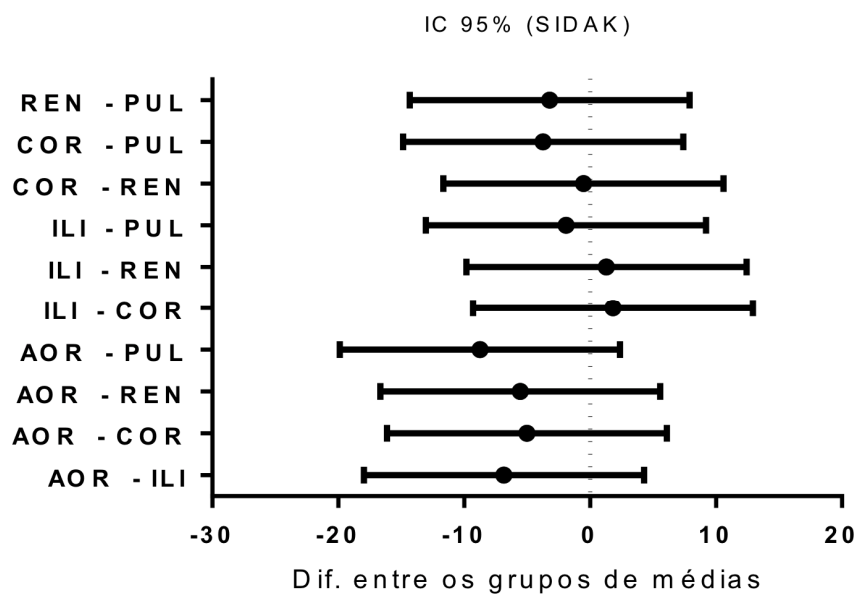
Figura 5- Gráfico da razão íntima/média.



Legenda: Razão íntima/média das diferentes artérias expressa em barra de erro das médias e desvio padrão. N =15. As artérias são a aorta abdominal (AOR), íliaca comum direita (ILI), coronária esquerda (COR), renal direita (REN) e tronco pulmonar (PUL).

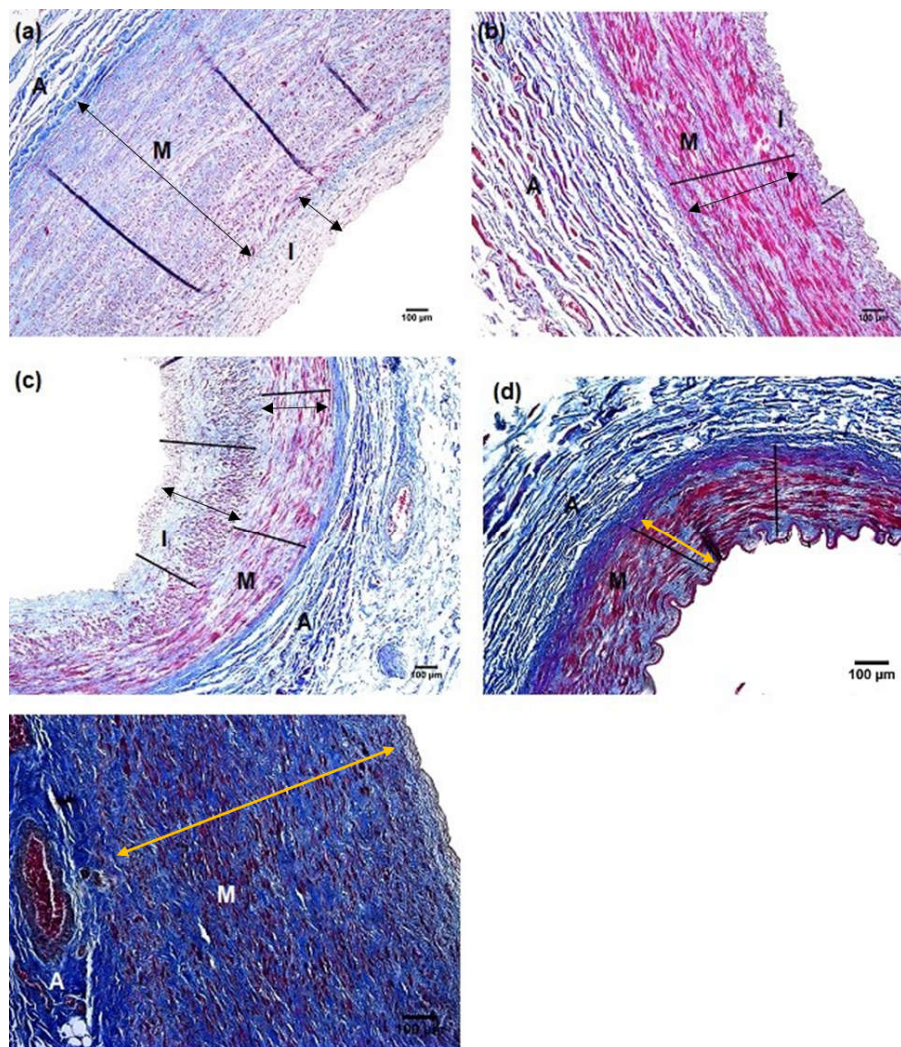
Fonte: A Autora, 2018.

Figura 6- Gráfico de comparações múltiplas da razão íntima/média.



Fonte: A Autora, 2018.

Figura 7- Fotomicrografias das cinco artérias indicando os locais de medida para obter a razão íntima/média.



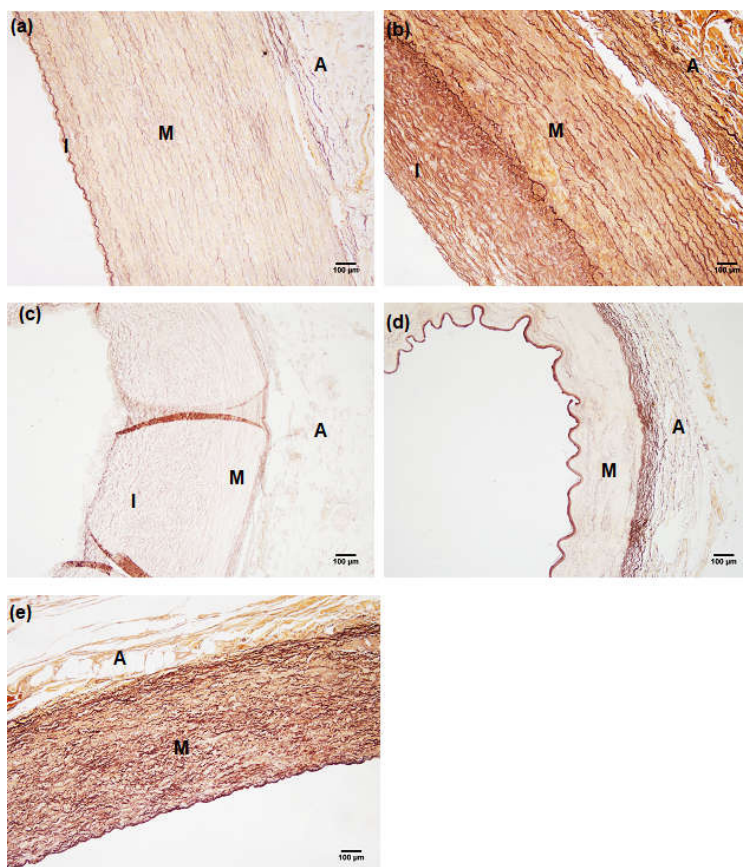
Legenda: Imagens representativas das artérias: (a)- aorta abdominal (AOR), (b)- íliaca comum direita (ILI), (c)- coronária esquerda (COR), (d)- renal direita (REN), e (e)- Tronco pulmonar. Coloração tricrômico de Masson. As setas indicam alguns dos locais de medida da espessura das túnicas íntimas e médias respeitando os limites que separam uma túnica de outra. As linhas na cor preta indicam o plano e ângulo das medidas. Túnica íntima- (I), túnica média- (M), túnica adventícia- (A); Aumento de 100 X.

Fonte: A Autora, 2018.

#### 4.2.2- Morfologia da Lâmina Elástica Interna

Esta lâmina elástica foi evidenciada em todas as artérias (figura 8), tendo diferenças marcadas entre aquelas artérias que mostravam espessamento difuso da túnica íntima e aquelas que não apresentavam tal característica morfológica. Esta lâmina elástica interna em 80% das amostras de artéria coronária esquerda estava fragmentada ao contrário do 100% dos casos das artérias renais direitas que mostravam uma lâmina elástica interna contínua (figura 9) em comparação com as outras artérias pesquisadas.

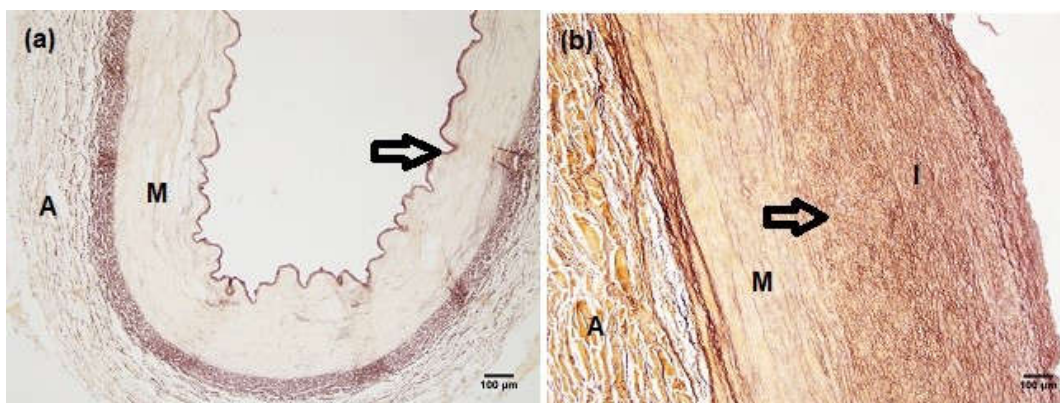
Figura 8- Fotomicrografias das cinco artérias mostrando a distribuição das fibras elásticas.



Legenda: Imagens representativas da distribuição das lâminas elásticas e fibras elásticas nas túnicas arteriais da artéria aorta abdominal- (a), artéria ilíaca comum direita- (b), coronária esquerda- (c), artéria renal direita- (d) e artéria do tronco pulmonar- (e). Túnica íntima- (I), túnica média- (M), túnica adventícia- (A). Coloração de resorcina- fucsina de Weigert. Aumento 100x.

Fonte: A Autora, 2018.

Figura 9- Fotomicrografias representativas das lâminas elásticas presente nas amostras.



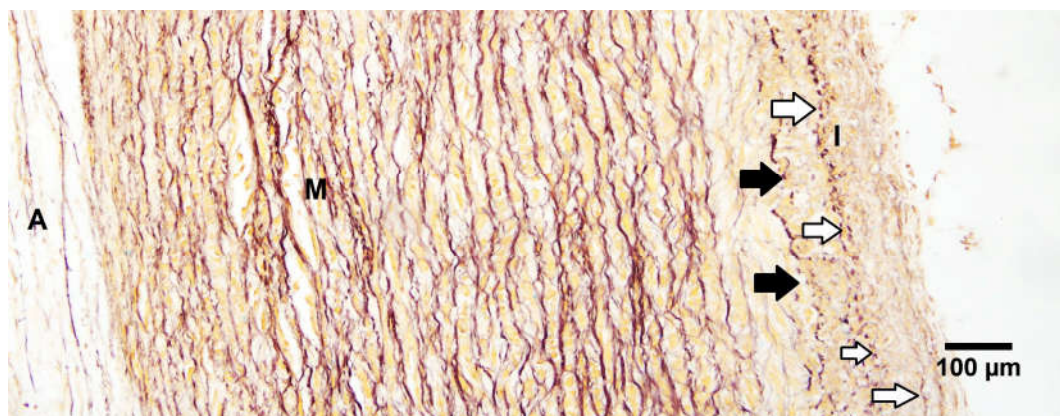
Legenda: Imagens da Lâmina elástica interna da artéria renal direita- (a) e artéria aorta abdominal- (b). A seta indica a lâmina elástica interna contínua- (a) e fragmentada- (b). Túnica íntima- (I), túnica média- (M) e túnica adventícia- (A). Coloração de resorcina-fucsina de Weigert. Aumento 100x.

Fonte: A Autora, 2018.

#### 4.2.3- Presença de Neoíntimas

Nas medidas morfométricas das diferentes túnicas foi evidenciada na túnica íntima, a presença de neoíntimas em 80% dos casos das amostras de artéria coronária esquerda, 45% das amostras de aorta abdominal e um 30% das amostras de artéria ilíaca comum. A artéria renal direita e a artéria do tronco pulmonar não tiveram presença de neoíntimas.

Figura 10- Fotomicrografia representativa de neoíntima.



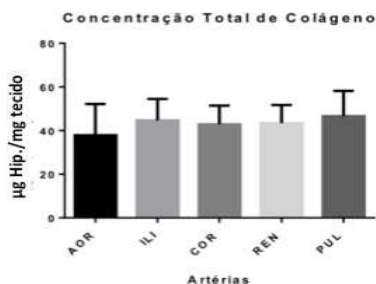
Legenda: Imagem da aorta abdominal com presença de neoíntimas (setas na cor branca) e fragmentação da lâmina limitante interna (setas na cor preta). Coloração de resorcina-fucsina de Weigert. Túnica íntima- (I), túnica média- (M) e túnica adventícia- (A). Aumento de 200x

Fonte: A Autora, 2018.

#### 4.2.4- Concentração Total de Colágeno

No que corresponde à estrutura arterial entre as cinco diferentes artérias (Figura 11), a concentração total de colágeno não variou significativamente.

Figura 11- Gráfico de barras da concentração total de colágeno das artérias.



Legenda: Concentração total de colágeno na artéria aorta abdominal- (AOR), artéria renal direita- (ILI), artéria renal direita- (REN), artéria coronária esquerda- (COR), e tronco pulmonar- (PUL) de 15 homens adultos jovens. Os resultados são dados em micrograma de hidroxiprolina (Hip) por miligrama de tecido arterial seco, excluindo a túnica adventícia de tecido frouxo previamente. Barras e barras de erro representam a média e desvio padrão respectivamente. A análise pela ANOVA de um fator amostrou que não há diferença significativa entre as médias.

Fonte: A Autora, 2018.

### 4.3- Imunohistoquímica

Foi realizada a marcação imunohistoquímica para várias proteínas e cujos resultados estão expressos na tabela 2.

Tabela 2- Componentes da matriz extracelular e a alfa actina de músculo liso das diferentes túnicas das artérias humanas normais de adultos jovens.

Componentes Arteriais	Túnicas Arteriais	Artérias					ANOVA**
		AOR	ILI	COR	REN	PUL	
Lumican N=5	I	37.51±2.64	35.62±8.91	34.96±2.47	21.73±12.91	31.40±20.00	> 0.05
	M	34.38±3.65	31.89±7.52	31.51±7.35	30.70±5.18	26.85±17.31	> 0.05
	A	36.97±6.81	36.81±5.97	37.07±8.47	34.52±6.32	21.87±19.32	> 0.05
	<b>ANOVA*</b>	> 0.05	> 0.05	> 0.05	<b>0.019</b>	> 0.05	
Versican (v1) N=5	I	36.91±3.69	32.60±4.50	33.95±2.53	32.02±5.21	35.68±6.54	> 0.05
	M	35.13±3.87	28.84±9.2	33.54±4.11	31.94±7.2	35.57±12.56	> 0.05
	A	29.92±1.74	31.12±8.02	30.52±6.01	31.54±8.41	28.51±7.81	> 0.05
	<b>ANOVA*</b>	<b>0.005</b>	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	
Biglican N=4	I	26.37±5.33	26.87±3.12	17.48±15.18	28.01±2.06	28.59±8.69	> 0.05
	M	26.79±5.06	22.55±4.00	13.95±12.14	27.69±10.48	26.11±3.88	> 0.05
	A	21.23±4.32	19.51±4.98	14.26±12.37	22.9±7.34	21.01±6.02	> 0.05
	<b>ANOVA*</b>	<b>0.004</b>	<b>0.003</b>	>0.05	> 0.05	> 0.05	
Fibronectina N=5	I	44.76±16.92	33.48±7.83	27.93±13.87	32.5±14.37	36.08±12.23	> 0.05
	M	25.74±18.43	27.19±12.56	25.65±19.77	29.0±19.27	30.29±14.99	> 0.05
	A	30.32±11.95	25.13±10.78	19.69±7.26	27.5±13.14	27.44±12.39	> 0.05
	<b>ANOVA*</b>	> 0.05	<b>0.003</b>	> 0.05	> 0.05	<b>0.037</b>	
Alfa actina de músculo liso N=4	I	30.31±2.09	18.86±0.76	20.12±1.80	27.20±4.32	21.21±3.41	<b>0.006</b>
	M	30.30±4.65	21.32±1.69	25.48±9.64	31.04±2.26	22.79±4.16	> 0.05
	A	16.6±1.84	11.26±0.38	15.87±0.27	11.19±1.26	12.93±1.01	<b>0.015</b>
	<b>ANOVA*</b>	<b>0.017</b>	<b>0.001</b>	> 0.05	<b>0.003</b>	<b>0.005</b>	

Legenda: As artérias são a aorta abdominal (AOR), íliaca interna (ILI), coronária esquerda (COR), renal direita (REN), e tronco pulmonar (PUL). A concentração das proteínas foi determinada como a quantidade relativa e ponderada de DAB na marcação imunohistoquímica (DABwt%) da imagem. A concentração de cada componente foi mensurada separadamente nas túnicas íntima- (I), média- (M) e adventícia- (A), e esses resultados estão expressos em média ± desvio padrão de 4-5 casos. Para cada proteína, a análise de Anova de um fator foi efetuada com as médias entre: (a)- as túnicas de cada artéria (ANOVA\*) e, (b)- cada túnica de todas as artérias (ANOVA\*\*). Os resultados estatístico estão mostrados em valores de *p*.

Fonte: A Autora, 2018.

Tabela 3- Análise comparativa dos componentes da matriz extracelular e da proteína alfa actina de músculo liso das túnicas íntima, média e adventícia das diferentes artérias normais de adultos jovens.

Componentes arteriais	Túnica íntima									
	AOR vs.				ILI vs.			PUL vs.		REN vs.
	ILI	PUL	REN	COR	PUL	REN	COR	REN	COR	COR
Lumican	>0.99	0.99	0.38	>0.99	0.99	0.55	>0.99	0.91	>0.99	0.61
Versican (v1)	0.76	>0.99	0.62	0.96	0.96	>0.99	>0.99	0.89	0.99	0.99
Biglican	>0.99	>0.99	>0.99	0.95	>0.99	>0.99	0.93	>0.99	0.85	0.88
Fibronectina	0.87	0.97	0.81	0.44	>0.99	>0.99	0.99	>0.99	0.98	0.99
Alfa actina de músculo liso	<b>0.010</b>	0.06	0.94	<b>0.035</b>	0.99	0.09	>0.99	0.35	>0.99	0.19

Componentes arteriais	Túnica média									
	AOR vs.				ILI vs.			PUL vs.		REN vs.
	ILI	PUL	REN	COR	PUL	REN	COR	REN	COR	COR
Lumican	>0.99	0.93	0.99	>0.99	0.99	>0.99	>0.99	0.99	0.99	>0.99
Versican (v1)	0.78	>0.99	0.99	>0.99	0.71	0.99	0.95	0.99	>0.99	>0.99
Biglican	0.99	>0.99	>0.99	0.68	>0.99	0.99	0.95	>0.99	0.73	0.60
Fibronectina	0.99	0.70	0.94	>0.99	0.95	0.99	0.99	>0.99	0.67	0.93
Alfa actina de músculo liso	0.60	0.79	>0.99	0.98	>0.99	0.53	0.99	0.70	0.99	0.95

Componentes arteriais	Túnica adventícia									
	AOR vs.				ILI vs.			PUL vs.		REN vs.
	ILI	PUL	REN	COR	PUL	REN	COR	REN	COR	COR
Lumican	>0.99	0.39	>0.99	>0.99	0.40	>0.99	>0.99	0.62	0.38	>0.99
Versican (v1)	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	0.99	>0.99	>0.99	0.99	0.99	>0.99
Biglican	>0.99	>0.99	>0.99	0.98	>0.99	>0.99	0.99	>0.99	0.98	0.92
Fibronectina	0.92	0.99	0.99	0.14	0.99	0.99	0.84	>0.99	0.50	0.49
Alfa actina de músculo liso	<b>0.007</b>	0.06	<b>0.006</b>	0.98	0.76	>0.99	<b>0.010</b>	0.72	0.17	<b>0.010</b>

Nota: Os números em negrito representam os valores que tiveram significância estatística.  
 Fonte: A Autora, 2018.

Tabela 4- Análises das comparações múltiplas das túnicas arteriais.

<b>Componentes da Matriz Extracelular e a Alfa Actina Actina de Músculo Liso</b>	Comparações das Túnicas arteriais	<b>AOR</b>	<b>ILI</b>	<b>REN</b>	<b>COR</b>	<b>PUL</b>
<b>Fibronectina</b>	Int. Vs. Med.	0.36	0.020	0.82	0.98	0.19
	Int. Vs. Adv.	0.58	0.004	0.62	0.59	0.045
	Med. Vs. Adv.	0.97	0.68	0.98	0.79	0.69
<b>Alfa Actina de Músculo Liso</b>	Int. Vs. Med.	0.99	0.019	0.005	0.68	0.72
	Int. Vs. Adv.	0.030	0.004	0.015	0.80	0.015
	Med. Vs. Adv.	0.030	0.18	0.53	0.29	0.008
<b>Lumican</b>	Int. Vs. Med.	0.68	0.48	0.07	0.51	0.68
	Int. Vs. Adv.	0.85	0.72	0.025	0.52	0.41
	Med. Vs. Adv.	0.68	0.42	0.31	0.30	0.68
<b>Versican</b>	Int. Vs. Med.	0.29	0.45	0.99	0.99	0.97
	Int. Vs. Adv.	0.006	0.64	0.99	0.62	0.33
	Med. Vs. Adv.	0.025	0.64	0.99	0.70	0.33
<b>Biglican</b>	Int. Vs. Med.	0.87	0.030	0.99	0.16	0.70
	Int. Vs. Adv.	0.008	0.005	0.55	0.18	0.08
	Med. Vs. Adv.	0.006	0.11	0.59	0.98	0.24

Legenda: As artérias são: aorta abdominal (AOR), íliaca comum direita (ILI), coronária esquerda (COR), renal direita (REN) e tronco pulmonar (PUL). Aplicando análise de ANOVA de um fator, as médias de cada componente das túnicas íntima (Int.), média (Med.) e adventícia (Adv.) de cada artéria (Tabela 2) foram também comparadas entre elas usando o método de Holm-Sidak. Esses resultados são mostrados como valores de *p*. Versus (vs.).

Fonte: A Autora, 2018.

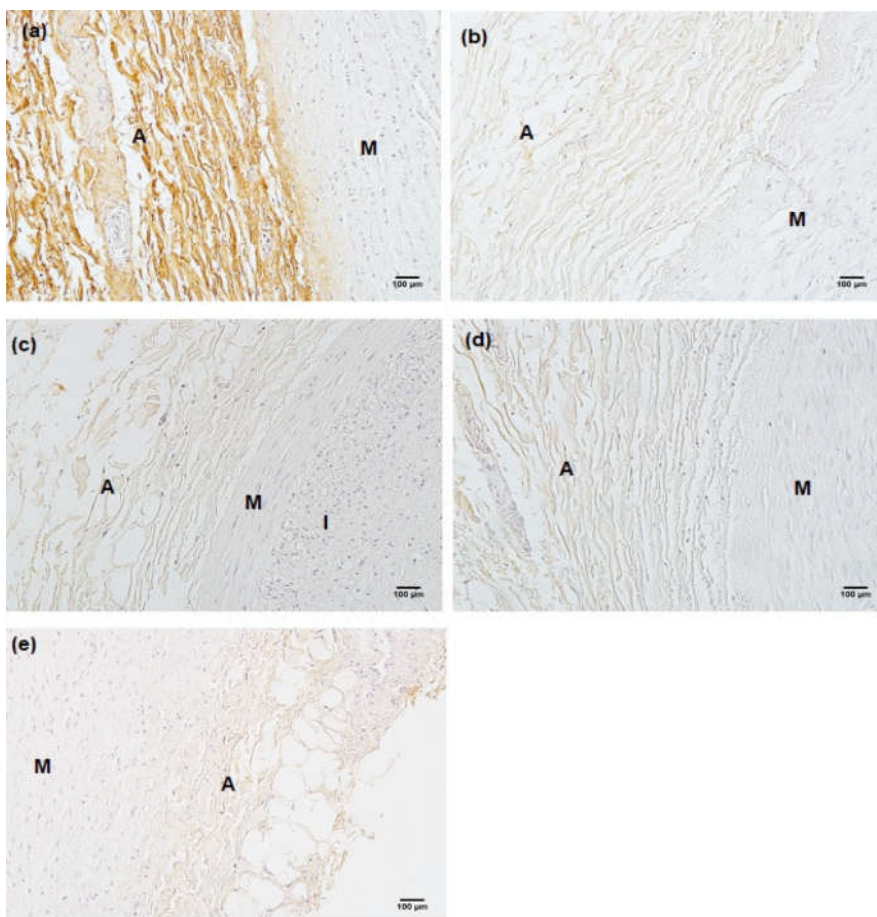


### 4.3.1- Proteoglicanos

#### 4.3.1.1- Decorin

O proteoglicano Decorin foi expresso na túnica adventícia das 5 artérias estudadas (N=7), não tendo expressão nas túnicas íntima e média, mesmo das artérias com presença de espessamento difuso da túnica íntima. Por tal razão não foi feita a quantificação imunohistoquímica, resultados são mostrados na figura 13.

Figura 12- Fotomicrografias representativas da imunomarcção para Decorin.



Legenda: Imagens representativas de marcação imunohistoquímica para o proteoglicano Decorin das artérias aorta abdominal- (a), ilíaca comum direita- (b), coronária esquerda- (c), renal direita- (d) e tronco pulmonar- (e). Presença da marcação na túnica adventícia. Túnica íntima- (I), túnica média- (M) e túnica adventícia -(A).

Fonte: A Autora, 2018.

## 4.3.1.2- Versican

Este proteoglicano (isoforma v1), N=5, teve maior expressão nas túnicas íntima e média de todas as artérias (figura 14), não possuindo diferenças significativas entre as diversas artérias (tabela 2). A diferença estatística foi evidenciada entre as túnicas da artéria aorta abdominal.

Figura 13- Gráficos da análise estatística da quantificação imunohistoquímica para o proteoglicano Versican (v1). (Continua)

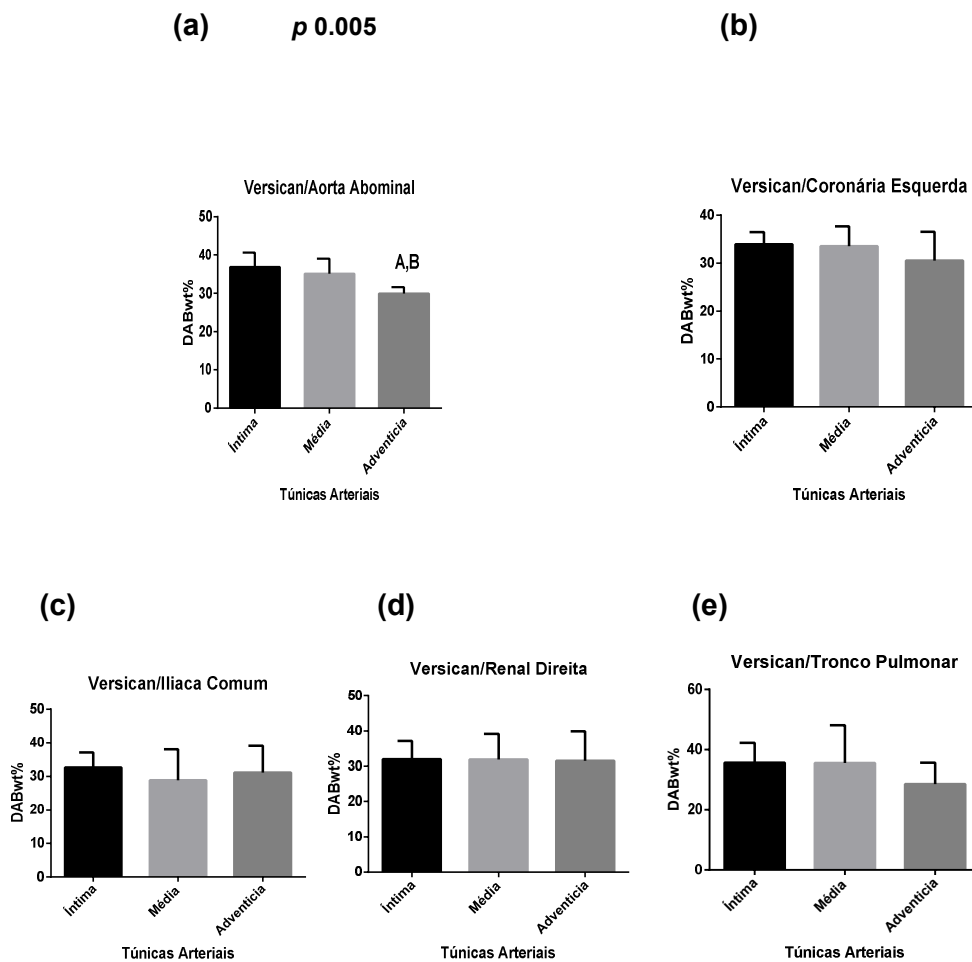
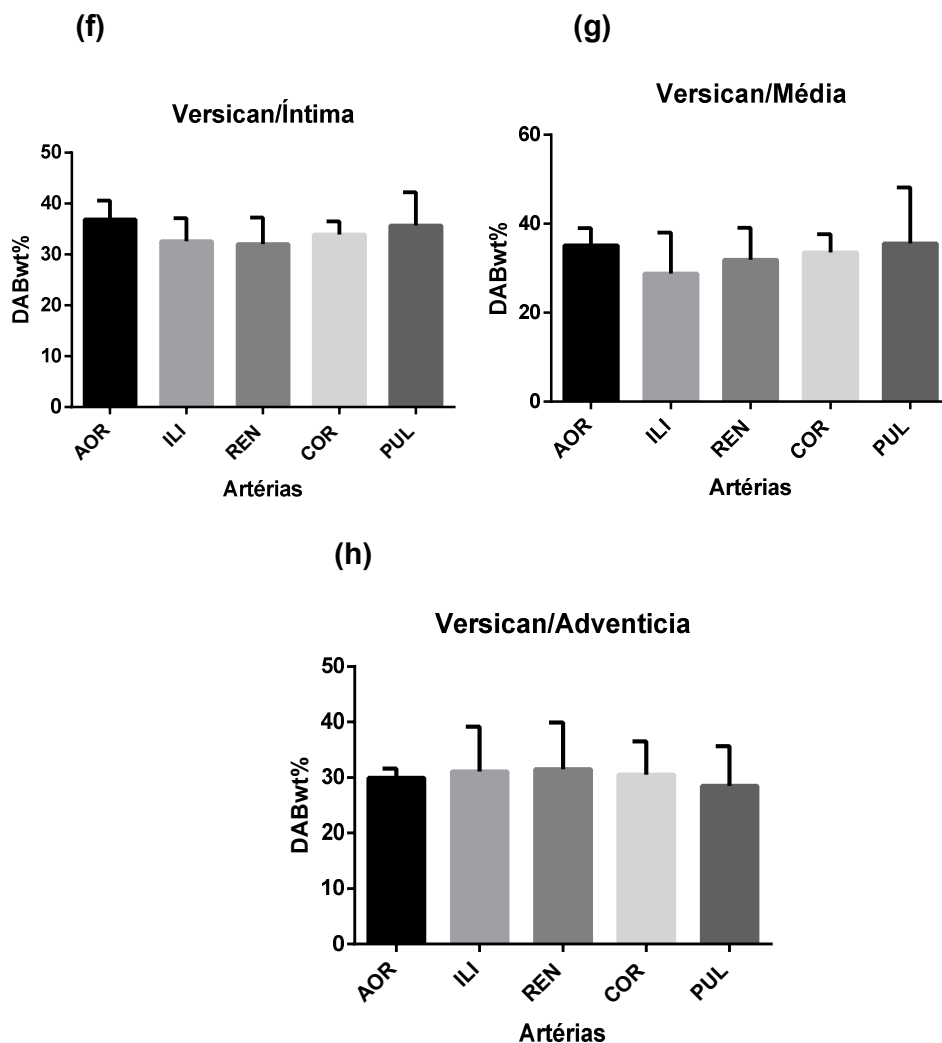


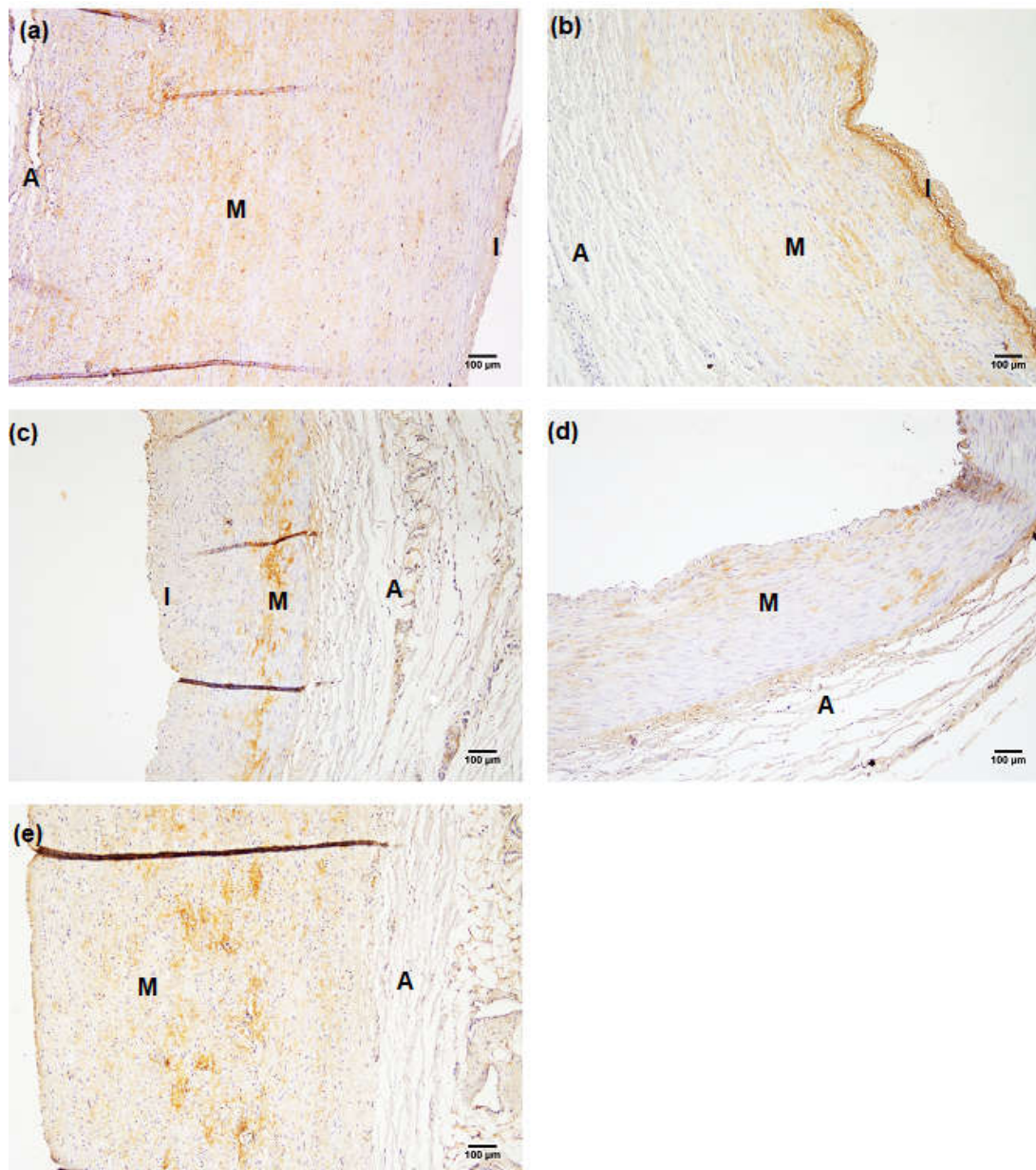
Figura 13- Gráficos da análise estatística da quantificação imunohistoquímica para o proteoglicano Versican (v1). (Conclusão)



Legenda: Quantificação imunohistoquímica para Versican expressa em porcentagem de DAB Ponderado (DABwt %) das túnicas das cinco artérias- (a), (b), (c), (d), (e), em gráficos de barras das médias e desvio padrão, (N=5). Os gráficos (f), (g), (h)- quantificação imunohistoquímica para cada túnica de todas as artérias. (A) diferente da túnica Íntima; (B) diferente da túnica Média

Fonte: A Autora, 2018.

Figura 14- Fotomicrografias representativas da imunomarcção para Versican.



Legenda: Fotomicrografias das artérias aorta abdominal- (a), íliaca comum direita- (b), coronária esquerda- (c), renal direita- (d) e tronco pulmonar- (e). Túnica íntima- (I), túnica média- (M) e túnica adventícia- (A). Aumento de 100x.

Fonte: A Autora, 2018.

## 4.3.1.3- Lumican

Sua maior expressão foi evidenciada nas túnicas íntima e adventícias de AOR, ILI e COR. Na artéria renal a maior expressão está presente na túnica média e adventícia. A artéria PUL teve maior expressão na túnica íntima. A expressão entre as diferentes artérias não apresentou diferença significativa (tabela 2).

Figura 15- Gráficos da análise estatística da quantificação imunohistoquímica para o proteoglicano Lumican. (Continua)

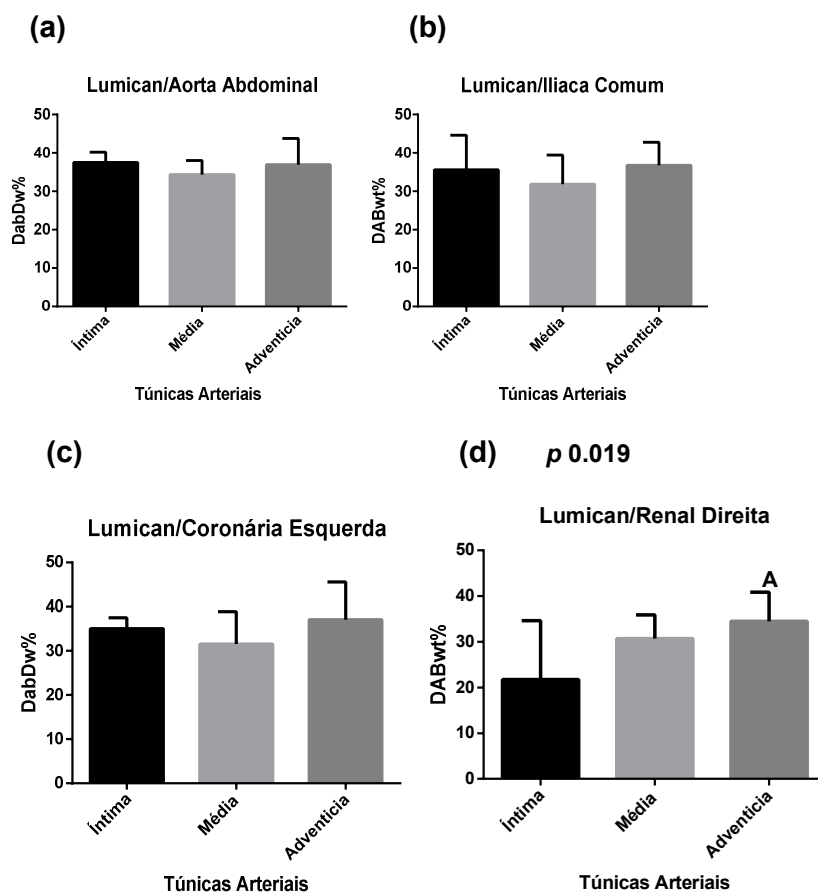
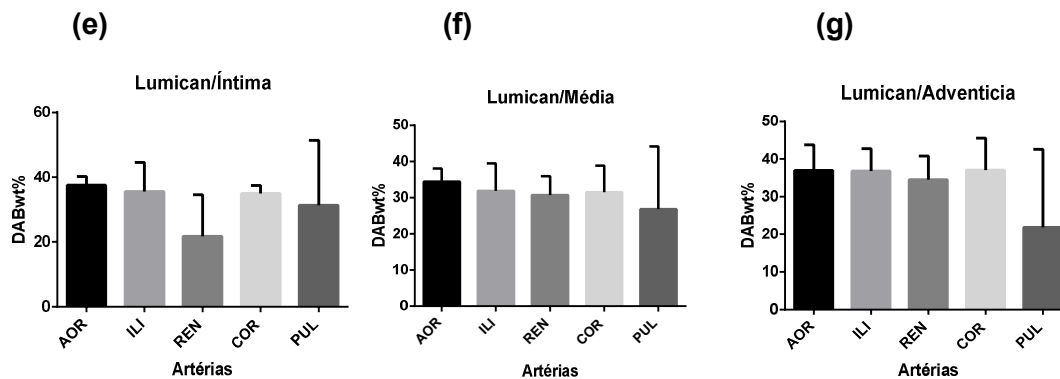


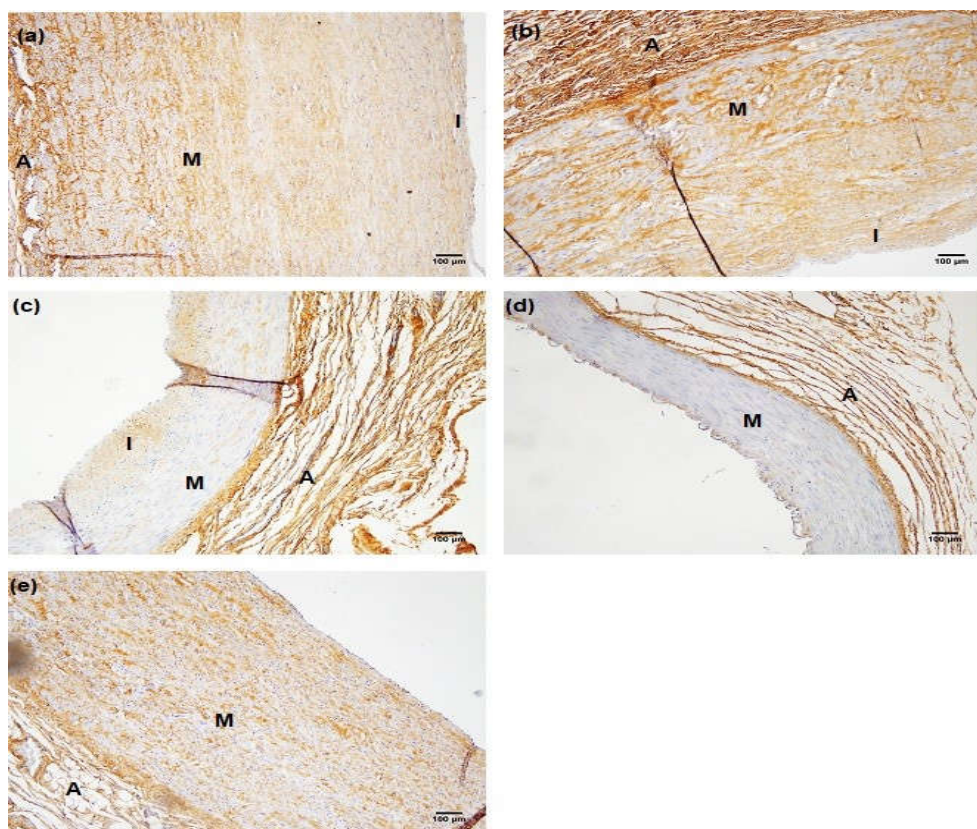
Figura 15- Gráficos da análise estatística da quantificação imunohistoquímica para o proteoglicano Lumican. (Conclusão)



Legenda: Quantificação imunohistoquímica para Lumican expressa em porcentagem de DAB ponderado (DABwt %) das túnicas de quatro artérias- (a), (b), (c), (d), em gráficos de barras das médias e desvios padrão, (N=5). Os gráficos (e), (f), (g)- quantificação imunohistoquímica para cada túnica de todas as artérias. Diferente da túnica íntima (A).

Fonte: A Autora, 2018.

Figura 16- Fotomicrografias representativas da imunomarcação para Lumican.



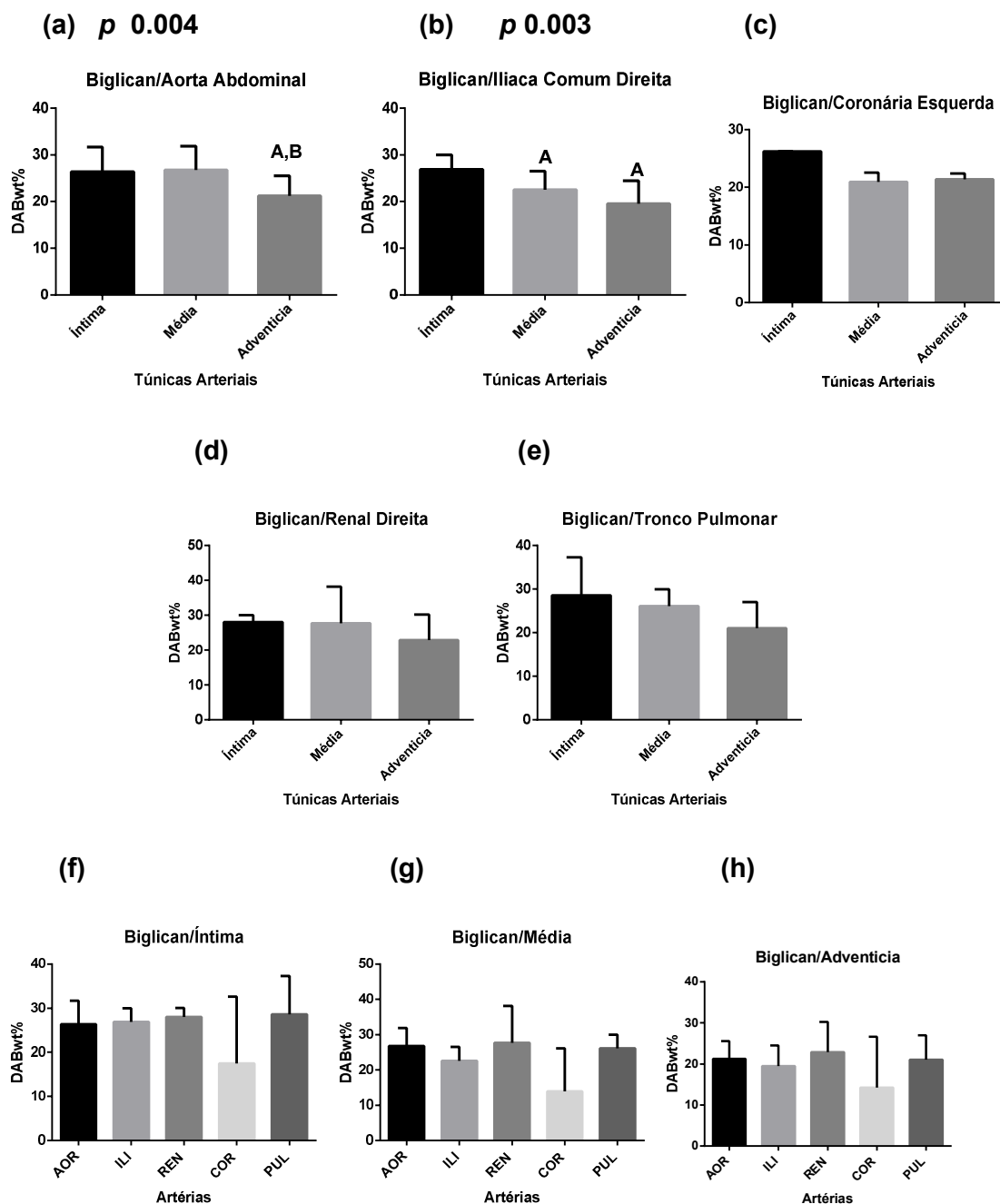
Legenda: Fotomicrografias das artérias aorta abdominal- (a),  lfaca comum direita- (b), coronária esquerda- (c), renal direita- (d), e tronco pulmonar- (e). Túnica  ntima- (I), túnica média- (M) e túnica adventícia- (A). Aumento de 100x. Barra de escala igual a 100 µm.

Fonte: A Autora, 2018.

#### 4.3.1.4- Biglican

Sua maior expressão foi evidenciada nas túnicas íntima e média, não possuindo significância estatística entre as diferentes artérias (tabela 2). Esta significância estatística foi evidenciada entre as túnicas das artérias AOR e ILI.

Figura 17- Gráficos da análise estatística da quantificação imunohistoquímica para o proteoglicano Biglican.

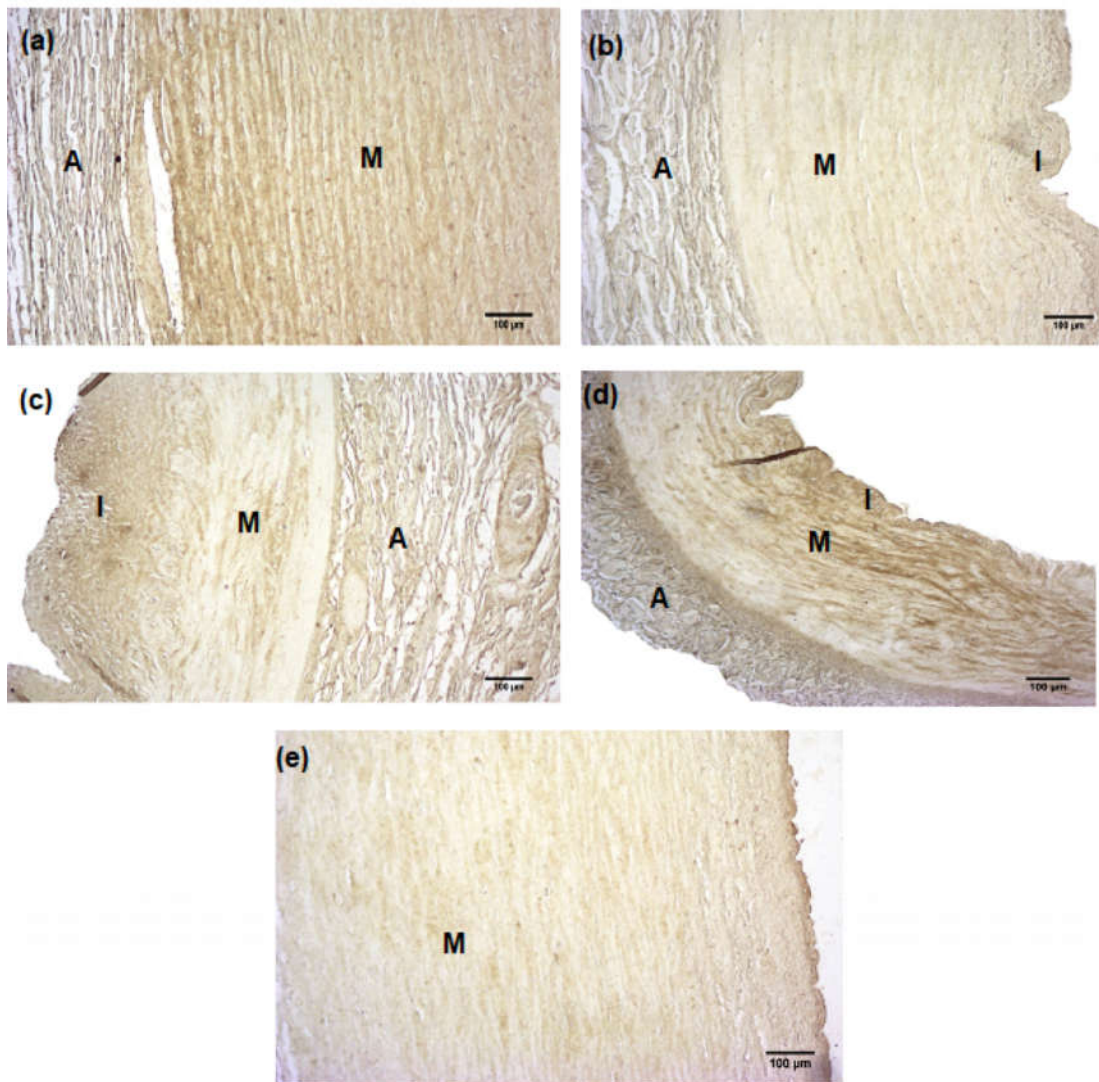


Legenda: Quantificação imunohistoquímica para Biglican expressa em porcentagem de DAB ponderado (DABwt %), em gráficos de barras das médias e desvio padrão das túnicas arteriais. Aorta Abdominal- (a), Iliaca comum direita- (b), coronária esquerda- (c), renal direita- (d) e tronco pulmonar- (e). N=4. Quantificação imunohistoquímica para Biglican expressa em porcentagem de DAB ponderado (DABwt %), das túnicas íntima- (f), média (g) e adventícia - (h) das cinco artérias (N=4). Diferente da íntima (A); diferente da média.

Fonte: A Autora, 2018.



Figura 18- Fotomicrografias representativas da imunomarcção para o proteoglicano Biglican.



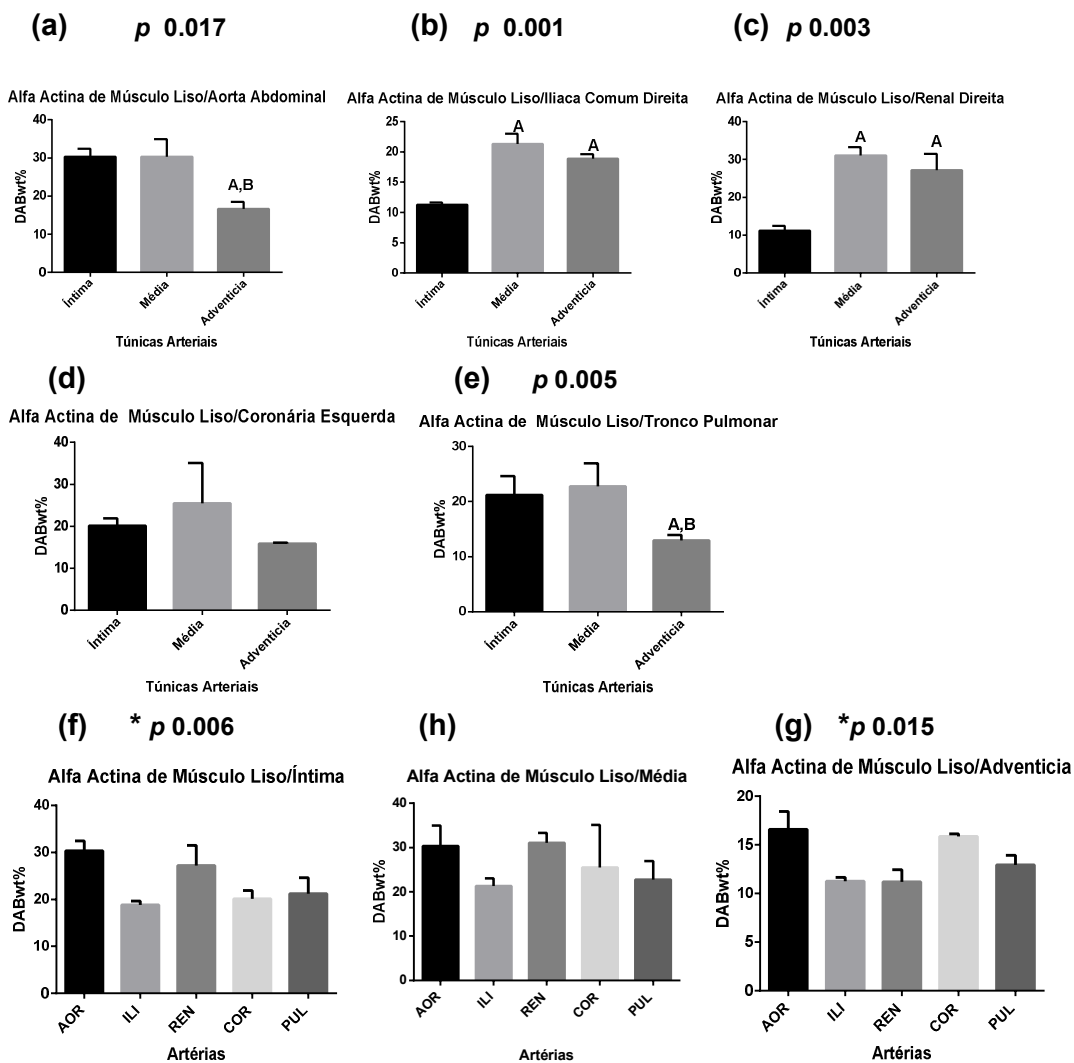
Legenda: Imagens das artérias aorta abdominal- (a), íliaca comum direita- (b), coronária esquerda- (c), renal direita- (d) e tronco pulmonar- (e). Túnica íntima- (I), túnica média- (M) e túnica adventícia- (A). Aumento de 100x.

Fonte: A Autora, 2018.

#### 4.3.2- Alfa Actina de Músculo Liso

A maior expressão da proteína esteve nas túnicas íntima e média das artérias AOR, ILI, COR, já nas artérias REN e PUL teve variabilidade de expressão sendo maior na túnica média. Houve significância estatísticas entre as diferentes artérias para as túnicas íntima e adventícia. Os valores são referenciados na tabela 2.

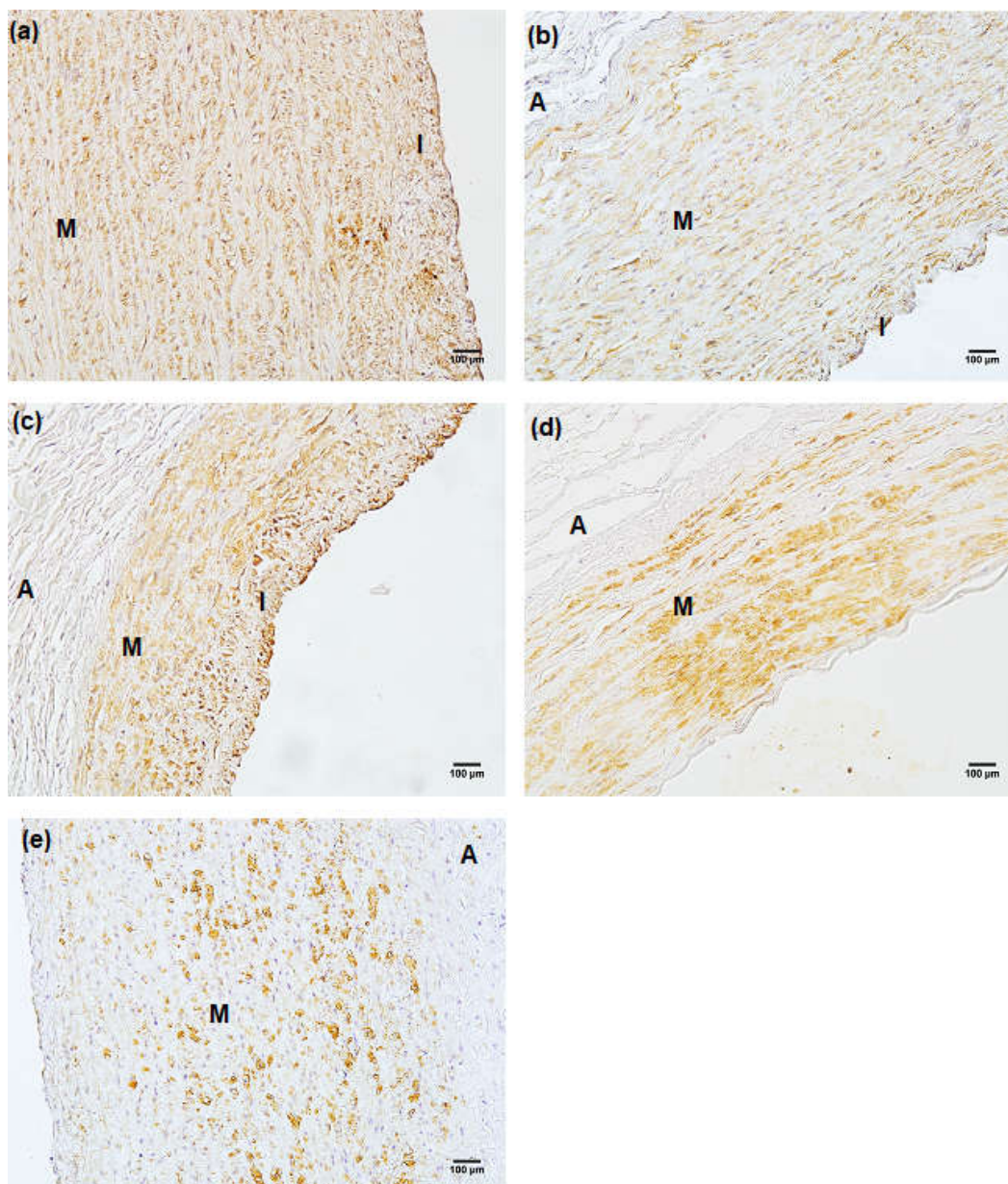
Figura 19- Gráficos da análise estatística da quantificação imunohistoquímica para a proteína alfa actina de músculo liso.



Legenda: Quantificação imunohistoquímica para alfa actina de músculo liso expressa em porcentagem de DAB ponderado (DABwt %), em gráficos de barras das médias e desvio padrão das túnica arteriais, da aorta abdominal- (a), íliaca comum direita- (b), renal direita- (c), coronária esquerda- (d) e tronco pulmonar- (e). N=4. Quantificação imunohistoquímica para Biglican expressa em porcentagem de DAB ponderado (DABwt %), das túnica íntima- (f), média- (g) e adventícia - (h) das cinco artérias (N=4). Diferente da íntima (A); diferente da média (B). Verificar tabela 3 (\*).

Fonte: A Autora, 2018.

Figura 20- Fotomicrografias representativas da imunomarcação para alfa actina de músculo liso.



Legenda: Imagens das artérias aorta abdominal-(a), ilíaca comum direita-(b), coronária esquerda-(c), renal direita-(d) e tronco pulmonar-(e). Túnica íntima-(I), túnica média-(M) e túnica adventícia-(A). Aumento de 100x.

Fonte: A Autora, 2018.

### 4.3.3- Fibronectina

A maior expressão de Fibronectina foi evidenciada na túnica íntima, seguida da túnica média para as artérias AOR, ILI, COR, REN e PUL, não apresentando significância estatística. As artérias ILI e PUL tiveram significância estatística entre as túnicas (tabela 2).

Figura 21- Gráficos da análise estatística da quantificação imunohistoquímica para a proteína fibronectina. (continua)

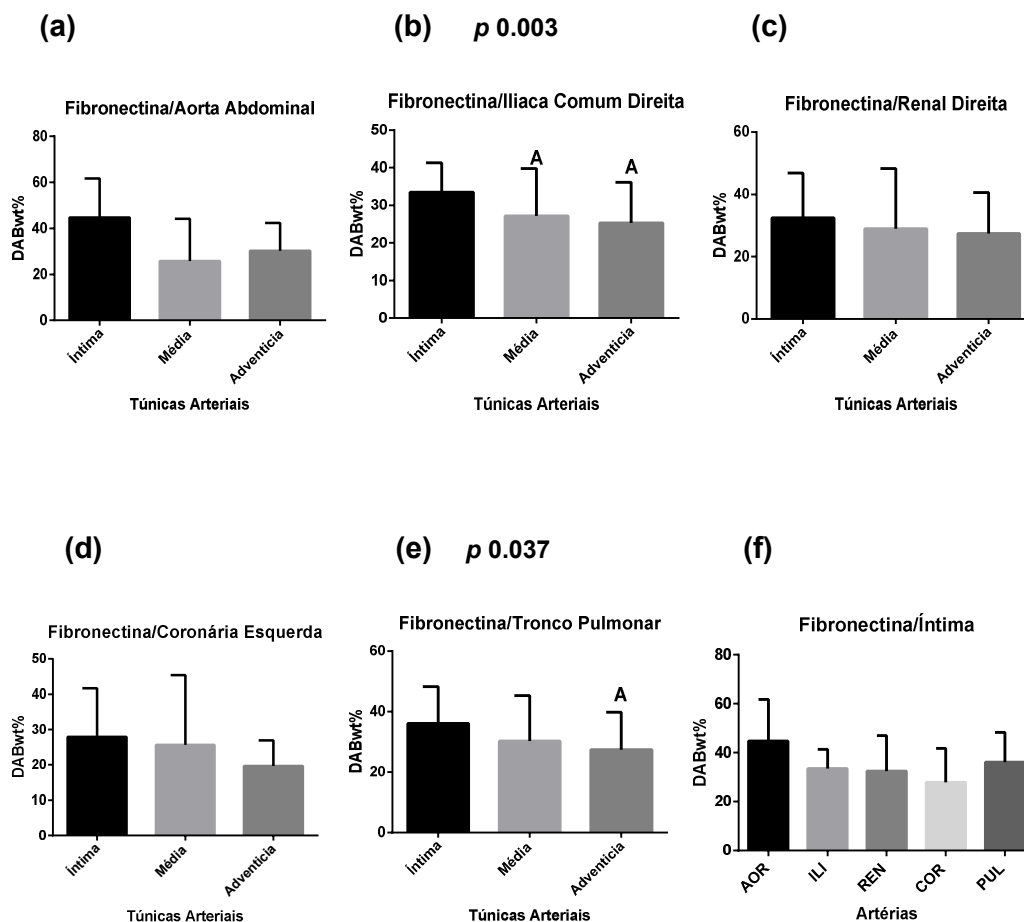
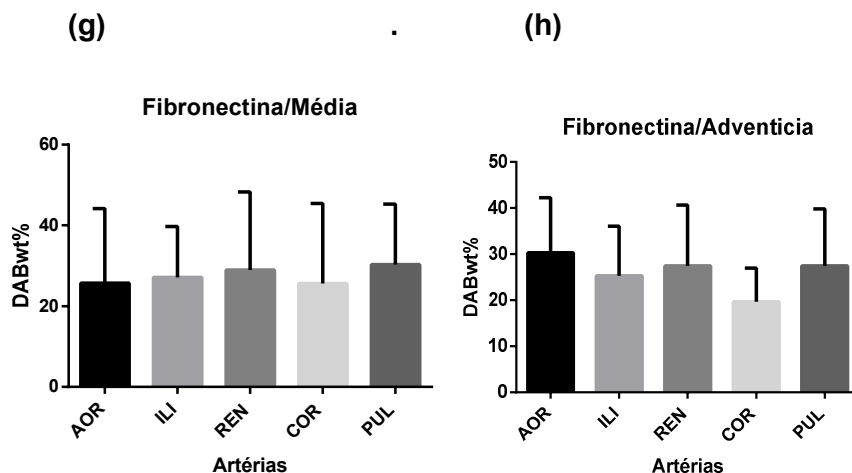


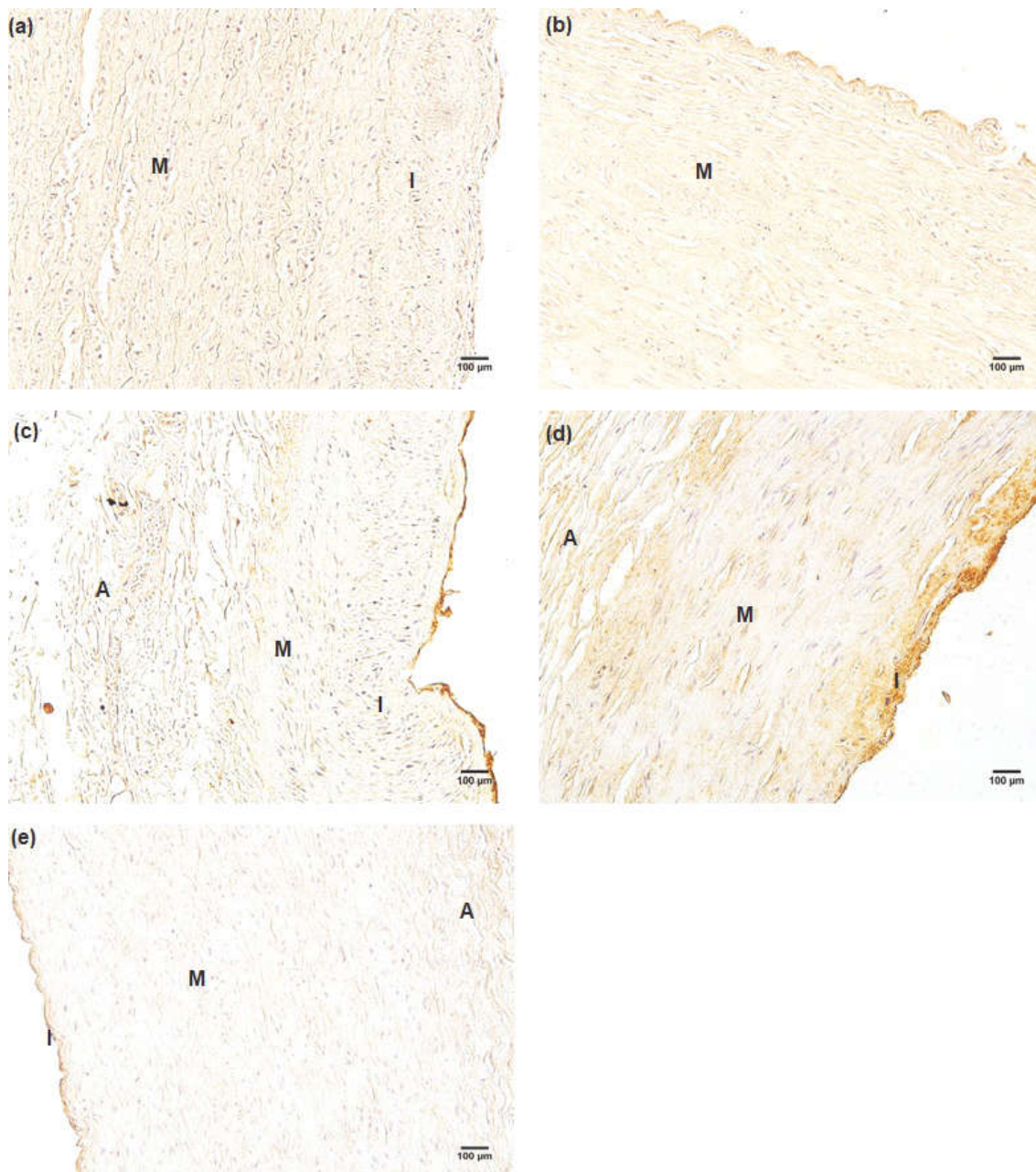
Figura 21- Gráficos da análise estatística da quantificação imunohistoquímica para a proteína fibronectina. (conclusão)



Legenda: Quantificação imunohistoquímica para a proteína fibronectina expressa em porcentagem de DAB ponderado (DABwt %), em gráficos de barras das médias e desvio padrão das túnicas das artérias aorta abdominal- (a), ilíaca comum direita- (b), renal direita- (c), coronária esquerda- (d) e tronco pulmonar- (e); e das túnicas íntima -(f), média (g) e adventícia (h) das cinco artérias (N=5). Diferente da íntima (A); diferente da média (B).

Fonte: A Autora, 2018.

Figura 22- fotomicrografias representativas da imunomarcção para a proteína fibronectina.



Legenda: Imagens das artérias aorta abdominal-(a), íliaca comum direita-(b), renal direita-(c), coronária esquerda-(d) e tronco pulmonar-(e). Túnica íntima-(I), túnica média-(M) e túnica adventícia-(A). Aumento 200x.

Fonte: A Autora, 2018.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1- Características morfológicas das artérias

Nas amostras arteriais de adultos jovens sem suspeitas de doença coronariana ou aterosclerótica, foram evidenciadas conformações estruturais variáveis na sua morfologia em aquelas com maior susceptibilidade para o desenvolvimento de aterosclerose, de aquelas com susceptibilidade de moderado a menor. Estes dados são semelhantes aos dados morfológicos da pesquisa de Nakashima et al., 2002.

Nas artérias com maior predisposição para o desenvolvimento de doença ateroscleróticas (Roberts et al., 1959) foi encontrado o espessamento difuso da túnica íntima na artéria aorta abdominal e excêntrico na artéria coronária esquerda, corroborando os achados de Holzapfel et al., 2005 para a túnica íntima da artéria coronária esquerda, e os dados de Nakashima et al., 2002, para o espessamento da túnica íntima da aorta abdominal e ilíaca interna, sendo esta última, considerada com um risco moderado.

Este espessamento da túnica íntima é considerado como uma característica estrutural precursora das mudanças das paredes arteriais que ao longo do tempo levam à aterosclerose segundo Otsuka et al., 2014 e Subbotin, 2016, não obstante, está classificado como um tipo de lesão não progressiva pela *American Heart Association* (Stary et al., 1992; Virmani et al., 2000).

Não só em adultos são encontradas estas características estruturais, também este espessamento difuso tem sido evidenciado em estudos feitos com séries de casos de necropsias de neonatos e crianças (Mikko et al., 2001; Raitakari et al., 2003; Berenson et al., 1998), e que vinculou a presença desta característica morfológica à maior predisposição de lesões ateroscleróticas ao longo da vida (Pesonen et al., 1996; Kaprio et al., 1993), chegando em alguns casos provocar morte súbita em adultos jovens (Tavora et al., 2011).

Uma composição estrutural diferente das túnicas arteriais foi encontrada na artéria renal direita e na artéria do tronco pulmonar. Nestas, não foi exibido o espessamento da túnica íntima. A túnica média apresentou-se com abundantes



fibras colágenas e elásticas no caso da artéria do tronco pulmonar, e com células musculares lisas em disposição e orientação próprias dos vasos arteriais nos casos das artérias renais direitas. Estas características corroboram os achados de Nakashima et al., 2002 e Velican et al., 1979, quando comparavam as características morfológicas da artéria coronária esquerda com a artéria renal e sua evolução estrutural ao longo da vida.

Não foi evidenciado anormalidades nas túnicas média e adventícia de todas as artérias, considerando que as características das túnicas arteriais estão atreladas a possíveis condições de adaptação fisiológicas como expressas na pesquisa de Subbotin, 2016.

A artéria renal, além de não apresentar espessamento difuso e nem excêntrico, apresentou uma lâmina limitante interna contínua diferente às presentes nas artérias coronária esquerda e aorta abdominal. Algumas das amostras apresentaram lâminas limitantes internas contínuas sempre acompanhadas de menor espessamento da túnica íntima. Foi constatado o padrão da presença de maior espessamento da túnica íntima e células de músculo liso no local subendotelial, com maior fragmentação da lâmina limitante interna corroborado pela pesquisa de Cociolone et al., 2018. Estes dados podem estar relacionados a certas teorias que falam a favor da quantidade de lamelas elásticas na túnica íntima e o comprometimento da oxigenação do local.

A túnica íntima é avascular, esta tem suprimento nutricional por absorção direta do lúmen arterial, no momento em que as camadas celulares mais profundas não efetuam uma troca eficiente com a superfície endotelial, são desencadeados mecanismos na presença da hipóxia que geram angiogênese. Estes novos vasos arteriais são procedentes da túnica média, originários da túnica adventícia (vaso vasorum), permeando através das lâminas elásticas para assim, poder suprir a demanda no local com hipoxemia da túnica íntima (Subbotin, 2016).

É conhecido o papel das células endoteliais na produção do precursor para a geração de elastina (Cantor Jo et al., 1980), o que leva à conformação da lâmina limitante e das fibras elásticas. A sua estrutura múltipla fala a favor da teoria da disfunção endotelial e da perda destas células (Matsuzawa et al., 2014), da migração de células musculares lisas para manter a homeostase da região e do início dos mecanismos de cicatrização com a conformação de uma nova fileira de células endoteliais funcionais, em contato com uma nova lâmina limitante fornecida

pelo processo. Se as condições de estresse são mantidas, este mecanismo é perpetuado, o que gera espessamento da túnica íntima com a presença de neoíntimas (Gimbrone MA & Garcia-Cardeña, 2013).

A presença de neoíntimas foi comum nas artérias que apresentaram espessamento da túnica íntima, sendo a artéria coronária a que mostrou maior número, achados que são corroborados em outras pesquisas (Nakashima et al., 2002; Otsuka et al., 2014; Mikko et al., 2001).

## **5.2- Características da matriz extracelular das túnicas arteriais**

Esta pesquisa teve como objetivo principal a avaliação de certas proteínas que estão conhecidamente vinculadas ao desenvolvimento da doença aterosclerótica (Hultgårdh-Nilsson et al., 2015).

Um deste componentes é o colágeno. No nosso ensaio para a quantificação bioquímica não teve diferença entre as cinco artérias testadas, mesmo estas apresentando características morfológicas variáveis. Estes dados estão corroborados na pesquisa de Cardoso L.E & Mourão, 1994.

Com relação a alfa actina de músculo liso, foi realizada a marcação para constatar a presença de células musculares lisas (SMC).

Nas artérias aorta abdominal e coronária esquerda, com presença de espessamento difuso ou excêntrico da túnica íntima, a presença de SMC com orientação e polaridade diferente ao encontrado na túnica média foi comum, evidenciando a importância destas células no mecanismo de conformação do espessamento da túnica íntima, denominado como muscularização da íntima (Wagenseil & Mechan, 2005). Estas células possuem características de gerar matriz extracelular rica em proteoglicanos e colágeno, já que, elas são derivadas de fibroblastos. Isto tem argumentado a favor dos achados de diversas pesquisas sobre a sua participação direta na gênese da retenção de diversas moléculas que predispõem ao desenvolvimento de aterosclerose (Allahverdian et al., 2014).

A fibronectina, uma importante proteína de adesão da membrana celular às fibras colágenas, promove os meios para uma cito-arquitetura viável para as condições hemodinâmicas de cada artéria. Esta foi evidenciada na túnica íntima com

espessamento difuso, em contato com a camada de células endoteliais, sendo a aorta abdominal a que teve maior expressão, dado corroborado pela pesquisa de Fortes et al., 2012. Estes achados vinculam o remodelamento constante da túnica íntima com a proliferação de novas fibras colágenas para adaptação à dinâmica do fluxo arterial.

Com relação aos proteoglicanos, o que mais chamou nossa atenção foi o decorin, pela sua seletividade no momento da expressão, presente só na túnica adventícia das artérias estudadas, sem apresentar diferença estatística entre elas e independente das diferenças morfológicas. Este dado é compatível com outros achados feitos na túnica adventícia de artérias coronárias (Gutierrez et al., 1997; Merrilees et al., 2001) mas difere dos achados na túnica íntima e média. O Decorin está associado a processos proinflamatórios, na retenção de LDL em estágios mais avançados da patologia vascular (Neufeld et al., 2014) e na possível função de atenuação da progressão da aterosclerose (Singla et al., 2011).

As túnicas íntima e média de todas as artérias mostraram a maior expressão do proteoglicano biglican, sendo mais intenso na túnica íntima espessada da artéria coronária esquerda ao redor das células musculares lisas, este achado já foi descrito na pesquisa de Merrilees et al., 2001. Este proteoglicano está vinculado ao desenvolvimento de aterosclerose por promover retenção de LDL (Neufeld et al., 2014) e aparecer nas placas de ateromas instáveis e com erosão, diminuindo a sua expressão nas placas estáveis (Kolodgie et al., 2002).

O Lumican teve maior expressão nas túnicas média e adventícia de todas as artérias, e menor expressão na túnica íntima, estes dados diferem aos dados de Talusan et al., 2005, da presença de maior expressão na túnica íntima das artérias com maior predisposição ao desenvolvimento de aterosclerose. Este proteoglicano está ligado à migração das SMC vasculares, diminuição da proliferação celular e promoção da expressão de fatores proinflamatórios (Iozzo & Schaefer, 2010).

O proteoglicano versican, na sua isoforma v1, teve maior expressão na túnica média, seguida da túnica íntima, em forma de lagos ao redor das SMC vasculares (Gutierrez et al., 1997). Este proteoglicano é produzido pelas células musculares lisas reguladas pelo PDGF, e possui uma expressão intensa nas placas de ateroma estáveis (Kolodgie et al., 2002). Uma das suas funções principais quando expresso é manter a integridade da lesão aterosclerótica. Nossos achados são corroborados

pelo estudo de Merrilees & colaboradores, 2001, que apresentaram expressão de versican na região subendotelial.

Todos os proteoglicanos testados não apresentaram diferenças estatísticas na sua expressão e concentração nas diferentes artérias, neste caso foram pesquisadas só as proteínas presentes nos núcleo de cada um deles e não suas cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs), sendo que a variabilidade da interação e diferenciação entre um ou outro pode ser dada pela elongação destas cadeias (Cardoso & Mourão, 1994).

## CONCLUSÃO

As artérias com diversas susceptibilidades para desenvolver lesões ateroscleróticas possuem características morfológicas diferentes na constituição da túnica íntima. Sendo que as artérias com maior predisposição tendem a ter espessamento da túnica íntima.

Os diferentes componentes da matriz extracelular e tecido conjuntivo não apresentaram diferenças significativas entre as diversas artérias, sendo alguns estatisticamente significativos entre as túnicas das próprias artérias. Isso sugere que a susceptibilidade em artérias normais é mais determinada pela estrutura da cadeia de glicosaminoglicano do que pela expressão proteica presente nos núcleos dos proteoglicanos.

## REFERÊNCIAS

- Allahverdian S, Chehroudi A C, McManus B M, Abraham T and Francis G S. Contribution of Intimal Smooth Muscle Cells to Cholesterol Accumulation and Macrophage-Like Cell In Human Atherosclerosis. *Circ.*2014; 129, 15: 1551-1559.
- Barr Alstair J. The biochemical basis of disease. *Essays in Biochemistry* (2018) 62 619-642.
- Berenson G S., Srinivansan S, Bao W, Newman P. W, Tracy Richard E. Wattigney W A. Association Between Multiple Cardiovascular Risk fator and Atherosclerosis in children and Young Adults. *N. Engl J Med* 1998; 338: 1650-6.
- Bergman I, Loxley R. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Anal. Biochem.* 1963;35:1961-1965.
- Bertassoni LE, Swain MV. The contribution of proteoglycans to the mechanical behavior of mineralized tissues. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2014;38:91-104.
- Borén J, Williams KJ. The central role of arterial retention of cholesterol-rich apolipoprotein-B-containing lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis: a triumph of simplicity. *Curr Opin Lipidol.* 2016 Oct;27(5):473-83.
- Burton A C. Relation of structure to funtion of the tissues of wall of bllood vessels. *Physiol Rev* 1954, 34: 619-642.
- Cantor Jo, Keller S, Parsheley MS, Darnule TV, Darnule AT, Cerreta JM, Turino GM, Mandi I. Synthesis of crosslinked elastin by an endotelial cell culture. *Biochem Biophys Res Commun* 95: 1381-1386,1980.
- Cabral CAP, Sampaio FJB, Cardoso LEM: Analysis of the modifications in the composition of bladder glycosaminoglycan and collagen as a consequense of changes in sex hormones associated with puberty or oophorectomy in female rats. *J Urol.* 2003; 170:2512-2516.
- Cardoso LE, Little PJ, Ballinger ML, Chan CK, Braun KR, Potter-Perigo S, Bornfeldt KE, Kinsella MG, Wight TN. Platelet-derived growth factor differentially regulates the expression and post-translational modification of versican by arterial smooth muscle cells through distinct protein kinase C and extracellular signal-regulated kinase pathways. *J Biol Chem.* 2010;285:6987-95.
- Cardoso LE, Mourão PA. Glycosaminoglycan fractions from human arteries presenting diverse susceptibilities to atherosclerosis have different binding affinities to plasma LDL. *Arterioscler Thromb.* 1994; 14:115-24.

Cocciolone AJ., Jie ZH, Staiculescu MC., Johnson EO., Murshed M, Wagensiel JE. Elastin, arterial mechanics, and cardiovascular disease. *H and Cir Phys*, 01 AUG 2018 <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00087.2018>.

Denswil NP, Van der Wal AC, Ritz K, de Boer OJ, Aronica E, Troost D, Daemen MJ. Atherosclerosis in the circle of Willis: Spatial differences in composition and in distribution of plaques. *Ather*. 2016;251:78-84.

Evanko SP, Raines EW, Ross R, Gold LI, Wight TN. Proteoglycan distribution in lesions of atherosclerosis depends on lesion severity, structural characteristics, and the proximity of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta. *Am J Pathol*. 1998;152:533-46.

Fogelstrand P, Borén J. Retention of atherogenic lipoproteins in the artery wall and its role in atherogenesis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2012;22:1-7.

Forte A, Corte D, Grossi M, Finicelli M, Bancone C., Provenzano R, Pepino P, Nappi G A, Feo D M. Galderisi U, Cotroufo M, Cipollaro M, Morfological and molecular characterization of healthy human ascending aorta. *Histol Histopathol* (2012) 27: 103-112.

Fukuchi M, Watanabe J, Kumagai K, Baba S, Shinozaki T, Miura M, Kagaya Y, Shirato K. Normal and oxidized low density lipoproteins accumulate deep in physiologically thickened intima of human coronary arteries. *Lab Invest*. 2002;82:1437-47.

Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:165-97.

Gimbrone MA Jr, Garcia-Cardeña G: Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol* 22:9, 2013.

Gutierrez P, O'Brien KD, Ferguson M, Nikkari ST, Alpers CE, Wight TN. Differences in the distribution of versican, decorin, and biglycan in atherosclerotic human coronary arteries. *Cardiovasc Pathol*. 1997; 6:271-278.

Haybar H, Shahrabi S, Rezaeeyan H, Shirzad R, Saki N. Endothelial Cells: From Dysfunction Mechanism to Pharmacological Effect in Cardiovascular Disease; *Cardio Toxc* 2018. Springer Science- Nature, Doi: 10.1007/s12012-018-9493-8.

Helps SC, Thornton E, Kleining TJ, Manavi J, Vink R. Automatic nonsubjective estimation of antigen content visualized by immunohistochemistry using color deconvolution. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2012;20:82-90.

Herrington W, Lacey B, Sherliker P, Armitage J, Lewington S; Epidemiology of Atherosclerosis and potential to reduce the global burden of atherothrombotic disease; *Circ Res*. 2016; 118: 535-546.

Hinek A, Wrenn DS, Mecham RP, Barones SH. The Elastin receptor: a galactoside-binding protein. *Science* 1988, 239: 1539-154.

Holzappel GA, Niestrawska JA, Ogden RW, Reinisch AJ, Schriebl AJ. Modelling non-symmetric collagen fibre dispersion in arterial walls. *J R Soc Interface*. 2015 May 6;12(106). pii: 20150188.

Hultgärddh-Nilsson A., Borén J. and Chakravarti S. The small leucine-rich repeat proteoglycans in tissue repair and atherosclerosis (Review Symposium) *J Intern Med* 2015; 278: 447-461.

Iozzo R V and Schaefer L; Proteoglycans in health and disease: Novel regulatory signaling mechanisms evoked by the small leucine-rich proteoglycans. *FEBS J*. 2010, October; 277(19): 3864-3875.

Kaprio J, Norio R, Erkki P, Sarna S. Intimal Thickening of Coronary Arteries in Infants In relation to Family History of Coronary Artery Disease. *Circ* 1993; 87:1960-1968.

Karamanou K, Perrot G, Maquart F-X, Brézillon S. Lumican as a multivalent effector in wound healing. *Adv Dr Del Re* 129 (2018) 344-351.

Khalil MF, Wagner WD, Goldberg IJ. Molecular interactions leading to lipoprotein retention and the initiation of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:2211-8.

Kim E K, Maldonado AA., Jeong WS, Hong JP, Song D H., Microvascular vessel preparation: What are we really removing during adventitial stripping?. *J Plast, Recons and Aesthe Surg* (2015) 68, 1568-1573.

Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Weber DK., Kuytys R, Wight TN, Virmani R. Differential Accumulation Of Proteoglycans and Hyaluronan in Culprit Lesions, Insights Into Plaque Erosion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 2: 1642-1648.

Marzoll A, Melchior BA, Cipollone F, Fischer JW. Small Leucine-rich proteoglycans in atherosclerotic lesions: novel targets of chronic stain treatment? *J.Cell. Mol. Med*. Vol 15, No 2, 2011 pp. 232-243.

Matsuzawa Y, Lerman A. Endothelial dysfunction and coronary artery disease: assessment, prognosis, and treatment. *Coron Artery Dis*. 2014; 25:713-24.

Merrilees MJ., Brent B and Scott LJ. Comparison of deposit of Versican, biglycan and Decorin in saphenous vein and internal thoracic, radial and coronary arteries: correlation to patency. *Coron Artery Dis* 2001, 12:7-16

Mikko JJ, Laura J, Kirsti N-S, Kerttu I, Tapani R, Jaakko JH, David SC, Olli TR. Increased Aortic Intima-Media Thickness. A Marker of Preclinical Atherosclerosis in High-Risk Children. *Circ* 2001; 104: 2943-2947.

Nakashima Y, Fujii H, Sumiyoshi S, Wight TN, Sueishi K. Early human atherosclerosis: accumulation of lipid and proteoglycans in intimal thickening followed by macrophage infiltration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:1159-65.



Nakashima Y, Wight TN, Sueishi K. Early atherosclerosis in humans: role of diffuse intimal thickening and extracellular matrix proteoglycans. *Cardiovasc Res*. 2008 ;79:14-23.

Nakashima Y, Chen Y-X, Kinukawa N, Sueishi K, Distributions of diffuse intimal thickening in human arteries: preferential expression. In atherosclerosis-prone arteries from an early age, *Virchows Arch* (2002) 441:279-288.

Nastasse MV, Young Marian F, Schaefer L. Biglycan: A multivalent proteoglycan providing structure and signals. *J of Histochem & Cytochem* 60 (12) 963-975, 2012.

Neufeld EB, Zadrozny LM, Phillips D, Aponte A, Yu Z-X, BS. Decorin and biglycan retain LDL in disease-prone valvular and aortic subendothelial intimal matrix; *Atheroscler* 2014 March; 233(1): 113-121.

Oikonomou, EK., Antoniadou C; The Role of adipose tissue in cardiovascular health and disease; *Nat. Rev Cardiol*. 2018 Oct 4. doi: 10.1038/s41569-018-0097-6.

Onda M, Ishiwata T, Kawahara K, Wang R, Natio Z, Sugisaki Y. Expression of Lumican in thickened intima and smooth muscle cells in human coronary atherosclerosis. *Exp Mol Pathol* ,2002, 72: 142-149.

Otsuka F, Kramer MC, Woudstra P, Yahagi K, Ladich E, Finn AV, de Winter RJ, Kolodgie FD, Wight TN, Davis HR, Joner M, Virmani R. Natural progression of atherosclerosis from pathologic intimal thickening to late fibroatheroma in human coronary arteries: A pathology study. *Atheroscler*. 2015; 241:72-82.

Otsuka F, Joner M, Prati F, Virmani R, Narula J. Clinical classification of plaque morphology in coronary disease. *Nat. Rev. Cardiol*. 11, 379-389 (2014).  
Pankov R and Yamada KM. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* 115, 2002, pp. 3861-3863.

Pesonen E, Kaprio J, Pentti M and Ruismäki A. Topography of intimal thickening in the left coronary artery of children compared with the topography of atherosclerosis. *Cor Art Dis* 1996, 7:459-465.

Raitakari OT, Markus J, Mika K, Leena T, Tomi L, Noora M-T, Mikko JJ, Matti U, Eero J, Tapani R, Hans K. A, Jorma SAV. Cardiovascular Risk Factor In childhood and Carotid Artery Intima-Media Thickness in Adulthood, The cardiovascular risk in Young Finns Study. *JAMA*. 2003, 290: 2277-2283.

Roberts Jr JC, Moses C, Wilkins RH. Autopsy studies in atherosclerosis distribution and severity of atherosclerosis in patients dying without morphologic evidence of atherosclerotic catastrophe. *Circ* 1959; 20: 511-519.

Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-26.

Rudolf J, Lewandrowski KB. Cholesterol, lipoproteins, high-sensitivity c-reactive protein, and other risk factors for atherosclerosis. *Clin Lab Med*. 2014;34:113-27.

Sakakura K, Nakano M, Otsuka F, Ladich E, Kolodgie FD, Virmani R. Pathophysiology of atherosclerosis plaque progression. *Heart Lung Circ.* 2013;22:399-411.

Singla S, Hu C, Mizeacki A and Mehta JL. Decorin in Atherosclerosis. *Ther Adv Cardiovas Dis* (2011) 5(6) 305-314.

Skalén K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hultén LM, Wiklund O, Innerarity TL, Borén J. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nat* 2002;417:750-4.

Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, Glagov S, Insull W Jr, Richardson M, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, et al. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb.* 1992 Jan;12(1):120-34. PMID:1731855.

Subbotin VM. Excessive Intimal Hyperplasia in Human coronary arteries before intimal lipid deposition is the initial of coronary atherosclerosis and constitutes a therapeutic target. *Dr Disc T*, Vol. 21; no.10; oct 2016.

Tabas I, Williams KJ, Borén J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circ.* 2007;116:1832-44.

Talusan P, Bedri S, Yang S, Kattapuram T, Silva N, Roughley PJ, Stone JR. Analysis of intimal proteoglycans in atherosclerosis-prone and atherosclerosis-resistant human arteries by mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* 2005;4:1350-7.

Tavora F, Cresswell N, Li L, Ripple MF, Burke A. Sudden Coronary Death Caused by Pathologic Intimal Thickening without atheromatous plaque formation. *Cardio Pathol* 20 (2011) 51-57.

Tonar Z, Tomášek P, Loskot P, Janáček J, Králíčková M, Witter K. Vasa vasorum in the tunica media and tunica adventitia of porcine aorta; *Ann of Anat* 2015 (2016) 22-36.

Townsley MI. Structure and composition of pulmonary arteries, capillaries and veins. *Compr Physiol.* ; 2013, 2: 675-709.

Velican C and Velican D. Some Particular Aspect of the Microarchitecture of Human Coronary Arteries. *Atheroscler*, 33 (1979) 191-200.

Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons From Sudden Coronary Death, A Comprehensive Morphological Classification Scheme for Atherosclerotic Lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* May 2000; 20:1262-1275.

Wagenseil JE, Mecham RP. Vascular Extracellular Matrix and Arterial Mechanisms. *Physiol Rev* 89:957-989, 2009.

Wight TN, Kinsella MG, Evanko SP, Perigo PS, Merrilees MJ. Versican and the Regulation of cell phenotype in disease. *Biochim et Biophys Acta* 1840 (2014) 2441-2451.

Yamada K M And Clark RAF. Provisional matrix. In *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*, Plen Press 1996, New York 51-93.

Yusuf S, Rangarajan S, Teo K, Islam S, Li W, Liu L, Bo J, Lou Q, Lu F, Liu T, Yu L, Zhang S, Mony P, Swaminathan S, Mohan V, Gupta R, Kumar R, Vijayakumar K, Lear S, Anand S, Wielgosz A, Diaz R, Avezum A, Lopez-Jaramillo P, Lanas F, Yusuf K, Ismail N, Iqbal R, Rahman O, Rosengren A, Yusufali A, Kelishadi R, Kruger A, Puoane T, Szuba A, Chifamba J, Oguz A, McQueen M, McKee M, Dagenais G; Cardiovascular risk and events in 17 low-, middle-, and high-income countries. *N Engl J Med*. 2014;371:818-27.

**ANEXO \_ Parecer do Comitê de ética e pesquisa****PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** ESTUDO DA MATRIZ EXTRACELULAR PROSTÁTICA E ARTERIAL E SUA RELAÇÃO COM PATOLOGIAS ESPECÍFICAS DESSES TECIDOS.

**Pesquisador:** LUIZ EDUARDO DE MACEDO CARDOSO

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 87593018.8.0000.5259

**Instituição Proponente:** Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

**Patrocinador Principal:** FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.612.067