

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA, HISTOQUÍMICA E
IMUNOISTOQUÍMICA DA VÁLVULA MITRAL NORMAL E COM
DEGENERAÇÃO MIXOMATOSA DE CÃES E SUÍNOS**

Leonardo dos Reis Corrêa
Orientadora: Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura

GOIÂNIA
2009

LEONARDO DOS REIS CORRÊA

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA, HISTOQUÍMICA E
IMUNOISTOQUÍMICA DA VÁLVULA MITRAL NORMAL E COM
DEGENERAÇÃO MIXOMATOSA DE CÃES E SUÍNOS**

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração:

Patologia, Clínica e Cirurgia Animal

Orientadora:

Prof.^a Dr.^a Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura (EV/UFG)

Comitê de Orientação:

Prof.^a Dr.^a Rosângela de Oliveira Alves (EV/UFG)

Prof. Titular Luiz Augusto Batista Brito (EV/UFG)

GOIÂNIA

2009

**Dados internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BNC/UFG**

C824a Corrêa, Leonardo dos Reis.
Avaliação histológica, histoquímica e imunoistoquímica da válvula mitral normal e com degeneração mixomatosa de cães e suínos [manuscrito] / Leonardo dos Reis Corrêa. - 2009.
xv, 74 f. : il. figs, tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura: Co-Orientadores: Prof^a Dr^a Rosângela de Oliveira Alves, Prof. Luiz Augusto Batista Brito.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária, 2009.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, tabelas e abreviaturas.

1. Cães - Válvula mitral – Degeneração 2. Suínos - Válvula mitral – Degeneração. 3. Histopatologia veterinária – Avaliação. 4. Endocardiose – Medicina veterinária I. Título.

CDU:619:616.126.42:636.4+636.7

LEONARDO DOS REIS CORRÊA

Dissertação defendida e aprovada em 29/10/2009, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dra. Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura
(ORIENTADOR (A))



Prof. Dr. Anilton César Vasconcelos – ICBA/UFMG



Prof. Dr. Adilson Donizeti Damasceno

Dedico este trabalho aos meus pais,
Edson (*in memorian*) e Derly Maria (*in memorian*)
por acreditarem em meus sonhos
e por não terem medido esforços
para que esses se realizassem.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder saúde para realização deste trabalho.

À minha esposa Carin, pelo amor, paciência, ajuda indispensável e por estar sempre ao meu lado, principalmente nos momentos de muita dor nesse período.

À minha filha Mariana, fonte de permanente inspiração e alegria em minha vida.

À professora Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura, pela orientação, amizade e por ter acreditado e depositado confiança no trabalho por mim desempenhado.

Ao Comitê de Orientação, constituído pelos professores Luiz Augusto Batista Brito e Rosângela de Oliveira Alves, pela co-orientação e importantes sugestões apresentadas durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao grande amigo José Belarmino da Gama Filho, pelo incentivo para ingressar no programa de pós-graduação, pelo grande apoio e ajuda na confecção deste trabalho.

À pós-graduanda Mariana Batista Rodrigues Faleiro, pela participação indispensável, amizade e ajuda durante a realização do experimento.

Aos alunos do Setor de Patologia Animal (EV/UFG), especialmente para Ramon Gomes Mesquita e Hidelbrando Ricardo Domenegueti Amaral, pela grande colaboração.

Ao técnico em histologia, Antônio Souza Silva, do Laboratório de Patologia Animal da EV/UFG, pela amizade e ajuda em todo o processo de confecção das lâminas.

À empresa Frigorífico Sol Nascente, representada pelos senhores Marcelo Rodrigues da Silva e Ismael Marcelino Guimarães, pela possibilidade de acesso e colheita das válvulas de suínos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da EV/UFG e ao seu corpo docente, pelos ensinamentos que foram de grande importância em minha formação e realização deste trabalho.

Aos Médicos Veterinários do Centro Veterinário Asa Sul, pela amizade, companheirismo e ajuda, bem como aos funcionários que sempre estiveram dispostos a cooperar no desenvolvimento do meu trabalho.

À Professora Renée Laufer Amorim e seus alunos de pós-graduação, especialmente a doutoranda Marcela Marcondes Pinto Rodrigues, pela ajuda na realização dos testes imunoistoquímicos.

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS.

SUMÁRIO

RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1.1. Aparelho Mitral.....	1
1.2. Degeneração mixomatosa da válvula mitral (DMVM).....	3
1.3. Metaloproteinases.....	9
1.4. Óxido nítrico.....	11
Referências.....	13

CAPÍTULO 2 - PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NO REMODELAMENTO DA MATRIZ EXTRACELULAR E NA DEGENERAÇÃO MIXOMATOSA DA VÁLVULA MITRAL DE CÃES E SUÍNOS

Resumo.....	19
Abstract.....	21
Introdução.....	22
Material e métodos.....	23
<i>a) Animais.....</i>	23
<i>b) Delineamento experimental.....</i>	24
<i>c) Análise estatística.....</i>	26
Resultados.....	26
<i>a) cães.....</i>	26
<i>b) suínos.....</i>	30
Discussão.....	33
Conclusões.....	35
Referências.....	35

CAPÍTULO 3 - ASPECTOS HISTOLÓGICOS E EXPRESSÃO DE MMP-2 E MMP-9 NA VÁLVULA MITRAL DE CÃES E DE SUÍNOS

Resumo.....	39
Abstract.....	40
Introdução.....	41
Material e métodos.....	42
a) <i>Animais</i>	42
b) <i>Delineamento experimental</i>	43
c) <i>Análise estatística</i>	45
Resultados.....	46
a) <i>cães</i>	46
b) <i>suínos</i>	49
Discussão.....	50
Conclusões.....	53
Referências.....	54
 CAPITULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	 57

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Figura 1	Fotomicrografia da válvula mitral. (A) camada atrial, (E) camada esponjosa, (F) camada fibrosa, (V) camada ventricular. HE.....	2
Figura 2	Válvula mitral canina. (A) Aspecto macroscópico normal do folheto anterior da válvula mitral. (B) Aspecto macroscópico do folheto anterior da válvula mitral com alterações características da DMVM.....	5
Figura 3	Fotomicrografia da válvula mitral de cão com endocardiose. (A) Acentuada deposição de MPS (MPS). Alcian blue. (B) Degeneração do colágeno (DC). HE.....	7
Figura 4	Reação de conversão de L-arginina para L-citrulina e NO, utilizando a forma reduzida da NADPH como cofator. Fonte: DUSSE et al. (2003).....	12

CAPÍTULO 2 - PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NO REMODELAMENTO DA MATRIZ EXTRACELULAR E NA DEGENERAÇÃO MIXOMATOSA DA VÁLVULA MITRAL DE CÃES E SUÍNOS

Figura 1	Válvula mitral canina. A), C) e E) Folheto anterior mitral normal, com endocardiose moderada e discreta, respectivamente, antes da reação de NAPH-d. B), D) e F) Folheto anterior mitral normal (azul claro), com endocardiose moderada (azul escuro) e discreta (preta), respectivamente, após a reação de NAPH-d.....	27
Figura 2	Fotomicrografia da válvula mitral de cão com endocardiose. (A) Acentuada deposição de MPS (MPS). Alcian blue. (B) Degeneração do colágeno (DC). HE.....	29
Figura 3	Figura 3 - Fotomicrografia da válvula mitral de cão. A) Normal. Camadas atrial (A), esponjosa (E), fibrosa (F) e ventricular (V). B) Endocardiose. Ausência da estrutura valvular em camadas. Masson.....	30
Figura 4	Válvula mitral suína. A) e C) Folheto anterior mitral de suínos jovem e matriz, respectivamente, antes da reação de NAPH-d. B) e D) Folheto anterior mitral dos mesmos animais de A) e C) sem coloração após a reação ao NADPH-d.....	31
Figura 5	Figura 5 - Válvula mitral suína. A) e C) Normais. Manutenção da estrutura valvular em camadas. Da esquerda para a direita camadas atrial, esponjosa, fibrosa e ventricular. Colorações HE e Alcian, respectivamente. B) Degeneração do colágeno. HE. D) Deposição de mucopolissacarídeos. Alcian blue.....	32

CAPÍTULO 3 – ASPECTOS HISTOLÓGICOS E EXPRESSÃO DE MMP-2 E MMP-9 NA VÁLVULA MITRAL DE CÃES E DE SUÍNOS

Figura 1	Válvula mitral canina. A) e B) Aspectos macroscópico e microscópico (coloração de HE) do folheto anterior mitral sem sinais de degeneração mixomatosa, respectivamente. C) e D) Aspectos macroscópico e microscópico (coloração de HE) do folheto anterior com DMVM.....	46
Figura 2	Fotomicrografias de válvula mitral canina. IHQ. A) Ausência de marcação para o anticorpo MMP-2. B) Células da camada fibrosa com marcação para o anticorpo MMP-2 (setas). C) Ausência de marcação para o anticorpo MMP-9. D) Células das camadas atrial e esponjosa marcadas com MMP-9 (setas).....	48
Figura 3	Válvula mitral suína. A) Aspecto macroscópico do folheto anterior mitral sem sinais de degeneração mixomatosa. B) Estrutura morfológica valvular microscópica em camadas. Da esquerda para a direita, atrial, esponjosa, fibrosa e ventricular. HE.....	49
Figura 4	Fotomicrografia de válvula mitral suína. IHQ. A) Camada esponjosa de mitral de suíno jovem com células marcadas para MMP-9 em intensidade discreta. B) Camada esponjosa de mitral de matriz com células marcadas para MMP-9 em intensidade acentuada.....	50

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 - PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NO REMODELAMENTO DA MATRIZ EXTRACELULAR E NA DEGENERAÇÃO MIXOMATOSA DA VÁLVULA MITRAL DE CÃES E SUÍNOS

Tabela 1	Critérios de avaliação microscópica das válvulas caninas e suínas.....	25
Tabela 2	Comparação entre a deposição de MPS e degeneração do colágeno no folheto anterior da válvula mitral canina e a reação de NADPH-d.....	28
Tabela 3	Comparação entre a intensidade da reação de NADPH-d e o grau de endocardiose no folheto anterior da válvula mitral canina.....	29
Tabela 4	Avaliação microscópica das válvulas suínas às colorações de HE, Alcian Blue e Masson de acordo com a idade.....	32

CAPÍTULO 3 - EXPRESSÃO DE MMP-2 E MMP-9 NA VÁLVULA MITRAL DE CÃES E DE SUÍNOS

Tabela 1	Critérios de avaliação microscópica das válvulas caninas e suínas.....	44
Tabela 2	Comparação entre a deposição de MPS e degeneração do colágeno na área apical do FAVM do cão e o grau de endocardiose.....	47
Tabela 3	Valores do coeficiente de Spearman obtidos na comparação entre a intensidade de marcação (I) e número de células marcadas (CM) por MMP-2 e MMP-9 nas camadas atrial, esponjosa, fibrosa e ventricular do ápice do FAVM do cão com o grau de endocardiose.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

DMVM	Degeneração mixomatosa da válvula mitral
eNOS	Sintase do óxido nítrico endotelial
FAVM	Folheto anterior da válvula mitral
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinases
MMVD	Myxomatous mitral valve degeneration
MPS	Mucopolissacarídeos
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH-d	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato diaforescência
NOS	Sintase de óxido nítrico
NO	Óxido nítrico
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase

RESUMO

A degeneração mixomatosa da válvula mitral (DMVM) ou endocardiose mitral é uma doença do endocárdio valvular relacionada com a idade e caracterizada por acúmulo de mucopolissacarídeos (MPS) e degeneração do colágeno na mitral de várias espécies mamíferas, sendo observada com maior frequência em humanos, cães e suínos. Metaloproteinases (MMP) são enzimas proteolíticas dependentes do zinco, responsáveis pelo remodelamento da matriz extracelular (MEC) em processos normais e patológicos de vários tecidos. A alteração na expressão e a distribuição valvular dessas enzimas estão envolvidas na gênese da DMVM. Da mesma forma, substâncias vasoativas como o óxido nítrico (NO) tem papel importante no desenvolvimento da endocardiose. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar as alterações histológicas, a expressão da sintase de óxido nítrico (NADPH-d), e o padrão de marcação imunistoquímica de MMP-2 e MMP-9 no folheto anterior da válvula mitral normal e com endocardiose de cães, de suínos jovens e matrizes. Para isso, realizaram-se dois experimentos. No primeiro foram utilizadas 12 mitrais de cães adultos a idosos, 22 válvulas de suínos, 10 de animais com idade de sete e oito meses, e 12 mitrais de matrizes entre cinco e seis anos. As válvulas foram avaliadas macroscopicamente quanto ocorrência ou não de endocardiose, colhidas, fixadas em paraformaldeído a 4%, submetidas à reação de NADPH-d, incluídas em parafina e avaliadas microscopicamente quanto à deposição de mucopolissacarídeos (MPS), degeneração do colágeno, fibrose e grau de endocardiose. Nas válvulas caninas quanto maior a intensidade da reação de NADPH-d, maiores eram o grau de endocardiose, a deposição de MPS e a degeneração do colágeno. Nas válvulas suínas não houve coloração à reação de NADPH-d. Com isso, concluiu-se que o NO atua na mitral canina, remodelando a MEC e participando da patogenia da endocardiose mitral nessa espécie. Na mitral suína sugere-se a ação restrita do NO no remodelamento da MEC ou diferenças estruturais na válvula desta espécie, já que não houve reação ao NADPH-d e lesões macroscópicas de endocardiose. No segundo estudo foram utilizadas 25 mitrais de cães adultos e idosos e 32 válvulas de suínos, sendo 10 de animais com idade de sete e oito meses, e 22 mitrais de matrizes entre cinco e seis anos. As válvulas foram avaliadas macroscopicamente quanto ocorrência ou

não de endocardiose, fixadas em paraformaldeído a 4%, incluídas em parafina, submetidas à reação de imunistoquímica e avaliadas microscopicamente quanto à intensidade de marcação e número de células marcadas, quanto à deposição de MPS, degeneração do colágeno e fibrose. Nos cães, concluiu-se que a DMVM é caracterizada por acúmulo de MPS e degeneração do colágeno, que estão diretamente relacionadas ao grau de endocardiose e, conseqüentemente, à gravidade da doença valvular. Ainda, as enzimas MMP-2 e MMP-9 estão envolvidas na degeneração mixomatosa da válvula canina. Em suínos, mesmo na ausência macroscópica de endocardiose podem ser observadas alterações como deposição de MPS, degeneração do colágeno e fibrose, sendo esta última evidente em matrizes. Também, nesses animais há expressão constitutiva de MMP-2 e MMP-9, sugerindo a participação dessas enzimas no remodelamento da MEC valvular mitral normal em suínos jovens e matrizes.

Palavras-chave: endocardiose, óxido nítrico, NADPH, MMP, TIMP.

ABSTRACT

Myxomatous mitral valve degeneration (MMVD) or mitral valve endocardiosis is an endocardial age-related disease characterized by the mucopolysaccharide (MPS) accumulation and by collagen degeneration in mitral valves of many species, especially in humans, dogs and swine. Metalloproteinases (MMP) are proteolytic enzymes responsible for the extracellular matrix (ECM) remodelling in regular and pathological tissue. It has been suggested that the changing of the valvular distribution of these enzymes might be responsible for MMVD genesis. Likewise, vasoactive substances like nitric oxide (NO) played a role in the endocardiosis development. The aim of this study was to evaluate the histological changes, the expression of nitric oxide synthase (NADPH-d) and the immunohistochemical localization of MMP-2 and MMP-9 in the anterior leaflet in dogs and swine with regular mitral valves and those with endocardiosis. For this purpose, two experiments were done. First, 12 mitral valves of dogs and 22 of swine were analyzed. Valves were fixed in a 4% paraformaldehyde, exposed to NADPH-d reaction, processed routinely and microscopically evaluated for the detection of MPS deposition, collagen degeneration and fibrosis. In dogs, very high intensity reaction to NADPH-d was associated with higher endocardiosis degree and with presence of MPS deposition as well as collagen degeneration. There was no alteration in colour during the swine valves reaction to NADPH-d. In conclusion, NO works in canine mitral valves, remodeling MEC and playing a role in dogs mitral endocardiosis disease. In swine, it is suggested that NO has restricted action in MEC or there are major differences on the structures of swine valves because there was no reaction to NADPH-d and absence of macroscopical endocardiosis lesions. For the second study, 25 mitral valves of dogs and 32 valves of swine were also analyzed. Valves were macroscopically evaluated for the occurrence or not of endocardiosis. They were fixed in a 4% paraformaldehyde, routinely processed and submitted to immunohistochemical reaction and microscopically evaluated for the intensity of antigen labelling and for the number of positive cells, as well as MPS deposition, collagen degeneration and fibrosis. In dogs, DMVM is characterized by MPS accumulation. This collagen deposition and degeneration are directly related to the endocardiosis level. The

MMP-2 and MMP-9 enzymes are involved in dogs myxomatous mitral valve degeneration process. In swine, even with the lack of microscopical endocardiosis there was observed some MPS deposition changes, especially in females. In these animals valves there are constitutive expression of MMP-2 and MMP-9, what suggests the action of these enzymes in the normal MEC mitral valvular remodeling in young and old female pigs.

Keywords: endocardiosis, nitric oxide, NADPH, MMP, TIMP.

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1.1. Aparelho mitral

A estrutura anatômica que regula o fluxo de sangue no orifício mitral denomina-se aparelho ou complexo mitral (FENOGLIO et al., 1972). A função deste é a de manter a válvula amplamente aberta durante a diástole, para permitir o correto preenchimento do ventrículo, e fechar o orifício atrioventricular sem permitir o refluxo do sangue durante a sístole ventricular (MUCHA, 2003).

O aparelho mitral é composto pela parede posterior do átrio esquerdo, pelo anel mitral, pela válvula mitral (composta por um folheto septal ou anterior e outro parietal ou posterior), pelas cordoalhas tendíneas, pelos músculos papilares e pela parede livre do ventrículo esquerdo (ABBOTT, 2006; MUCHA, 2002). Os folhetos da mitral estão ligados aos músculos papilares pelas cordoalhas tendíneas. O ápice do folheto é firme e opaco e as demais partes transparentes. O anel mitral é fibroso e está situado entre o átrio e o ventrículo esquerdo (DISATIAN, 2008).

A válvula mitral é uma complexa estrutura de camadas composta de células endoteliais, intersticiais e matriz extracelular (MEC). Cada camada do folheto valvular é rica em um componente específico de MEC que tem funções diferentes na acomodação da forma e dimensão do folheto valvular durante o ciclo cardíaco (DISATIAN, 2008). Os folhetos da válvula mitral são constituídos por quatro camadas: endocárdio atrial (superfície *atrialis*), *pars espongiosa*, *pars fibrosa* e endocárdio ventricular (superfície *ventricularis*) (Figura 1) (MUCHA, 2002).

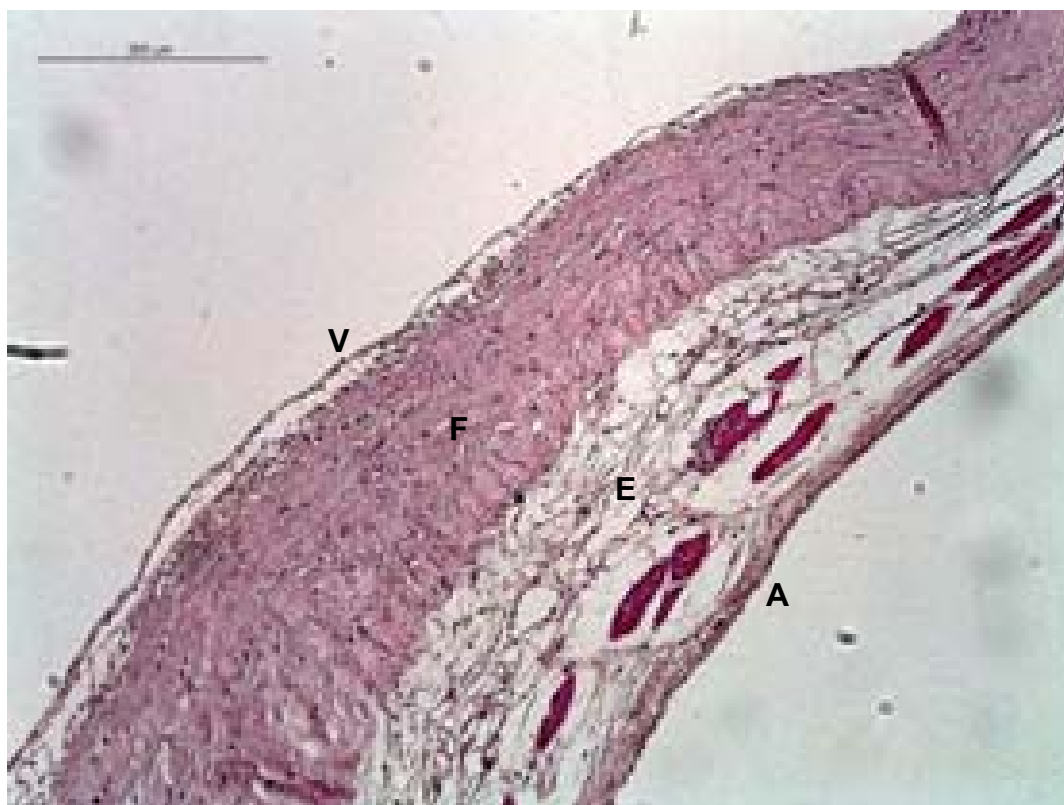


FIGURA 1 - Fotomicrografia da válvula mitral canina. (A) camada atrial, (E) camada esponjosa, (F) camada fibrosa, (V) camada ventricular. HE.

O endocárdio que reveste as superfícies valvulares é similar ao das cordoalhas tendíneas, diferenciando-se apenas em alguns aspectos. As células do endocárdio atrial são redondas, com núcleo grande e irregular e apresentam estruturas densas no citoplasma, enquanto que as das cordoalhas tendíneas e do ventrículo são células aplanadas, com núcleo ovóide e estrutura citoplasmática atenuada (FENOGLIO et al., 1972).

A *pars esponjosa* é constituída principalmente por tecido adiposo, sendo este mais abundante nos terços proximal e médio. Na zona distal, junto ao tecido adiposo, encontram-se feixes de colágeno isolados, fibras elásticas espalhadas e mucopolissacarídeos (MPS), principalmente de ácido hialurônico e de sulfato de condroitina, sendo que um espessamento desta área coincidente com a borda de contato valvular (MUCHA, 2002).

A *pars fibrosa* é uma faixa densa de colágeno que dá forma ao esqueleto da válvula (TAMURA et al., 1995), estendendo-se até a estrutura

central de colágeno das cordoalhas tendíneas (MUCHA, 2002). No ponto de inserção das cordoalhas tendíneas, na válvula e próximo ao bordo livre, o tecido fibroso é pobremente definido, mas ainda distingue-se como faixa. Há relação estrutural de continuidade entre o anel, o esqueleto da válvula e a cordoalha tendínea, formando uma estrutura fibrosa única. Nestas áreas, a união entre a *pars esponjosa* e *fibrosa* é pouco diferenciada e com fusão aparente entre os feixes de colágeno e substância fundamental das duas faixas. Na borda livre, esta diferença é mais evidente, sendo a mesma composta quase inteiramente pela *pars esponjosa* (FENOGLIO et al., 1972; MUCHA, 2002).

A superfície *ventricularis* constitui-se por uma camada de células endocárdicas, derivadas do endocárdio ventricular e de tecido subendocárdico não tão desenvolvido como o da superfície *atrialis*. No terço proximal, mais perto do anel, verificam-se fibras musculares, que tendem a reduzir em número na área média e a não existir na zona distal (FENOGLIO et al., 1972; MUCHA, 2002).

O fechamento da válvula mitral ocorre secundariamente a ação de cada componente do aparelho mitral. Assim, durante a sístole do átrio esquerdo, o sangue passa pelo orifício mitral e a válvula fecha quando a pressão do átrio fica menor que a do ventrículo. Com a ajuda dos músculos papilares, os folhetos da mitral movem-se juntos no começo da sístole ventricular e, conforme a sístole progride, a pressão aumenta no ventrículo e causa união firme dos folhetos valvulares. As cordoalhas tendíneas e os músculos papilares agem como suporte para a junção dos folhetos, impedindo a protusão valvular para a face atrial durante a sístole ventricular (DISATIAN, 2008)

1.2. Degeneração mixomatosa da válvula mitral (DMVM)

A degeneração mixomatosa da válvula mitral (DMVM) ou endocardiose mitral é um processo distrófico e degenerativo valvular que acomete várias espécies mamíferas (SAVAGE et al., 1983; GUARDA et al., 1988; CASTAGNARO et al., 1997; AMORESANO et al., 2000), sendo caracterizada pelo acúmulo de MPS, particularmente o ácido hialurônico, na matriz extracelular (MEC) dos folhetos da mitral (AMORESANO et al., 2000). A DMVM é observada com maior

frequência nas espécies humana, canina e suína (PEDERSEN & HÄGGSTRÖM, 2000; PEDERSEN et al., 2007).

Em humanos, a lesão é clinicamente denominada degeneração mixomatosa ou prolapso da valva mitral e tem sido associada a doenças congênitas do colágeno, como a síndrome de Marfan e a síndrome de Ehlers-Danlos, assim como à osteogênese imperfeita (AMORESANO et al., 2000). No cão, sabe-se há algum tempo que a DMVM é semelhante macroscopicamente e microscopicamente ao prolapso primário que ocorre na válvula mitral da espécie humana (KOGURE; 1980).

A DMVM é a doença cardíaca de maior prevalência em cães (MUCHA, 2003; OLSEN et al., 2003) e acomete grande porcentagem da população geriátrica nesta espécie, tendo altos índices de morbidade e mortalidade (ABBOTT, 2006; WARE, 2006). Estudos epidemiológicos identificaram incidência de 17 a 40% na população canina, estimando-se que a endocardiose represente aproximadamente 75 % das doenças cardíacas em cães (DELWEILER & PATTERSON, 1965; DAS & TASHIJAN, 1965).

A endocardiose está diretamente relacionada à idade, é mais comum em cães entre oito e 11 anos e apresenta maior incidência em animais de pequeno porte, assim como maior prevalência nos machos. Entre as raças mais afetadas encontram-se a Pequines, a Dachshund, a Poodle, a Shi Tzu, a Cavalier King Charles e, em geral, as *de pequeno porte* (ABBOTT, 2006; MUCHA, 2003; SERFASS et al., 2006; WARE, 2006).

WHITNEY (1974) observou que 58% dos cães com idade superior a nove anos apresentavam alterações evidentes de DMVM. SERFASS et al. (2006), em um estudo retrospectivo com 942 cães de seis raças de pequeno porte (York Shire, Bichon Maltese, Dachshund, Poodle, Lhasa Apso e Shi Tzu), observaram sopro sistólico em 14,4% dos cães, sendo maior a prevalência em machos (18,5%) do que em fêmeas (9,8%) e das seis raças examinadas, o sopro foi maior em Poodles e Dachshunds, com 22,7% e 22,2%, respectivamente. Já CHETBOUL et al. (2004) obtiveram 40,6% de sopro relacionado a DMVM em cães da raça Cavalier King Charles Spaniel. Nesse contexto, a raça Cavalier King Charles Spaniel é conhecida como especialmente predisposta a DMVM, sendo reportada a presença de sopro devido à regurgitação de mitral em 50% dos cães com idade

entre cinco e seis anos (DARKE, 1987). Em outro estudo com cães da raça Cavalier King Charles Spaniel foi observado sopro sistólico apical em 9% dos animais com menos de um ano, 56% dos cães com até quatro anos e em 100% daqueles com mais de dez anos (BEARDOW & BUCHAMAN, 1993), confirmando a alta prevalência nessa raça canina.

A incidência e a severidade da DMVM em suínos estão fortemente relacionadas à idade. A ocorrência em suínos jovens é menor e as mudanças valvulares são moderadas, enquanto que em suínos com três a quatro anos de idade pode chegar à 90% ou mais (CASTAGNARO et al., 1997). A válvula torna-se progressivamente espessada e insuficiente com a evolução da doença (KOGURE, 1980; OLSEN et al., 2003).

A aparência macroscópica comum dos folhetos da válvula mitral com degeneração mixomatosa é caracterizada por espessamento, opacidade e diversos graus de retração do folheto, com nódulos nas extremidades da válvula e cordoalhas tendíneas alongadas (KVART et al., 2000; MUCHA, 2002) (Figura 2).



FIGURA 2 - Válvula mitral canina. (A) Aspecto macroscópico normal do folheto anterior da válvula mitral. (B) Aspecto macroscópico do folheto anterior da válvula mitral com alterações características da DMVM.

A progressiva mudança mixomatosa valvular possivelmente representa resposta para o repetido impacto, levando a uma disfunção endotelial (OLSEN et al., 2003; DURBIN & GOTLIEB, 2002). O endotélio valvular também pode ser danificado pela sua movimentação alterada, com fechamento anormal, e pelas

mudanças nas forças hemodinâmicas devido ao prolapso e à regurgitação mitral (STEIN et al., 1989; OLSEN et al., 2003).

O espessamento tem relação direta com o grau de incompetência valvular, sendo esta degeneração mais evidente no terço distal da válvula (MUCHA, 2002). As mudanças da DMVM começam primariamente na borda livre do folheto valvular e são aparentemente pronunciadas nas áreas de inserção das cordas tendíneas. Com a progressão da doença, as lesões degenerativas estendem-se da borda livre para as demais porções do folheto valvular. Em estágios avançados da doença, o folheto valvular torna-se opaco, engrossado e nodular. Nesses casos, as cordoalhas tendíneas estão aumentadas e engrossadas, principalmente na porção proximal, podendo ocorrer ruptura deste componente do aparelho mitral (DISATIAN, 2008; MUCHA, 2002).

WHITNEY (1974) classificou a degeneração mixomatosa valvular em quatro tipos, sendo esta modificada por KOGURE (1980) em três categorias, a saber: classe I - poucos e discretos nódulos coalescentes na área de contato valvular, sem engrossamento das cordoalhas; classe II - nódulos grandes coalescendo e formando deformidades do tipo placa na área de contato, sendo que as lesões estendem-se até as cordoalhas tendíneas, mas sem ruptura das mesmas; e classe III - espessamento e nodulação acentuados de todo folheto valvular, com alongamento e ocasional ruptura das cordoalhas tendíneas.

Outras alterações morfológicas em cães afetados pela DMVM incluem dilatação do átrio esquerdo, dilatação do anel da válvula mitral e hipertrofia do ventrículo esquerdo (DISATIAN, 2008).

Os achados histológicos da DMVM incluem a deposição de MPS e a fragmentação do feixe de colágeno e das fibras elásticas (Figura 3). O estudo realizado por KOGURE (1980) determinou que a deposição de MPS inicia-se na camada esponjosa. Com a progressão da doença, o feixe de colágeno da camada esponjosa e a camada fibrosa tornam-se fragmentados, em forma de ninho e desorganizados. O acúmulo de MPS aumenta e invade ainda mais a camada fibrosa, deslocando fragmentos de colágeno rompidos para o interior desta camada. Nos estágios avançados de degeneração, não é possível a distinção entre as camadas esponjosa e fibrosa do folheto. Adicionalmente, a deposição de MPS estende-se às cordoalhas tendíneas. Ainda, em válvulas

severamente afetadas, a fibrose pode envolver as camadas atrial e ventricular (DISATIAN, 2008).

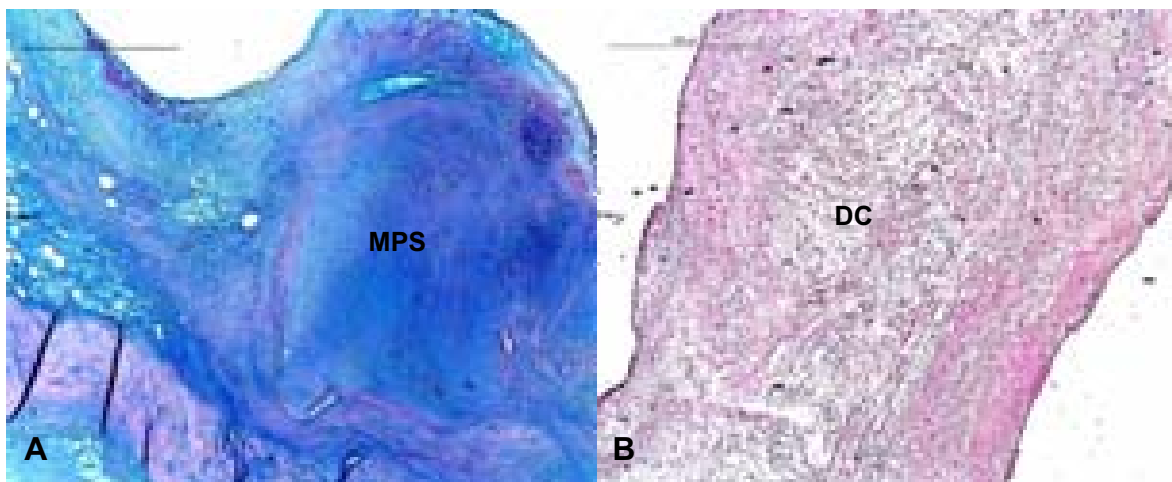


FIGURA 3 - Fotomicrografia da válvula mitral de cão com endocardiose. (A) Acentuada deposição de MPS (MPS). Alcian blue. (B) Degeneração do colágeno (DC). HE.

Segundo MUCHA (2002), na *pars espongiosa*, principalmente na área distal, observa-se uma infiltração mixomatosa que acarreta em espessamento, com acúmulo de MPS. A proliferação da *pars espongiosa* invade a *pars fibrosa*, dando a aparência de espaços císticos e de colágeno menos denso. O mesmo autor refere que, de forma geral, a DMVM no cão apresenta padrão de evolução distinto no folheto mitral, sendo as alterações microscópicas, incluindo a infiltração de MPS, a dissolução do colágeno e a alteração da superfície *atrialis*, mais acentuadas na porção apical da válvula em comparação ao segmento basal da mesma. Com essa observação, o autor sugere que a degeneração valvular tem início na extremidade livre da mitral (porção distal do folheto) e, com a evolução do processo, se propaga até a base da mesma (porção proximal do folheto).

A válvula mitral normal assegura que todo o volume de sangue que chega ao ventrículo esquerdo seja expelido para a artéria aorta (ABBOT, 2006). Com a progressão da DMVM, há falha no fechamento valvular e regurgitação do sangue do ventrículo para o átrio, produzindo o principal sinal dessa enfermidade, o sopro. O processo de alongamento debilita as cordas tendíneas, que podem romper-se, deixando a válvula sem sustentação (MUCHA, 2003).

A regurgitação leva à dilatação do átrio, do anel valvular e do ventrículo e desenvolve-se lentamente ao longo de meses ou até anos, com a pressão média do átrio permanecendo razoavelmente baixa. Com o avanço da DMVM, um volume progressivamente maior de sangue se move, de forma inefetiva, para trás e para frente entre o ventrículo e o átrio, diminuindo o fluxo anterógrado para a aorta (WARE, 2006), promovendo a redução do volume minuto e, conseqüentemente, da pressão arterial. Esses eventos desencadeiam uma descarga simpática compensatória, provocando aumento do inotropismo, da frequência cardíaca e da vasoconstrição periférica (MUCHA, 2003).

Com essa evolução, outros mecanismos compensatórios, como o sistema renina-angiotensina-aldosterona e neuro-hormonais, também são comprometidos, produzindo aumento do volume plasmático, da resistência periférica e aumentando o trabalho cardíaco. Esses mecanismos, inicialmente compensatórios, terminam por agravar o quadro e desencadear a insuficiência cardíaca congestiva (MUCHA, 2003).

A regurgitação mitral normalmente é acompanhada por um sopro holossistólico, mais audível no hemitórax esquerdo, na área correspondente ao ápice cardíaco (WARE, 2006). Sopros mais intensos têm sido associados à DMVM mais avançada, porém, é importante lembrar que o sopro pode ser discreto ou até mesmo inaudível em cães com regurgitação importante e insuficiência cardíaca grave. Sons respiratórios grosseiros, acentuados e crepitações no fim da inspiração desenvolvem-se conforme evolue o edema (WARE, 2006).

Na insuficiência mitral crônica pode-se observar na projeção radiográfica látero-lateral o aumento do átrio esquerdo, elevação traqueal e compressão do brônquio esquerdo. Também podem visualizar-se o aumento do bordo ventricular esquerdo e a aproximação deste ao diafragma. Na projeção dorso-ventral o átrio esquerdo projeta-se sobre a região média da borda cardíaca (MUCHA, 2003). O padrão radiográfico de distribuição do edema pulmonar nos cães é classicamente hilar, dorso-caudal e com simetria bilateral (WARE, 2006).

Na eletrocardiografia pode-se constatar aumento no tempo da onda P maior que 0,04s. Também é possível observar maior tempo do complexo QRS, por aumento do tamanho ventricular ou por bloqueio do ramo esquerdo, embora

seja conveniente utilizar exames complementares, como o exame radiográfico do tórax e o ecocardiograma, que servem para determinar o aumento de tamanho da câmara. Nos modos B e M da ecocardiografia pode observar-se o espessamento e maior ecogenicidade da válvula mitral, com seu deslocamento em direção ao átrio. Com o aumento do átrio, devido à regurgitação da mitral ocorrerá perda da relação 1:1 entre a aorta e o átrio esquerdo (ABBOTT, 2006; MUCHA, 2003)

1.3. Metaloproteinases (MMP)

As metaloproteinases (MMP) compõem uma grande família de enzimas proteolíticas dependentes do zinco e são responsáveis pelo remodelamento da MEC em processos normais e patológicos de vários tecidos (HAY, 1981; BIRKEDAL-HANSEN, 1995). O aumento da atividade das MMP pode alterar o equilíbrio entre a síntese e degradação de MEC, resultando em mudanças na morfologia e propriedades mecânicas do tecido (STETLER-STEVENSON, 1996; VU et al., 1998). As MMP são produzidas por vários tipos celulares, incluindo os fibroblastos, as células musculares lisas, os miócitos e as células endoteliais (STETLER-STEVENSON, 1996; DOLLERY et al., 1995).

Atualmente são conhecidos vinte tipos de MMP, divididas em quatro grupos: colagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13), gelatinases (MMP-2 e MMP-9), estromalisinas (MMP-3, MMP-7, MMP10, MMP-11 e MMP12) e MMP tipo membrana (MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP e MT4-MMP). A exceção das MMP tipo membrana, as demais MMP são secretadas no espaço extracelular como pró-enzimas, sendo que a ativação ocorre pela quebra enzimática do pró-peptídeo dominante pela protease serina (ex. plasmina) e por outras MMP. Uma vez ativas, as MMP são reguladas por inibidores endógenos denominados inibidores teciduais de metaloproteinase (TIMP), que são frequentemente produzidos pelas mesmas células que liberam MMP. Atualmente são conhecidos quatro TIMP (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4), que são capazes de inibir a função das MMP pela formação de um complexo na proporção de 1:1 (STRICKLIN et al., 1983).

Cada MMP tem a capacidade de quebrar um tipo específico de MEC. As colagenases intersticiais (MMP-1, MMP-8 e MMP-13) estão envolvidas no

primeiro passo da degradação do colágeno pelo desarranjo da hélice nativa da rede de colágeno fibrilar. As gelatinases (MMP-2 e MMP-9) quebram um número de substratos, incluindo gelatina, elastina, proteoglicanos, colágeno e fragmentos de colágenos, quebrados pelas colagenases intersticiais (KRANE et al., 1996). O balanço entre TIMP e MMP é importante no remodelamento de tecidos normais e alterados, sendo que nos normais as MMP são expressas em níveis muito baixos, mas quando há necessidade de remodelamento são rapidamente induzidas e ativadas (DISATIAN, 2008).

As válvulas do coração humano apresentam padrão específico de expressão de MMP e TIMP, que varia entre os diferentes tipos valvulares. A MMP-1 se expressa nas quatro válvulas (aórtica, pulmonar, mitral e tricúspide) e a MMP-2 apresenta expressão mínima nas válvulas aórtica e pulmonar. Já a MMP-3 e a MMP-9 não são expressas em nenhum dos tipos valvulares. As TIMP-1 e TIMP-2 têm expressão em todos os folhetos valvulares, mas a TIMP-3 só se expressa na válvula tricúspide (DREGGER et al., 2002).

A síntese de mRNA de MMP-2, MMP-9 e TIMP-1 foi verificada em válvulas cardíacas humanas acometidas por DMVM, sugerindo a participação das MMP, particularmente a MMP-2 e a MMP-9, no remodelamento das válvulas com doença degenerativa (SOINI et al., 2001). Ainda, a atividade enzimática da MMP-2 e da MMP-9 em válvulas com endocardiose foi observada em estudo zymográfico em gelatina, demonstrando o envolvimento das MMP na patogenia da degeneração valvular (TOGASHI et al., 2007).

As MMP provavelmente são secretadas por miofibroblastos na MEC, visto que a expressão das mesmas e de seus mRNA tem forte correlação com a expressão de miofibroblastos na MEC em válvulas humanas com degeneração (RABKIN et al., 2001; SOINI et al., 2001).

AUPPERLE et al. (2007) verificaram a expressão de MMP-2, MMP-14, TIMP-2 e TIMP-3 nas células do estroma da válvula mitral normal de cães. Já com a evolução da doença valvular, a expressão de MMP-2 diminuiu e a de MMP-14 e de TIMP-2 e TIMP-3 aumentou, sugerindo que a alteração na expressão e a distribuição dessas enzimas na válvula estão envolvidas na patogenia da DMVM canina. No entanto, a expressão de MMP-14 não foi detectada em válvulas mitrais humanas normais ou doentes (SOINI et al., 2001), possivelmente refletindo a

diferença entre as espécies canina e humana no que diz respeito a estrutura, funcionamento da válvula e patogenia da degeneração valvular.

RABIKIN et al. (2001) observaram aumento na expressão de collagenases (MMP-1 e MMP-13) e gelatinases (MMP-2 e MMP-9) na mitral humana com degeneração quando comparado a válvulas cardíacas normais e concluíram que o aumento da atividade da MMP é uma característica na patogenia da degeneração valvular humana. Em cães, as alterações na expressão das MMP e das TIMP na válvula mitral de animais de raças susceptíveis são importantes na gênese da DMVM, sendo proposto que essas alterações resultam em degradação da MEC valvular e, conseqüentemente, aumentam o acúmulo de MPS que acaba por comprometer a função e a estrutura da válvula (AUPPERLE et al., 2007).

Na revisão bibliográfica pesquisada não foram encontrados trabalhos relacionando MMP e TIMP com a DMVM em suínos.

1.4. Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é um radical livre em forma de gás, produzido a partir da L-arginina, por reação de catálise pela enzima sintase do óxido nítrico (NOS) (KIECHLE & MALINSKY, 1993; MOESGAARD et al., 2007). O NO se difunde livremente pelas membranas, mas possui meia-vida curta, o que dificulta sua mensuração direta (MOESGAARD et al., 2007). Originalmente designado como um fator de relaxamento derivado do endotélio, o NO é um mediador com múltiplos efeitos biológicos (DRÖGE, 2002).

A distribuição de NO nas seções de tecidos é de difícil detecção por ser um gás instável que é rapidamente neutralizado. Entretanto, a detecção da enzima NOS é frequentemente utilizada em seu lugar (OLSEN et al., 2003). A expressão da NOS no endotélio vascular aumenta em associação com a exposição a fatores mecânicos, como o estresse de impacto (ZIEGLER et al., 1998; MOESGAARD et al., 2007), uma resposta de proteção do endotélio contra futuras mudanças, como a agregação plaquetária.

MOESGAARD et al. (2007) observaram a presença de imunorreatividade para NOS no citoplasma de células endoteliais nas superfícies atrial e ventricular da válvula mitral de suínos. Além disso, as células endoteliais de pequenas veias na camada central da válvula mitral de suínos também expressaram NOS. Como a endotelina, o NO parece ser um importante regulador no metabolismo da MEC (VON DER LEYEN et al., 1995; MYERS & TANNER, 1998). Um balanço regulatório entre o NO e a endotelina frequentemente existe. O NO inibe a síntese e os efeitos da endotelina (BOULANGER & LUSCHER, 1990; KOUREMBANAS et al., 1993; PICARD et al., 1998).

A NOS catalisa a conversão de L-arginina para L-citrulina e NO, utilizando a forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) como cofator (Figura 4) (DRÖGE, 2002). A NOS transfere elétrons do NADPH para outras substâncias. Na reação histoquímica NADPH diaforese (NADPH-d), o sal solúvel azul de nitrotetrazólio recebe elétrons do NADPH, tornando-se visível como formazane insolúvel (SCHERER-SINGLER et al., 1983). A deposição de grânulos de cor azul escura indica a presença de NOS em tecidos fixados pelo formaldeído (DAWSON et al., 1991; HOPE et al., 1991). A reação de NADPH-d, entretanto, é incapaz de distinguir as diferentes isoformas de NOS.

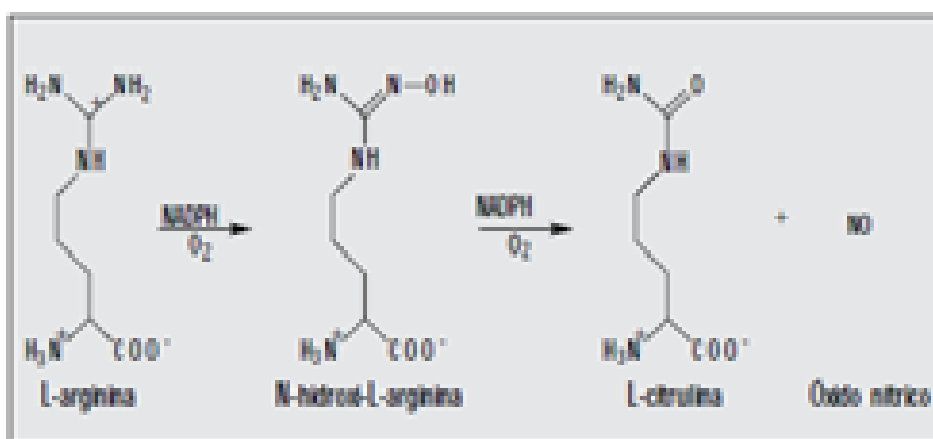


FIGURA 4 - Reação de conversão de L-arginina para L-citrulina e NO, utilizando a forma reduzida da NADPH como cofator. Fonte: DUSSE et al. (2003).

OLSEN et al. (2003) observaram aumento na atividade da NADPH-d na válvula mitral de cães com mudanças mixomatosas, sugerindo aumento de NOS nessas válvulas e possível envolvimento do NO na gênese da DMVM canina.

A DMVM é uma doença valvular com envolvimento genético, especialmente em cães e humanos (SWENSON et al., 1996; OLSEN et al., 1999), mas pouco se conhece sobre os mecanismos valvulares locais envolvidos na sua gênese (OLSEN et al., 2003). Mediadores biológicos como o NO e as MMP são apontados na patogenia da DMVM, já que são importantes reguladores do metabolismo na MEC (VON DER LEYEN et al., 1995; MYERS & TANNER, 1998). Assim, torna-se importante verificar a presença e a intensidade de expressão da NOS e MMP em válvulas normais e com degeneração mixomatosa para caracterizar a participação das mesmas neste processo. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar as alterações histológicas, a expressão da NOS, por meio da reação histoquímica do NADPH-d, e o padrão de marcação imunoistoquímica de MMP-2 e MMP-9 no folheto anterior da válvula mitral normal e com endocardiose de cães, assim como de suínos jovens e matrizes.

REFERÊNCIAS

1. ABBOTT, J. A. Controle da insuficiência cardíaca congestiva crônica. In: ABBOTT, J. A. **Segredos em Cardiologia de Pequenos Animais: respostas necessárias ao dia-a-dia em rounds, na clínica, em exames orais e escritos**. Porto Alegre: Artmed, 2006, cap.28, p.228 – 239.
2. AMORESANO, A.; AMEDEO, S.; D'ANDREA, G.; SICILIANO, R.; GAGNA, C.; CASTAGNARO, M.; MARINO, G.; GUARDA, F. N-Linked glycans of proteins from mitral valves of normal pigs and pigs affected by endocardiosis. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.267, p.1299 – 1306, 2000.
3. AUPPERLE, H.; THIELEBEIN, J.; KIEFER, B.; MÄRZ, I.; DINGES, G.; SCHOON, H. A. An immunohistochemical study of the role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in chronic mitral valvular disease (valvular endocardiosis) in dogs. **The Veterinary Journal**, London, v.180, p.88-94, 2009.
4. BEARDOW, A. W.; BUCHANAN, J. W. Chronic mitral valve disease in Cavalier King Charles Spaniel: 95 cases (1987-1991). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.203, n.7, p.1023-1029, 1993.

5. BIRKEDAL-HANSEN, H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. **Current Opinion in Cell Biology**, London, v.7, p.728-735, 1995.
6. BOULANGER, C.; LÜSCHER, T. F. Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v.85, p.587–590, 1990.
7. CASTAGNARO, M.; AMEDEO, S.; BERTOLOTTO, A.; MANZARDO, E.; RICCIO, S.; GUARDA, F. Morphological and biochemical investigations of mitral valve endocardiosis in pigs. **Research in Veterinary Science**, London, v.62, p.121 – 125, 1997.
8. CHETBOUL, V.; TISSIER, R.; VILLARET, F.; NICOLLE, A.; DEAN, E.; BENALLOUL, T.; POUCHELON, J. L.. Epidemiological, clinical,echo-Doppler characteristics of mitral valve endocardiosis in Cavalier King Charles in France: a retrospective study of 451 cases (1995 to 2003). **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v.45, p.1012-1015, 2004.
9. DARKE, P. Valvular incompetence in Cavalier King Charles Spaniel. **Veterinary Record**, London, v.120, p.365-366, 1987.
10. DAS, K. M.; TASHJIAN, R. J. Chronic mitral valve disease in the dog. **Veterinary Medicine**, Chicago, v.60, p.1209-1216, 1965.
11. DAWSON, T. M.; BREDT, D. S.; FOTUHI, M.; HWANG, P. M.; SNYDER, S. H. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissue. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America**, Washington, v.88, p.7797-7801, 1991.
12. DETWEILER, D.K.; PATTERSON, D. F. The prevalence and types of cardiovascular disease in dogs. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.127, n.1, p.481-519, 1965.
13. DISATIAN, S. **Valve interstitial cell phenotypes and signaling pathways involved with canine mixomatous degenerative mitral valve disease**. 2008. 133f. Dissertation (Doctor of Philosophy) – Department of Clinical Sciences, Colorado State University, Fort Collins.
14. DOLLERY, C. M.; McEWAN, J. R.; HENNY, A. M. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. **Circulation Research**, Baltimore, v.77, p.863-868, 1995.
15. DREGER, S. A.; TAYLOR, P. M.; ALLEN, S. P. et al. Profile and localization of matrix metalloproteinase (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) in human heart valves. **Journal of Heart Valve Disease**, St. Paul, v.11, p.875-880, 2002.
16. DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, Baltimore, v.82, p.47–95, 2002.

17. DURBIN, A. D.; GOTLIEB, A. I. Advances towards understanding heart valve response to injury. **Cardiovascular Pathology**, Philadelphia, v.11, p.69-77, 2002.
18. DUSSE, L. M. S. A.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v.39, n 4, p.343-350, 2003.
19. FENOGLIO Jr., J. J.; PHAN, T. D.; WIT, A. L.; BASSET, A. L.; WAGNER, B. M. Canine mitral complex: Ultrastructural and electromechanical properties. **Circulation Research**, Baltimore, v.31, p.417-430, 1972.
20. GUARDA, F.; NEGRO, M.; AMADEO, S. The pathology of mitral valve prolapse in swine. **Schweizer Archiv fur Tierheilkunde**, Berna, v.130(10), p.583-590, 1988.
21. HAY, E. D. Extracellular matrix. **Journal of Cell Biology**, New York, v.91, p.205s-223s, 1981.
22. HOPE, B. T.; MICHAEL, G. J.; KNIGGE, K. M.; VICENT, S. R. Neuronal NADPH diaphoresis is a nitric oxide synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.88, p.2811-2814, 1991.
23. KIECHLE, F. L.; MALINSKI, T. Nitric oxid – biochemistry, pathophysiology, and detection. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia v.100, p.567-575, 1993.
24. KOGURE, K. Pathology of chronic mitral valvular disease in the dog. **Japanese Journal of Veterinary Science**, Tokio, v.42, p.323-335, 1980.
25. KOUREMBANAS, S.; MCQUILLAN, L. P.; LEUNG, G. K.; FALLER, D. V. Nitric oxide regulates the expression of vasoconstrictors and growth factors by vascular endothelium under both normoxia and hypoxia. **Journal of Clinical Investigation**, Michigan, v.92, p.99–104, 1993.
26. KRANE, S. M.; BYRNE, M. H.; LEIMATRE, V.; HENRIET, P.; JEFFREY, J. J.; WITTER, J. P.; LIU, X.; WU, H.; JAENISCH, R.; EECKHOUT, Y. Different collagenase gene products have different roles in degradation of type I collagen. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.271, p.28509-28525, 1996.
27. KVART, C.; HAGGSTOM, J.; PEDERSEN, H. D. Efficacy of enalapril therapy for prevention of congestive heart failure in dogs with myxomatous valve disease and asymptomatic mitral regurgitation. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v. 16,p.80-88, 2002.
28. MOESGAARD, S. G.; OLSEN, L. H.; AASTED, B.; VIUFF, B. M.; PEDERSEN, L. G.; PEDERSEN, H. D.; HARRISON, A. P. Direct measurements of nitric oxide release in relation to expression of endothelial nitric oxide synthase in

- isolate porcine mitral valves. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, v.54, p.156 – 160, 2007.
29. MUCHA, C. J. **Caracterização morfológica da valva mitral de cães normais e com degeneração valvar mixomatosa**. 2002. 67f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
30. MUCHA, C. J. Insuficiência valvular mitral: Endocardiose mitral. In: BELERENIAN, G. C.; MUCHA, C. J.; CAMACHO, A. A. **Afecções Cardiovasculares em Pequenos Animais**. São Caetano do Sul: Interbook, 2003. cap.15, p.146 – 151.
31. MYERS, P. R.; TANNER, M. A. Vascular endothelial cell regulation of extracellular matrix collagen. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, Dallas, v.18, p.717–722, 1998.
32. OLSEN, L. H.; MORTENSEN, K.; MARTINUSSEN, T.; LARSSON, L. I.; BAANDRUP, U.; PEDERSEN, H. D. Increased NADPH-diaphorase activity in canine myxomatous mitral valve leaflets. **Journal of comparative pathology**, Edinburgh, v.129, p.120 – 130, 2003.
33. PEDERSEN, H. D.; HAGGSTROM, J. Mitral valve prolapse in the dog: a model of mitral valve prolapse in man. **Cardiovascular research**, New York, v.47, p.234 – 243, 2000.
34. PEDERSEN, L. G.; ZHAO, J.; YANG, J.; THOMSEN, P. D.; GREGERSEN, H.; HASENKAM, J. M.; SMERUP, M.; PEDERSEN, H. D.; OLSEN, L. H. Increased expression of endothelin B receptor in static stretch exposed porcine mitral valve leaflets. **Research in Veterinary Science**, London, v.82, p.232 – 238, 2007.
35. PICARD, P.; SMITH, P. J. W.; MONGE, J. C.; STEWART, D. J. Expression of endothelial factors after arterial injury in the rat. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, Philadelphia, v.31 (Suppl. 1), P.S323–S327, 1998.
36. RABIKIN, E.; AIKAWA, M.; STONE, J. R.; FUKOMOTO, Y.; LIBBY, P.; SCHOEN, F. J. Activated interstitial myofibroblast express catabolic enzymes and mediate remodeling in myxomatous heart valves. **Circulation**, Dallas, v.104, p.2522-2532, 2001.
37. SAVAGE, D. D.; DEVEREUX, R. B.; GARRISON, R. J. mitral valve prolapse in the general population. II. Clinical features: The Framingham Study. **American Heart Journal**, Dallas, v.106, n.3, p.577-581, 1983.
38. SCHERER-SINGLER, U.; VICENT, S. R.; KIMURA, H.; McGEER, E. G. Demonstration of unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. **Journal of Neuroscience Methods**, Amsterdam, v.9, p.229-234, 1983.

39. SERFASS, P.; CHETBOUL, V.; SAMPEDRANO, C. C.; NICOLLE, A.; BENALLOUL, T.; LAFORGE, H.; GAU, C.; HÉBERT, C.; POUCHELON, J.; TISSIER, R. Retrospective study of 942 small-sized dogs: Prevalence of left apical systolic heart murmur and left-sided heart failure, critical effects of breeds and sex. **Journal of Veterinary Cardiology**, v.8, p.11-18, 2006.
40. SOINI, Y.; SATTA, J.; MÄÄTÄ, M.; AUTIO-HARMAINEN, H. Expression of MMP-2, MMP9, MT1-MMP, TIMP1, and TIMP2 mRNA in valvular lesions of the heart. **Journal of Pathology**, Sussex, v.194, p.225-231, 2001.
41. STEIN, P. D.; WANG, C. H.; RIDDLE, J. M.; SABBAB, H. N.; MAGILLIGAN, D. J.; HAWKINS, E. T. Scanning electron microscopy of operatively excised severely regurgitant floppy mitral valves. **American Journal of Cardiology**, New York, v.64, p.392-394, 1989.
42. STETLER-STENVENSON, W. G. Dynamics of matrix turnover during pathologic remodeling of the extracellular matrix. **American Journal of Pathology**, Bethesda, v.148, p.1345-1350, 1996.
43. STRICKLIN, G. P.; JEFFREY, J. J.; ROSWIT, W. T.; EISEN, A. S. Human skin fibroblast procollagenase: Mechanisms of activation by organomercurials and trypsin. **Biochemistry**, Easton, v.22, p.61-68, 1983.
44. SWENSON, L.; HÄGGSTRÖN, J.; KVART, C.; JUNEJA, R. K. Relationship between parental cardiac status in Cavalier King Charles Spaniels and prevalence and severity of chronic valvular disease in offspring. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.208, p.2009-2012, 1996.
45. TAMURA, K.; FUKUDA, Y.; ISHIZAKI, M.; MASUDA, Y.; YAMANAKA, N.; FERRANS, V. J. Abnormalities in elastic fibers and other connective-tissue components of floppy mitral valve. **American Heart Journal**, Dallas, v.129, p.1149 – 1158, 1995.
46. TOGASHI, M.; TAMURA, K.; NITTA, T.; ISHIZAKI, M.; SUGISAKI, Y.; FUKUDA, Y. Role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor of metalloproteinases in myxomatous change of cardiac floppy valves. **Pathology International**, Victoria, v.57, p.251-259, 2007.
47. VON DER LEYEN, H. E.; GIBBONS, G. H.; MORISHITA, R.; LEWIS, N. P.; ZHANG, L.; NAKAJIMA, M.; KANEDA, Y.; COOKE, J. P.; DZAU, V. J. Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesions: in vivo transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.92, p.1137–1141, 1995.
48. VU, T. H.; SHIPLEY, J. M.; BERGES, G.; HELMS, J. A.; HANAHAN, D.; SHAPIRO, S. D.; WERB, Z. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth

plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. **Cell**, Cambridge, v.93, p.411-422, 1998.

49. WARE, W. A. Doença Valvar e Endocárdica Adquiridas. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**, Rio de Janeiro: Elsevier, 2006, cap. 8, p.135 – 146.
50. WHITNEY, J. C. Observations on the effect of age on the severity of heart valve lesions in the dog. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v.15, p.511-522, 1974.
51. ZIEGLER, T.; SILACCI, P.; HARRISON, V. J.; HAYOS, D. Nitric oxide synthase expression in endothelial cells exposed to mechanical forces. **Hypertension**, Dallas, v.32, p.351-355, 1998.

CAPÍTULO 2 - PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NO REMODELAMENTO DA MATRIZ EXTRACELULAR E NA DEGENERAÇÃO MIXOMATOSA DA VÁLVULA MITRAL DE CÃES E SUÍNOS

ROLE OF NITRIC OXIDE IN THE REMODELLING OF EXTRACELLULAR MATRIX IN MYXOMATOUS MITRAL VALVE DEGENERATION OF DOGS AND SWINE

RESUMO

A degeneração mixomatosa da válvula mitral (DMVM) ou endocardiose acomete as válvulas cardíacas de várias espécies mamíferas, principalmente em humanos, cães e suínos. O óxido nítrico (NO) tem papel importante no desenvolvimento da DMVM. O NO pode ser avaliado indiretamente pela expressão da enzima sintase de óxido nítrico (NOS) e pela reação histoquímica de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato diaforese (NADPH-d). O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade da NOS, pela reação de NADPH-d, no folheto anterior da válvula mitral canina normal e com endocardiose, bem como em suínos jovens e matrizes, comparando a intensidade da reação com o grau de endocardiose e as alterações histológicas. Foram utilizadas 12 mitrais de cães e 22 de suínos. As válvulas foram avaliadas macroscopicamente quanto à ocorrência ou não de endocardiose, fixadas em paraformaldeído a 4%, submetidas à reação de NADPH-d, rotineiramente processadas e avaliadas microscopicamente quanto à deposição de mucopolissacarídeos (MPS), degeneração do colágeno, fibrose e grau de endocardiose. Nas válvulas caninas, quanto maior a intensidade da reação de NADPH-d maior o grau de endocardiose, de deposição de MPS e da degeneração do colágeno. Nas válvulas suínas não houve coloração à reação de NADPH-d. Concluiu-se que o NO atua na mitral canina, remodelando a matriz extracelular e participando da patogenia da endocardiose. Em suínos, a ausência de reação à NADPH-d corrobora à falta de lesões macroscópicas de

endocardiose, sugerindo ação restrita do NO ou diferenças estruturais na válvula desta espécie.

Palavras-chave: endocardiose, NOS, NADPH.

ABSTRACT

Myxomatous mitral valve degeneration (MMVD) or endocardiosis occurs in heart valves of many mammal species, especially in humans, dogs and pigs. Nitric oxide (NO) plays important role in the MMVD development. NO can be indirectly evaluated by the nitric-oxide synthase (NOS) expression and by histochemical reaction of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase (NADPH-d). The aim of this study was to evaluate NOS activity, by NADPH-d reaction, in the anterior leaflet of dogs with regular mitral valves and those with MMVD, as well as in young swine and old females, comparing the reaction level with the degree of endocardiose disease and also the histological alterations. Twelve mitral valves of dogs and twenty-two valves of swine were used for the research. All the valves were macroscopically analyzed for the occurrence or not of endocardiosis. They were fixed in a 4% paraformaldehyde, exposed to NADPH-d reaction, routinely processed and microscopically evaluated for the detection of mucopolysaccharides (MPS) deposition, collagen degeneration, fibrosis and level of endocardiosis. In dogs, very high intensity reaction to NADPH-d was associated with higher endocardiosis degree and presented signs of MPS deposition as well as collagen degeneration. No alteration in colour during the pigs valves reaction to NADPH-d was observed. In conclusion, NO works in canine mitral valves remodelling extracellular matrix and plays important role in endocardiosis disease. In swine, the lack of reaction reinforces the absence of macroscopical endocardiosis lesions, suggesting restrict NO action or major differences on the structures of swine valves.

Key words: endocardiosis, NOS, NADPH.

INTRODUÇÃO

A degeneração mixomatosa da válvula mitral (DMVM) é um processo distrófico e degenerativo que acomete o endocárdio valvular (GUARDA et al., 1988; CASTAGNARO et al., 1997; AMORESANO et al., 2000) e caracteriza-se pelo acúmulo de mucopolissacarídeos (MPS) na matriz extracelular (MEC) dos folhetos da mitral (AMORESANO et al., 2000), sendo observada com maior frequência nas espécies humana, canina e suína (PEDERSEN & HÄGGSTRÖM, 2000; PEDERSEN et al., 2007).

A DMVM é a doença cardíaca de maior prevalência em cães (MUCHA, 2003; OLSEN et al., 2003) e acomete grande porcentagem da população geriátrica nesta espécie, tendo altos índices de morbidade e mortalidade (MUCHA, 2002). Está diretamente relacionada à idade, é mais comum em cães entre oito e 11 anos e apresenta maior incidência em animais de pequeno porte (MUCHA, 2003).

A incidência e a severidade da DMVM em suínos também estão fortemente relacionadas à idade. A ocorrência em suínos jovens é menor e as mudanças valvulares são moderadas, enquanto que em suínos com três a quatro anos de idade pode chegar a 90% ou mais (CASTAGNARO et al., 1997).

A aparência macroscópica comum dos folhetos da válvula mitral com degeneração mixomatosa é caracterizada por espessamento, opacidade e diversos graus de retração do folheto, com nódulos nas extremidades da válvula e cordoalhas tendíneas alongadas (DAS TASHJIHAN, 1965; KVART et al., 2002; MUCHA, 2002). A válvula torna-se aumentada e insuficiente com a evolução da doença (KOGURE, 1980; OLSEN et al., 2003).

A progressiva mudança mixomatosa valvular possivelmente representa resposta para o repetido impacto, levando a uma disfunção endotelial (OLSEN et al., 2003; DURBIN & GOTLIEB, 2002). As mudanças da DMVM começam primariamente na borda livre do folheto valvular e são aparentemente pronunciadas nas áreas de inserção das cordas tendíneas. Com a progressão da doença, as lesões degenerativas estendem-se da borda livre para as demais porções do folheto valvular (DISATIAN, 2008; MUCHA, 2002).

O óxido nítrico (NO) é um radical livre em forma de gás, produzido a partir da L-arginina, por reação de catálise pela enzima sintase do óxido nítrico (NOS), que utiliza a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) como cofator (KIECHLE & MALINSKY, 1993; DRÖGE, 2002; MOESGAARD et al., 2007). Na reação histoquímica NADPH diaforese (NADPH-d), a deposição de grânulos de cor azul indica a presença de NOS em tecidos fixados pelo formaldeído (DAWSON et al., 1991; HOPE et al., 1991). OLSEN et al. (2003) observaram aumento na reação de NADPH-d na válvula mitral de cães com mudanças mixomatosas, sugerindo aumento de NOS nessas válvulas e possível envolvimento do NO na gênese da DMVM canina.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi verificar o papel do NO no remodelamento da MEC e na patogenia da DMVM em cães e suínos, submetendo a válvula mitral canina normal e com endocardiose, bem como a mitral de suínos jovens e de matrizes, à reação de NADPH-d e comparando com o grau de endocardiose e com as alterações microscópicas, especialmente a deposição de mucopolissacarídeos, a degeneração do colágeno e a fibrose.

MATERIAL E MÉTODOS

a) Animais

Cães: foram obtidas 12 mitrais de animais adultos a idosos, sem restrição quanto à raça e sexo, durante o exame necroscópico dos mesmos no Setor de Patologia Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO. As válvulas foram colhidas aleatoriamente, sendo selecionadas aquelas que apresentavam morfologia macroscópica normal e de endocardiose.

Suínos: foi colhida a mitral de 10 animais de ambos os sexos e com idade entre sete e oito meses, bem como de 12 matrizes com idade entre cinco e seis anos, totalizando 22 válvulas. Todos os suínos eram mestiços (Large White – Landrace) e a colheita foi realizada durante a inspeção do coração, após abate

em frigorífico (Sol Nascente, Goiânia, GO), selecionando-se mitrais com em sem sinais macroscópicos de endocardiose.

b) Delineamento experimental

A válvula mitral de todos os animais foi colhida em até, no máximo, uma hora após a morte. Para evitar o toque no endotélio dos folhetos durante a dissecação, foram realizados cortes nos músculos papilares e no anel valvular, obtendo-se o aparelho mitral completo. Cada válvula foi inicialmente avaliada quanto à presença ou ausência de endocardiose e, na sequência, fixada por 24 horas em paraformaldeído a 4%, a temperatura entre 4° e 8°C. Após a fixação, as válvulas foram banhadas em solução Tris/HCL 0,1mM (pH7,2), sendo separado e fotografado o folheto anterior de cada mitral.

Em seguida, cada folheto foi submetido a reação de NADPH-d, pela incubação em solução Tris/HCL 0,1M (pH 7,2), contendo 1mM de β -NADPH (Sigma, N-1630), 0,2mM de azul de nitrotetrazólio, triton X100 0,2% e 0,53 mg/ml malato monossódico (Sigma, M-1125), durante 1h30min a 38°C (SCHERER-SINGLER et al., 1983; OLSEN et al., 2003). Após esse período, os folhetos foram novamente lavados em solução Tris/HCL 0,1mM (pH 7,2) e fotografados para avaliação da intensidade da reação de NADPH-d, sendo atribuídos os escores de coloração: sem coloração (0), azul claro (+), azul escuro (++) e preto (+++) (OLSEN et al., 2003).

A etapa seguinte compreendeu o recorte do folheto anterior mitral, em orientação perpendicular, do anel valvular até o ápice do folheto, para processamento, inclusão em parafina e confecção das lâminas. Na sequência, realizaram-se as colorações de Hematoxilina e Eosina, Alcian Blue e Tricrômico de Masson para a avaliação histológica quanto à degeneração do colágeno, deposição de MPS e fibrose, respectivamente (Tabela 1) (OLSEN et al., 2003).

O grau de endocardiose da mitral canina também foi avaliado microscopicamente, medindo-se a espessura do ápice do folheto, por meio do software ImageJ Launcher (National Institutes of Health, Bethesda, MD,

<http://rsb.info.nih.gov/ij/>), conforme critérios adaptados de OLSEN et al. (2003) (Tabela 1).

TABELA 1 – Critérios de avaliação microscópica das válvulas caninas e suínas

Alterações microscópicas no folheto anterior da válvula mitral de cães e suínos*Deposição de mucopolissacarídeos*

Sem sinais de deposição

Discreta deposição na camada esponjosa e/ou fibrosa com as camadas do folheto intactas

Moderada deposição na camada esponjosa e/ou fibrosa com ruptura das camadas do folheto

Acentuada deposição na camada esponjosa e/ou fibrosa sem estrutura de camadas

Degeneração do colágeno

Sem sinais de degeneração do colágeno com feixes de colágeno intactos na fibrosa

Pequena área de degeneração do colágeno na fibrosa

Grande área de degeneração do colágeno na fibrosa, mas com distinção da mesma

Destruição da fibrosa com degeneração das fibras colágenas dispostas em redemoinhos

Fibrose

Sem sinais de fibrose

Pequena área de fibrose

Grande área de fibrose, mas separada

Grande área de fibrose coalescida

Grau de endocardiose no folheto anterior da mitral canina

Discreta - Espessamento do folheto e/ou nódulos <1,5mm

Moderada - Espessamento do folheto e/ou nódulos entre 1,5 e 3mm

Acentuada - Espessamento do folheto e/ou nódulos >3mm

c) Análise estatística

Foram utilizados dados descritivos e o coeficiente de Spearman para a avaliação dos grupos, uma vez que compreendem variáveis não paramétricas. Os dados foram processados no programa de análise estatística SPSS (Statistical Package for the Social Science), versão 16.0, sendo considerado efeito significativo quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

a) Cães

À avaliação macroscópica foram obtidas cinco válvulas caninas normais e sete com sinais de endocardiose (Figuras 1A e 1E).

Nas mitrais caninas estudadas, a reação de NAPH-d apresentou diferentes escores de coloração, verificando-se válvulas em tons azul claro, azul escuro e preto (Figuras 1B, 1D e 1F), não sendo observadas mitrais sem coloração.

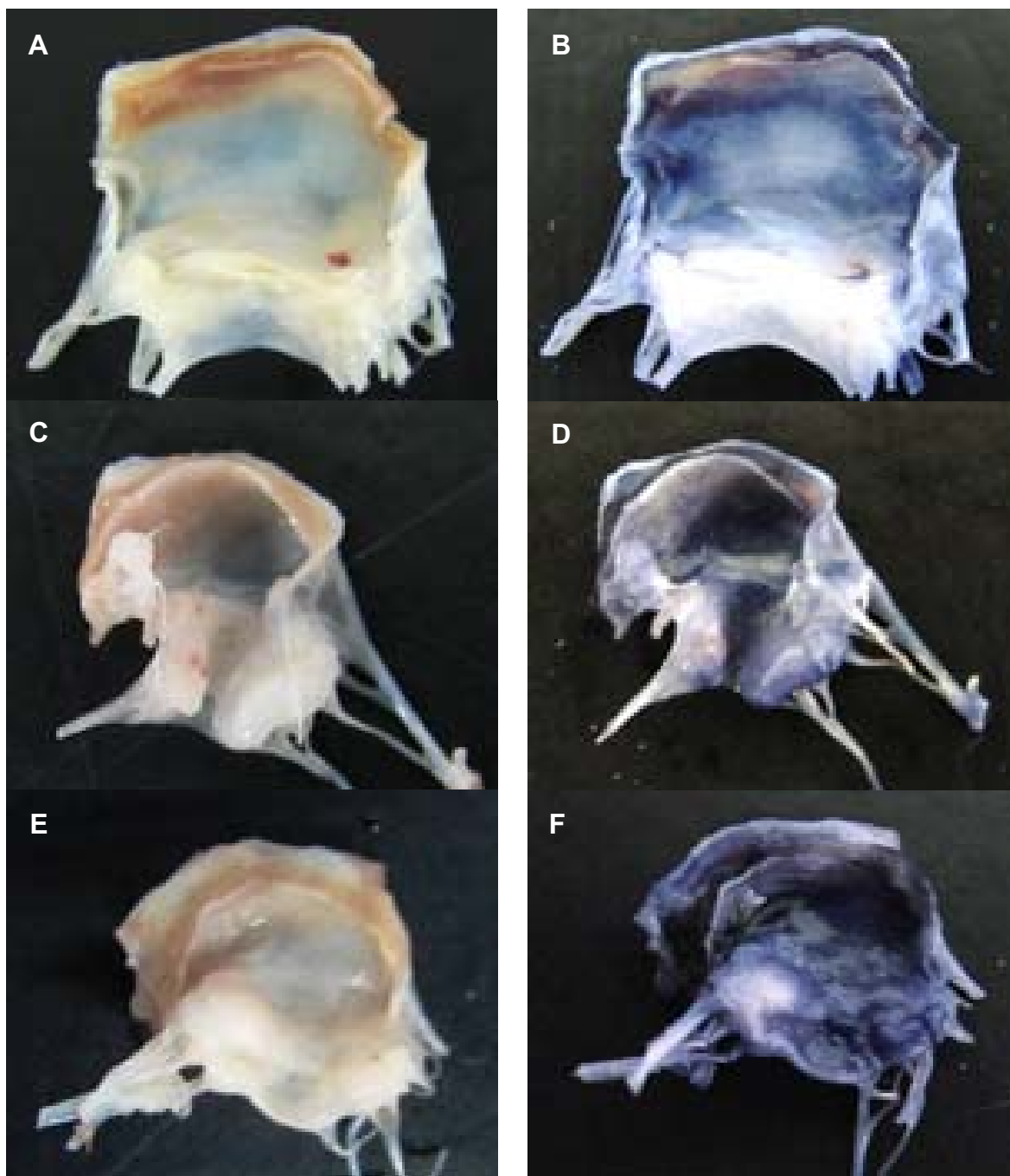


FIGURA 1 - Válvula mitral canina. A), C) e E) Folheto anterior mitral normal, com endocardiose moderada e discreta, respectivamente, antes da reação de NAPH-d. B), D) e F) Folheto anterior mitral normal (azul claro), com endocardiose moderada (azul escuro) e discreta (preta), respectivamente, após a reação de NADPH-d.

Na comparação da intensidade de reação de NAPH-d com a deposição de MPS e a degeneração do colágeno da camada fibrosa observou-se que quanto maior a intensidade de coloração, maior a deposição de MPS e a degeneração do colágeno ($p < 0,05$) (Tabela 2). Já na comparação entre a intensidade de reação de NAPH-d e a fibrose não houve diferença. A figura 2 representa a deposição de MPS e a degeneração do colágeno no folheto anterior da mitral canina.

TABELA 2 - Comparação entre a deposição de MPS e degeneração do colágeno e a reação de NADPH-d no folheto anterior da válvula mitral canina

Deposição de MPS	Reação de NADPH			Total
	Azul claro	Azul escuro	Preto	
Discreta	100% (3)	0% (0)	0% (0)	100% (3)
Moderada	25% (1)	50% (2)	25% (1)	100% (4)
Acentuada	0% (0)	80% (4)	20% (1)	100% (5)
Total	33,3% (4)	50% (6)	16,7% (2)	100% (12)

Degeneração do colágeno	Reação de NADPH			Total
	Azul claro	Azul escuro	Preto	
Sem área de degeneração	100% (4)	0% (0)	0% (0)	100% (4)
Grande área de degeneração	0% (0)	66,7% (2)	33,3% (1)	100% (3)
Destruição total da fibrosa	0% (0)	80% (4)	20% (1)	100% (5)
Total	33,3% (4)	50% (6)	16,7% (2)	100%(12)

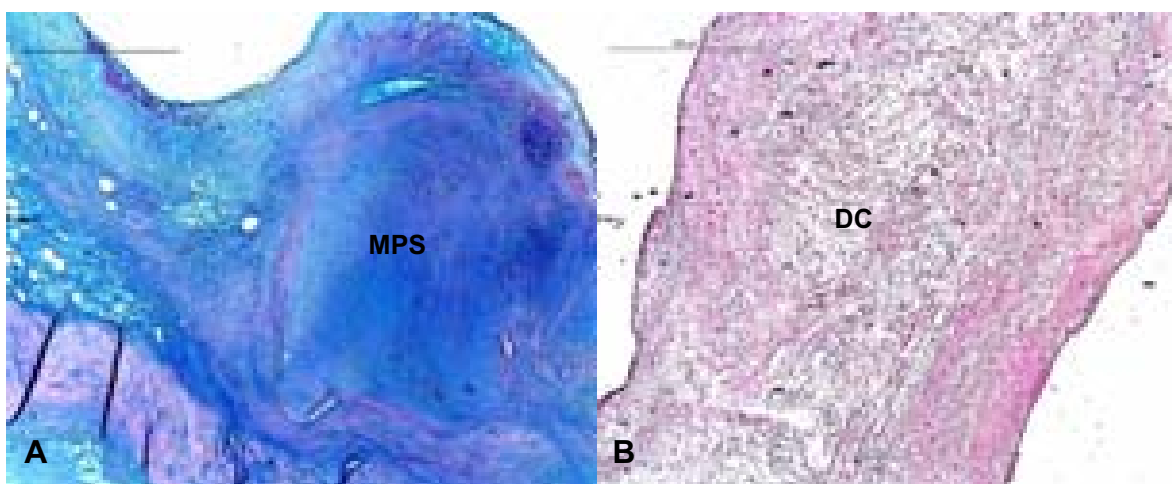


FIGURA 2 - Fotomicrografia da válvula mitral de cão com endocardiose. (A) Acentuada deposição de MPS (MPS). Alcian blue. (B) Degeneração do colágeno (DC). HE.

Nas válvulas caninas observou-se relação entre a intensidade da reação de NADPH-d, caracterizada por escores de coloração, e o grau de endocardiose ($p < 0,05$), sendo que quanto maior a intensidade da reação maior o processo degenerativo da válvula mitral (Tabela 3), considerando a espessura da porção apical do folheto anterior da válvula. O aspecto microscópico da mitral canina com e sem endocardiose está representado na figura 3.

TABELA 3 - Comparação entre a intensidade da reação de NADPH-d e o grau de endocardiose no folheto anterior da válvula mitral canina

Grau de endocardiose	Reação de NADPH			Total
	Azul claro	Azul escuro	Preto	
Normal	80% (4)	20% (1)	0% (0)	100% (5)
Discreta	0% (0)	50% (2)	50% (2)	100% (4)
Moderada	0% (0)	100% (3)	0% (0)	100% (3)
Total	33,3% (4)	50% (6)	16,7% (2)	100% (12)

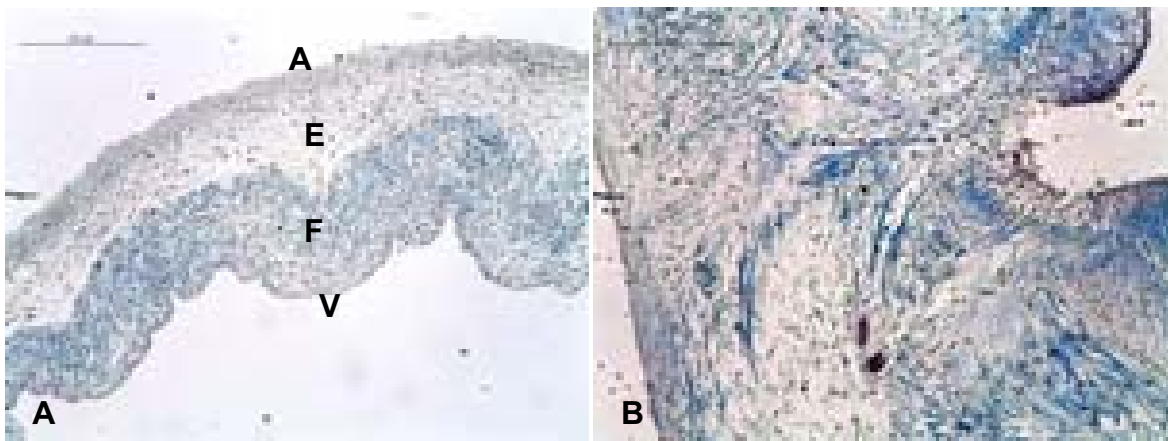


FIGURA 3 - Fotomicrografia da válvula mitral de cão. A) Normal: camadas atrial (A), esponjosa (E), fibrosa (F) e ventricular (V). B) Endocardiose: ausência da estrutura valvular em camadas. Tricrômico de Masson.

b) Suínos

Quanto às válvulas suínas, todas (22) apresentaram aspecto macroscópico normal (Figuras 4A e 4C), sendo 10 de suínos jovens e 12 de matrizes. Ainda, o folheto anterior da mitral dos suínos tanto com idade entre sete e oito meses como das matrizes entre cinco e seis anos não apresentou coloração à reação de NAPH-d (Figuras 4B e 4D).

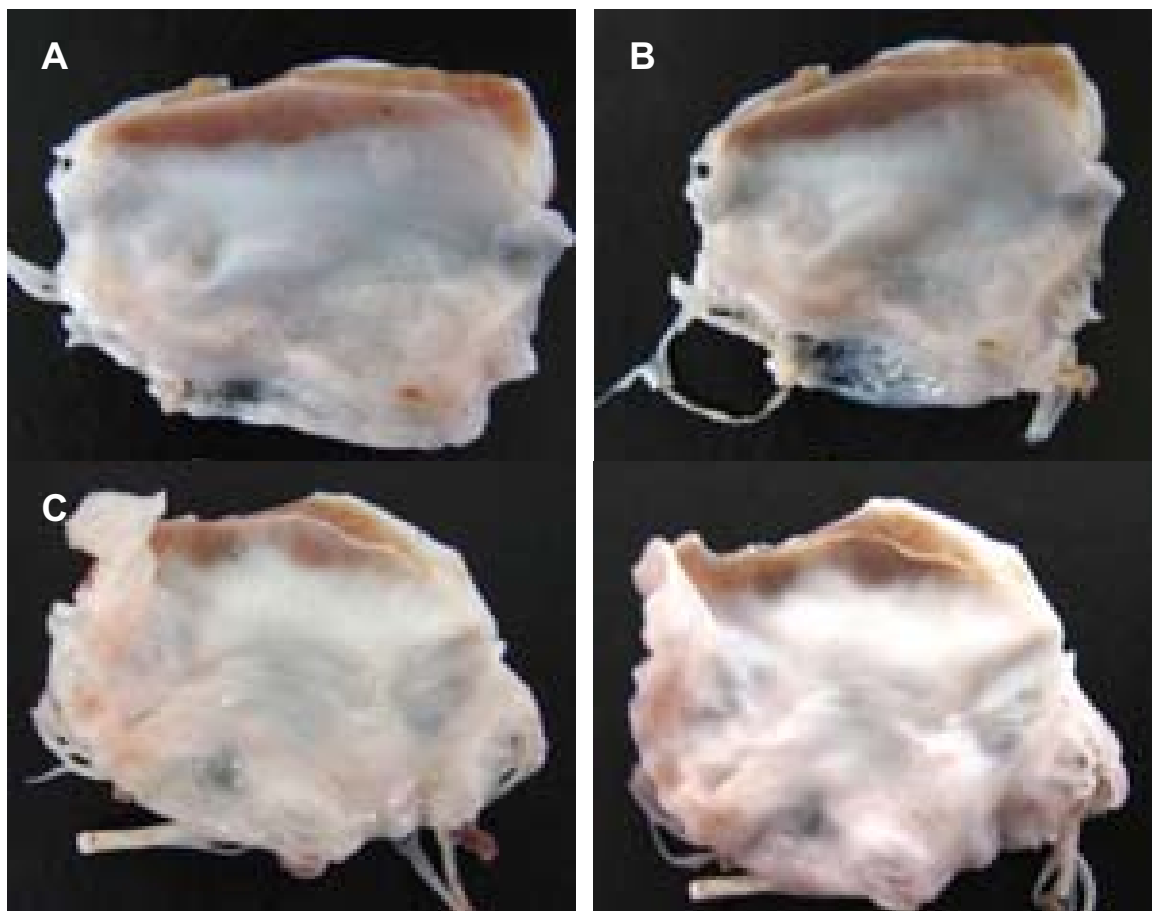


FIGURA 4 - Válvula mitral suína. A) e C) Folheto anterior mitral de suínos jovem e matriz, respectivamente, antes da reação de NAPH-d. B) e D) Folheto anterior mitral dos mesmos animais de A) e C) sem coloração após a reação ao NADPH-d.

Apesar da ausência macroscópica de endocardiose e de coloração à reação de NAPH-d, as válvulas suínas apresentaram diferentes graus de deposição de MPS e degeneração do colágeno à avaliação microscópica, mas não foi constatada fibrose em nenhuma dessas válvulas (Tabela 4 e Figura 5).

TABELA 4 - Avaliação microscópica das válvulas suínas às colorações de HE, Alcian Blue e Masson de acordo com a idade

Idade	Deposição de MPS			Degeneração do colágeno				Fibrose
	Discreta	Moderada	Acentuada	Sem	Pequena	Grande área	Destruição total	Sem
7 a 8 m	30% (3)	70% (7)	0% (0)	20% (2)	40% (4)	30% (3)	10% (1)	100% (10)
Matrizes	33,3% (4)	58,3% (7)	8,3% (1)	16,7% (2)	25% (3)	41,7% (5)	16,7% (2)	100% (12)
Total	31,8% (7)	63,6% (14)	4,5% (1)	18,2% (4)	31,8% (7)	36,4% (8)	13,6% (3)	100% (22)

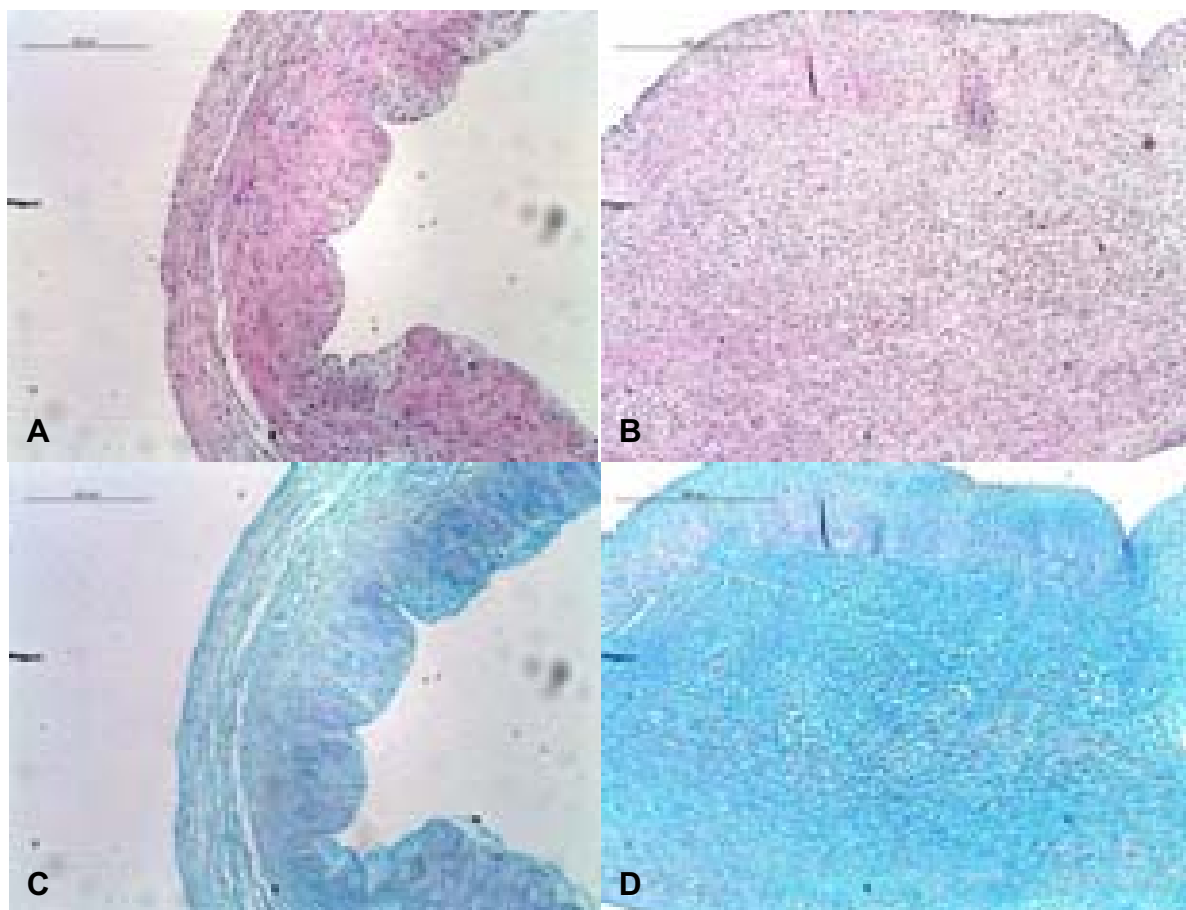


Figura 5 - Válvula mitral suína. A) e C) Normais. Manutenção da estrutura valvular em camadas. Da esquerda para a direita camadas atrial, esponjosa, fibrosa e ventricular. Colorações HE e Alcian, respectivamente. B) Degeneração do colágeno. HE. D) Deposição de mucopolissacarídeos. Alcian blue.

DISCUSSÃO

A DMVM é uma doença valvular com envolvimento genético, especialmente em cães e humanos (SWENSON et al., 1996; OLSEN et al., 2003), mas pouco se conhece sobre os mecanismos valvulares locais envolvidos na sua gênese (OLSEN et al., 2003). Contudo, mediadores químicos como o NO e a endotelina são apontados no desenvolvimento da DMVM, já que são importantes reguladores do metabolismo na MEC (VON DER LEYEN et al., 1995; MYERS & TANNER, 1998).

A nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato diaforese (NADPH) é um cofator na síntese de NO, via catálise por ação NOS (KIECHLE & MALINSKY, 1993; DRÖGE, 2002; MOESGAARD et al., 2007). De acordo com esse fundamento, a reação de NADPH-d é comumente utilizada para avaliar a expressão de NOS e, indiretamente, de NO (OLSEN et al., 2003), embora não diferencie as isoformas de NOS (MOESGAARD et al., 2007). Neste estudo foi possível mensurar a atividade da NOS em válvulas caninas normais e com DMVM, havendo relação entre a intensidade da reação e a deposição de MPS e degeneração do colágeno, o que reitera a hipótese de envolvimento do NO na gênese da doença degenerativa valvular canina, conforme descrevem OLSEN et al. (2003).

Ainda, o fato de todas as válvulas caninas terem apresentado reação à NAPHD indica ação do NO tanto no remodelamento mitral fisiológico quanto na doença degenerativa, sendo importante destacar que, em baixas concentrações, o NO atua como mediador regulatório nos processos de sinalização celular, mas, em altas concentrações pode causar danos celulares, incluindo apoptose (FUKUO et al., 1996; MORTENSEN et al., 1999; DRÖGE, 2002).

Não houve relação entre a intensidade da reação de NADPH-d e a fibrose, um critério também avaliado no diagnóstico da DMVM, o que pode ser explicado pelo fato de poucos cães apresentarem fibrose secundária (OLSEN et al., 2003), sendo isso também constatado neste estudo, já que das doze válvulas caninas avaliadas, oito foram incluídas nos escores mais baixos de fibrose (sem fibrose ou pequena área de fibrose) e nenhuma mitral no escore máximo (grande área de fibrose coalescida). Com isso, parece claro que o aumento da espessura

de válvulas com doença degenerativa mixomatosa não está diretamente relacionado à deposição de tecido conjuntivo fibroso e sim de MPS.

Também nas válvulas caninas houve relação entre a intensidade da reação de NADPH-d, caracterizada por escores de coloração, e o grau de endocardiose mensurado em avaliação microscópica, o quanto maior a intensidade da reação maior o processo degenerativo da válvula mitral no ápice do folheto anterior da mesma, similar ao descrito por OLSEN et al. (2003), que mensuraram o grau de endocardiose macroscopicamente.

Nos folhetos da válvula mitral suína não foram observados sinais macroscópicos de endocardiose e não houve coloração à reação de NADPH-d tanto em animais jovens quanto em matrizes, embora MOESGAARD et al. (2007) tenham observado a expressão espúria de eNOS (sintase do óxido nítrico endotelial), utilizando a técnica de *western blotting*, principalmente nas células endoteliais, que representam a menor porção do total de células da válvula mitral de suínos. Nesse contexto, sugere-se que a quantidade de NOS não tenha sido suficiente para que ocorresse a reação. Outro fato que pode ter contribuído para a ausência da reação é a possível diferença estrutural entre as mitrais suína e canina, já que, embora não objeto deste estudo, observou-se que a camada endotelial da válvula suína é aparentemente mais espessa que a do cão, interferindo, de alguma forma, na reação de NADPH-d.

Vale ressaltar que, na literatura consultada, não foram encontradas citações sobre a utilização da reação de NADPH-d como método de avaliação da NOS na válvula suína, o que faz deste um trabalho pioneiro. Ainda, mesmo trabalhando com espécie e metodologia diferentes às deste estudo, AUPPERLE et al. (2009) descreveram a possibilidade de diferenças estruturais e funcionais entre as válvulas canina e humana, sendo aqui sugerido que isso também possa ocorrer com a mitral da espécie suína.

A ausência de sinais macroscópicos de endocardiose, a despeito da idade e número de animais avaliados (avaliadas 680, selecionadas 22), associada a ausência de coloração à reação de NADPH-d, traz questionamentos acerca do processo de degeneração mixomatosa valvular na espécie suína. Será mesmo tão comum a DMVM suína como refere a literatura? (POMERANCE, 1966; SAVAGE et al., 1983; GUARDA et al., 1988; CASTAGNARO et al., 1997;

AMORESANO et al., 2000). Ou a patogenia da DMVM nessa espécie difere das demais? Considerando os resultados deste estudo e algumas observações de outros autores (AUPPERLE et al., 2009), diferenças parecem evidentes tanto no que diz respeito a incidência quanto ao desenvolvimento da doença, já que mesmo sem sinais macroscópicos foram verificadas alterações microscópicas envolvidas no processo de degeneração mixomatosa da mitral (deposição de MPS, degeneração do colágeno e fibrose) tanto em suínos jovens quanto em matrizes.

CONCLUSÕES

A ação do NO na válvula mitral canina pode ser avaliada, mesmo que indiretamente, pela reação de NADPH-d, sendo que esse mediador biológico está envolvido tanto no remodelando fisiológico da MEC quanto na patogenia da endocardiose mitral nessa espécie. Na mitral suína, a ausência de reação de NADPH-d corrobora a ausência de lesões macroscópicas de endocardiose, sugerindo ação restrita do NO no remodelamento da MEC ou diferenças estruturais na válvula desta espécie.

REFERÊNCIAS

1. AMORESANO, A.; AMEDEO, S.; D'ANDREA, G.; SICILIANO, R.; GAGNA, C.; CASTAGNARO, M.; MARINO, G.; GUARDA, F. N-Linked glycans of proteins from mitral valves of normal pigs and pigs affected by endocardiosis. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.267, p.1299 – 1306, 2000.
2. AUPPERLE, H.; THIELEBEIN, J.; KIEFER, B.; MÄRZ, I.; DINGES, G.; SCHOON, H. A. An immunohistochemical study of the role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in chronic mitral valvular disease (valvular endocardiosis) in dogs. **The Veterinary Journal**, London, v.180, p.88-94, 2009.
3. CASTAGNARO, M.; AMEDEO, S.; BERTOLOTTO, A.; MANZARDO, E.; RICCIO, S.; GUARDA, F. Morphological and biochemical investigations of mitral valve endocardiosis in pigs. **Research in Veterinary Science**, London, v.62, p.121 – 125, 1997.

4. DAS, K. M.; TASHJIAN, R. J. Chronic mitral valve disease in the dog. **Veterinary Medicine**, Chicago, v.60, p.1209-1216, 1965.
5. DAWSON, T. M.; BREDT, D. S.; FOTUHI, M.; HWANG, P. M.; SNYDER, S. H. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissue. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America**, Washington, v.88, p.7797-7801, 1991.
6. DISATIAN, S. **Valve interstitial cell phenotypes and signaling pathways involved with canine mixomatous degenerative mitral valve disease**. 2008. 133f. Dissertation (Doctor of philosophy) – Departament of Clinical Sciences, Colorado State University, Fort Collins.
7. DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, Baltimore, v.82, p.47–95, 2002.
8. DURBIN, A. D.; GOTLIEB, A. I. Advances towards understanding heart valve response to injury. **Cardiovascular Pathology**, Philadelphia v.11, p.69–77, 2002.
9. FUKUO, K.; HATA, S.; SUHARA, T.; NAKAHASHI, T.; SHINTO, Y.; TSUJIMOTO, Y.; MORIMOTO, S.; OGIHARA, T. Nitric oxide induces up regulation of Fas and apoptosis in vascular smooth muscle. **Hypertension**, Dallas, v.27, p.823–826. 1996
10. GUARDA, F.; NEGRO, M.; AMADEO, S. The pathology of mitral valve prolapse in swine. **Schweizer Archiv fur Tierheilkunde**, Berna, v.130(10), p.583-590, 1988.
11. HOPE, B. T.; MICHAEL, G. J.; KNIGGE, K. M.; VICENT, S. R. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.88, p.2811-2814, 1991.
12. KIECHLE, F. L.; MALINSKI, T. Nitric oxid – biochemistry, pathophysiology, and detection. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia v.100, p.567-575, 1993.
13. KOGURE, K. Pathology of chronic mitral valvular disease in the dog. **Japanese Journal of Veterinary Science**, Tokio, v.42, p.323-335, 1980.
14. KVART, C.; HAGGSTOM, J.; PEDERSEN, H. D. Efficacy of enalapril therapy for prevention of congestive heart failure in dogs with myxomatous valve disease and asymptomatic mitral regurgitation. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v. 16, p.80-88, 2002.

15. MOESGAARD, S. G.; OLSEN, L. H.; AASTED, B.; VIUFF, B. M.; PEDERSEN, L. G.; PEDERSEN, H. D.; HARRISON, A. P. Direct measurements of nitric oxide release in relation to expression of endothelial nitric oxide synthase in isolate porcine mitral valves. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, v.54, p.156 – 160, 2007.
16. MORTENSEN, K.; SKOUV, J.; HOUGAARD, D. M.; LARSSON, L. I. Endogenous endothelial cell nitric-oxide synthase modulates apoptosis in cultured breast cancer cells and is transcriptionally regulated by p53. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.274, p.37679–37684. 1999
17. MUCHA, C. J. **Caracterização morfológica da valva mitral de cães normais e com degeneração valvar mixomatosa**. 2002. 67f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
18. MUCHA, C. J. Insuficiência valvular mitral: Endocardiose mitral. In: BELERENIAN, G. C.; MUCHA, C. J.; CAMACHO, A. A. **Afecções Cardiovasculares em Pequenos Animais**. São Caetano do Sul: Interbook, 2003. cap.15, p.146 – 151.
19. MYERS, P. R.; TANNER, M. A. Vascular endothelial cell regulation of extracellular matrix collagen. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, Dallas, v.18, p.717–722, 1998.
20. OLSEN, L. H.; MORTENSEN, K.; MARTINUSSEN, T.; LARSSON, L. I.; BAANDRUP, U.; PEDERSEN, H. D. Increased NADPH-diaphorase activity in canine myxomatous mitral valve leaflets. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v.129, p.120 – 130, 2003.
21. PEDERSEN, H. D.; HAGGSTROM, J. Mitral valve prolapse in the dog: a model of mitral valve prolapse in man. **Cardiovascular Research**, New York, v.47, p.234 – 243, 2000.
22. PEDERSEN, L. G.; ZHAO, J.; YANG, J.; THOMSEN, P. D.; GREGERSEN, H.; HASENKAM, J. M.; SMERUP, M.; PEDERSEN, H. D.; OLSEN, L. H. Increased expression of endothelin B receptor in static stretch exposed porcine mitral valve leaflets. **Research in Veterinary Science**, London, v.82, p.232 – 238, 2007.
23. POMERANCE, A. Pathofenesis of “senile” nodular sclerosis of atrio-ventricular valves. **British Heart Journal**, London, v.31, p.343-351, 1969.
24. SAVAGE, D. D; DEVEREUX, R. B.; GARRISON, R. J. mitral valve prolapse in the general population. II. Clinical features: The Framingham Study. **American Heart Journal**, Dallas, v.106(3), p.577-581, 1983
25. SCHERER-SINGLER, U.; VICENT, S. R.; KIMURA, H.; McGEER, E. G. Demonstration of unique population of neurons with NADPH-diaphorase

histochemistry. **Journal of Neuroscience Methods**, Amsterdam, v.9, p.229-234, 1983.

26. SWENSON, L.; HÄGGSTRÖM, J.; KVART, C.; JUNEJA, R. K. Relationship between parental cardiac status in Cavalier King Charles Spaniels and prevalence and severity of chronic valvular disease in offspring. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.208, p.2009-2012, 1996.
27. VON DER LEYEN, H. E.; GIBBONS, G. H.; MORISHITA, R.; LEWIS, N. P.; ZHANG, L.; NAKAJIMA, M.; KANEDA, Y.; COOKE, J. P.; DZAU, V. J. Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesions: in vivo transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.92, p.1137–1141, 1995

CAPÍTULO 3 - ASPECTOS HISTOLÓGICOS E EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASES 2 E 9 NA VÁLVULA MITRAL DE CÃES E DE SUÍNOS

HISTOLOGICAL ASPECTS AND METALLOPROTEINASE 2 AND 9 EXPRESSION IN MITRAL VALVES OF DOGS AND SWINE

RESUMO

A degeneração mixomatosa da válvula mitral (DMVM) ou endocardiose mitral caracteriza-se pelo acúmulo de mucopolissacarídeos (MPS) no endocárdio mitral, relacionada à idade e observada em humanos, cães e suínos. As metaloproteinases (MMP), enzimas proteolíticas dependentes do zinco e responsáveis pelo remodelamento da matriz extracelular (MEC), vêm sendo estudadas na gênese da DMVM. O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão de MMP-2 e MMP-9 no folheto anterior da válvula mitral canina com e sem DMVM, bem como em suínos jovens e matrizes, relacionando os achados histológicos e imunistoquímicos. Foram utilizadas 25 mitrais de cães 32 de suínos. As válvulas foram avaliadas macroscopicamente quanto à ocorrência ou não de endocardiose, fixadas em paraformaldeído a 4%, processadas rotineiramente, submetidas à reação de imunistoquímica e avaliadas microscopicamente quanto à intensidade de marcação, número de células marcadas e quanto à deposição de mucopolissacarídeos (MPS), degeneração do colágeno e fibrose. Nos cães, a DMVM é caracterizada por acúmulo de MPS. Essa deposição e a degeneração do colágeno estão relacionadas ao grau de endocardiose e à gravidade da doença valvular. As enzimas MMP-2 e MMP-9 estão envolvidas no processo de degeneração mixomatosa da válvula canina. Em suínos, mesmo na ausência macroscópica de endocardiose, podem ser observadas alterações como deposição de MPS, degeneração do colágeno e fibrose. Nesses animais há expressão constitutiva de MMP-2 e MMP-9, sugerindo a participação dessas enzimas no remodelamento da MEC valvular mitral normal.

Palavras-chave: endocardiose, metaloproteinase, mucopolissacarídeos.

ABSTRACT

Myxomatous mitral valve degeneration (MMVD) or mitral valve endocardiosis is an age-related disease characterized by the mucopolysaccharide (MPS) deposition and by collagen degeneration in mitral valves, especially in humans, dogs and swine. The metalloproteinases, proteolytic enzymes that depends on zinc, are responsible for the extracellular matrix (MEC) remodeling in many tissues and play a role on MMVD genesis. The aim of this study was to evaluate MMP-2 and MMP-9 expression in the anterior leaflet of dogs with and without MMVD, as well as in young swine and female, comparing the histological and immunohistochemical findings. Twenty-five mitral valves of dogs and thirty-two of swine were used for the research. The valves were macroscopically evaluated for the occurrence or not of endocardiosis. They were fixed in a 4% paraformaldehyde, routinely processed and submitted to immunohistochemical reaction and evaluated for the intensity of antigen labelling and for the number of positive cells, as well as MPS deposition, collagen degeneration and fibrosis. In dogs, MMVD is characterized by MPS accumulation. These MPS deposition and collagen degeneration are related to the endocardiosis level and to the severity of the valvular disease. The MMP-2 and MMP-9 enzymes are involved in dogs myxomatous mitral valve degeneration process. In swine, even with the lack of microscopical endocardiosis, MPS deposition, collagen degeneration and fibrosis occurred. In these animals, valves also expressed constitutively MMP-2 and MMP-9, which suggest the action of these enzymes in the normal MEC mitral valvular remodeling.

Keywords: endocardiosis, metalloproteinase, mucopolysaccharide.

INTRODUÇÃO

A degeneração mixomatosa da válvula mitral (DMVM) é a doença cardíaca de maior prevalência em cães (MUCHA, 2003; OLSEN et al., 2003), tendo altos índices de morbidade e mortalidade (MUCHA, 2002). Também observada nas espécies humana e suína (PEDERSEN et al., 2007), a DMVM está diretamente relacionada à idade e, em humanos, às síndromes congênitas de degeneração do colágeno (AMORESANO et al., 2000).

A progressiva mudança mixomatosa valvular possivelmente representa resposta ao repetido impacto, levando a disfunção endotelial (OLSEN et al., 2003; DURBIN & GOTLIEB, 2002). A válvula torna-se progressivamente aumentada, espessada e insuficiente com a evolução da doença (KOGURE, 1980; OLSEN et al., 2003).

As metaloproteinases (MMP) compõem um conjunto de enzimas proteolíticas dependentes do zinco, responsáveis pelo remodelamento da matriz extracelular (MEC) em processos normais e patológicos de vários tecidos (HAY, 1981; BIRKEDAL-HANSEN, 1995). A atividade das MMP é regulada por inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP) (STRICKLIN et al, 1983), sendo importante a proporção entre MMP e TIMP, já que o aumento da atividade das MMP pode alterar o equilíbrio entre a síntese e a degradação de MEC, resultando em mudanças morfológicas e propriedades mecânicas teciduais (STETLER-STEVENSON, 1996; VU et al, 1998).

Variações na expressão de MMP e seus mRNA em válvulas cardíacas com degeneração sugere a participação dessas proteínas no remodelamento valvular patológico (SOINI et al., 2001; TOGASHI et al., 2007). Nesse contexto, RABIKIN et al. (2001) observaram aumento na expressão de colagenases (MMP-1 e MMP-13) e gelatinases (MMP-2 e MMP-9) na mitral humana com degeneração quando comparado a válvulas normais e concluíram que o aumento da atividade da MMP é uma característica da patogenia da degeneração valvular humana.

Em cães, AUPPERLE et al. (2009) verificaram a expressão de MMP-2, MMP-14, TIMP-2 e TIMP-3 nas células estromais da válvula mitral normal. Com o desenvolvimento e a evolução da doença valvular, a expressão de MMP-2

diminuiu e as de MMP-14 , de TIMP-2 e TIMP-3 aumentaram, sugerindo que as alterações na expressão e a distribuição dessas enzimas na válvula estão envolvidas na patogenia da DMVM canina. Isso resulta na degradação da MEC valvular e, conseqüentemente, no acúmulo de MPS que compromete a função e a estrutura da válvula.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão de MMP-2 e MMP-9 no folheto anterior da válvula mitral canina com e sem endocardiose, bem como na mitral de suínos jovens e de matrizes, relacionando os achados histológicos e imunoistoquímicos.

MATERIAL E MÉTODOS

a) Animais

Cães: foram obtidas 25 mitrales de animais adultos a idosos, 14 machos e 11 fêmeas, sem restrição quanto à raça, durante o exame necroscópico dos mesmos no Setor de Patologia Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO. As válvulas foram colhidas aleatoriamente, sendo selecionadas aquelas que apresentavam morfologia macroscópica normal e de endocardiose.

Suínos: foi colhida a mitral de 10 animais de ambos os sexos e com idade entre sete e oito meses, bem como de 22 matrizes com idade entre cinco e seis anos, totalizando 32 válvulas. Todos os suínos eram mestiços (Large White - Landrace) e a colheita foi realizada durante a inspeção do coração, após abate em frigorífico (Sol Nascente, Goiânia, GO).

b) Delineamento experimental

A válvula mitral de todos os animais foi colhida em até, no máximo, uma hora após a morte, por meio de cortes nos músculos papilares e no anel valvular, obtendo-se o aparelho mitral completo. Cada válvula foi inicialmente avaliada quanto à presença ou ausência de endocardiose e, na sequência, fixada por 24 horas em paraformaldeído a 4%, à temperatura entre 4° e 8°C.

A etapa seguinte compreendeu o recorte do folheto anterior da válvula mitral (FAVM), em orientação perpendicular, do anel valvular até o ápice do folheto, para processamento, inclusão em parafina e confecção das lâminas. Na sequência, realizaram-se as colorações de Hematoxilina e Eosina, Alcian blue e Tricrômio de Masson para a avaliação histológica quanto à degeneração do colágeno, deposição de MPS e fibrose, respectivamente (Tabela 1) (OLSEN et al., 2003).

O grau de endocardiose da mitral canina também foi avaliado microscopicamente, medindo-se a espessura do ápice do FAVM, por meio do software ImageJ Launcher (National Institutes of Health, Bethesda, MD, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), conforme critérios propostos por OLSEN et al. (2003) (Tabela 1).

TABELA 1 – Critérios de avaliação microscópica das válvulas caninas e suínas

Alterações microscópicas no folheto anterior da válvula mitral de cães e suínos
Deposição de mucopolissacarídeos

Sem sinais de deposição

Discreta deposição na camada esponjosa e/ou fibrosa com as camadas do folheto intactas

Moderada deposição na camada esponjosa e/ou fibrosa com ruptura das camadas do folheto

Acentuada deposição na camada esponjosa e/ou fibrosa sem estrutura de camadas

Degeneração do colágeno

Sem sinais de degeneração do colágeno com feixes de colágeno intactos na fibrosa

Pequena área de degeneração do colágeno na fibrosa

Grande área de degeneração do colágeno na fibrosa, mas com distinção da mesma

Destruição da fibrosa com degeneração das fibras colágenas dispostas em redemoinhos

Fibrose

Sem sinais de fibrose

Pequena área de fibrose

Grande área de fibrose, mas separada

Grande área de fibrose coalescida

Grau de endocardiose no folheto anterior da mitral canina

Discreta – Espessamento do folheto e/ou nódulos <1,5mm

Moderada - Espessamento do folheto e/ou nódulos entre 1,5 e 3mm

Acentuada - Espessamento do folheto e/ou nódulos >3mm

Para a avaliação imunoistoquímica foram confeccionados cortes de 3µm e estes distendidos sobre lâminas histológicas silanizadas (Organosilano3-Aminopropyl-Trietoxy silane - Sigma Chemical CO - A 3648). Prosseguiram-se as etapas de desparafinização, hidratação e lavagem em água destilada. Para o anticorpo monoclonal anti-MMP-2, clone A-Gel VC2 (DBS - Mob 312) foram empregadas a diluição de 1:25, a recuperação antigênica em banho-maria a

96°C, por 20 minutos, com tampão citrato pH 6,0 e a incubação em câmara úmida, durante 18 horas à 4°C. Para o anticorpo policlonal anti-MMP-9 (Dako A0150) foram utilizadas a diluição de 1:100, a recuperação antigênica em banho-maria a 96°C, por 20 minutos, com tampão TRIS-EDTA pH9,0 e incubação em câmara úmida, por 1h à 27°C. Os bloqueios da peroxidase endógena e de fundo foram realizados em H₂O₂ a 8% e em leite em pó desnatado, respectivamente. Como anticorpo secundário utilizou-se o sistema de amplificação de sinais Advance (Dako K4068) e, para a visualização da reação, DAB (Dako K3468-1). Tampão TRIS pH7,4 e água destilada foram utilizados entre as etapas para a lavagem das lâminas. Os cortes foram submetidos a contracoloração em Hematoxilina de Mayer, lavagem, desidratação, diafanização, montagem com resina sintética e análise em microscópio óptica.

A intensidade de marcação dos anticorpos (MMP-2 e MMP-9) foi avaliada de forma semi-quantitativa, utilizando-se os escores negativo, mínimo, discreto, moderado e acentuado. O número de células marcadas foi de forma semelhante, empregando-se os escores negativo, células ocasionalmente marcadas (<10%), células frequentemente marcadas (10-30%), numerosas células marcadas (30-70%) e a maioria das células marcadas (>70%), conforme critérios de AUPPERLE et al. (2009).

c) Análise estatística

Foram utilizados dados descritivos e o coeficiente de Spearman para a avaliação dos grupos, uma vez que compreendem de variáveis não paramétricas. Os dados foram processados no programa de análise estatística SPSS (Statistical Package for the Social Science) versão 16.0, sendo considerado efeito significativo quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

a) Cães

À avaliação macroscópica foram obtidas onze válvulas caninas normais e quatorze com sinais de endocardiose, confirmados ao exame microscópico (Figura 1).

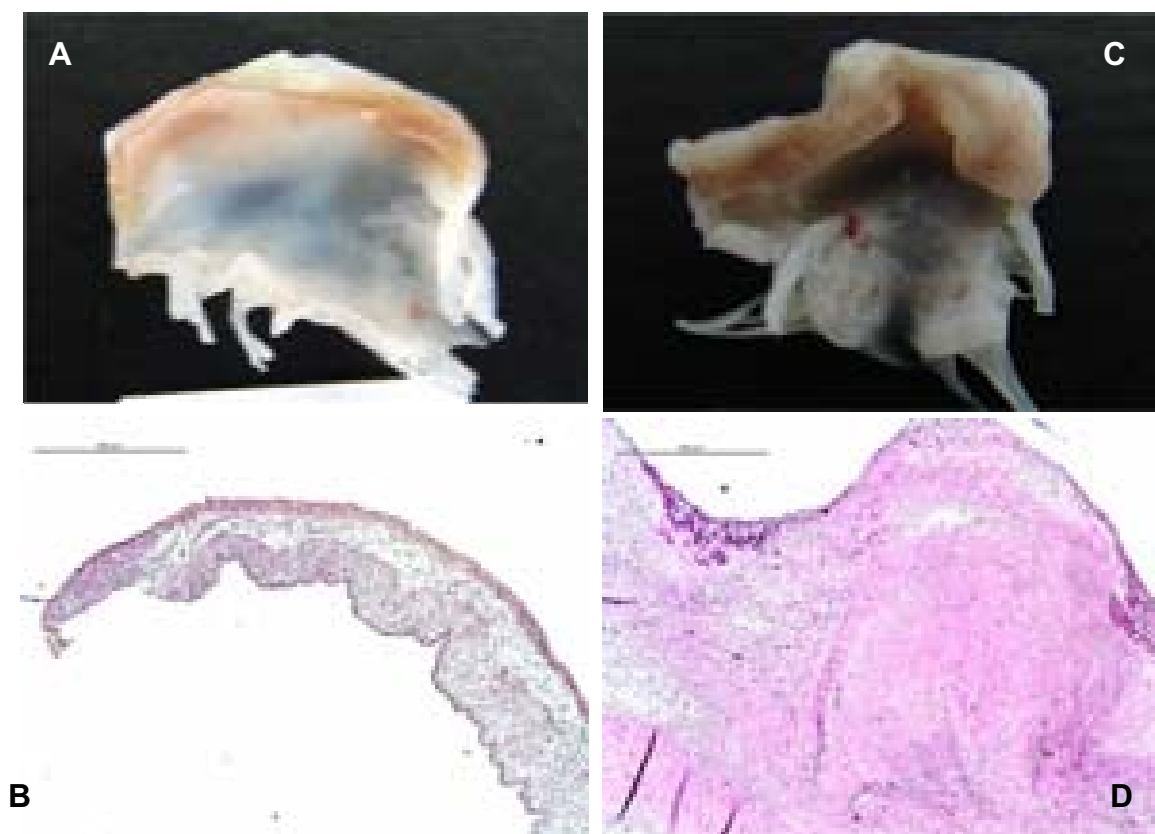


FIGURA 1 - Válvula mitral canina. A) e B) Aspectos macroscópico e microscópico (coloração de HE) do folheto anterior mitral sem sinais de degeneração mixomatosa, respectivamente. C) e D) Aspectos macroscópico e microscópico (coloração de HE) do folheto anterior com DMVM.

Na comparação entre o grau de DMVM e a deposição de MPS, assim como entre esse mesmo grau e a degeneração do colágeno no FAVM de cães observou-se que conforme aumenta o grau de endocardiose aumentam também a

deposição de MPS e a degeneração do colágeno ($p < 0,05$) (Tabela 2). Já na comparação entre a o grau de DMVM e a fibrose não houve diferença.

TABELA 2 – Comparação entre a deposição de MPS e degeneração do colágeno na área apical do FAVM do cão e o grau de endocardiose

Deposição de MPS					
Grau de Endocardiose	Sem	Discreta	Moderada	Acentuada	Total
Normal	54,5%(6)	27,3%(3)	18,2%(2)	0%(0)	100%(11)
Discreta	0%(0)	0%(0)	28,6%(2)	71,4%(5)	100%(7)
Moderada	0%(0)	0%(0)	33,3%(2)	66,7%(4)	100%(6)
Acentuada	0%(0)	0%(0)	0%(0)	100%(1)	100%(1)
Total	24%(6)	12%(3)	24%(6)	40%(10)	100%(25)
Degeneração do colágeno					
Grau de Endocardiose	Sem	Pequena área	Grande área	Destruição da fibrosa	Total
Normal	81,8%(9)	9,1%(1)	9,1%(1)	0%(0)	100%(11)
Discreta	0%(0)	0%(0)	28,6%(2)	71,4%(5)	100%(7)
Moderada	0%(0)	0%(0)	33,3%(2)	66,7%(4)	100%(6)
Acentuada	0%(0)	0%(0)	0%(0)	100%(1)	100%(1)
Total	36%(9)	4%(1)	20%(5)	40%(10)	100%(25)

Não houve diferença entre o grau de endocardiose e a intensidade de marcação de MMP-2 e MMP-9, assim como não houve diferença entre o grau de DMVM e o número de células marcadas para esses mesmos anticorpos, considerando as quatro camadas do ápice do FAVM ($p > 0,05$). Contudo, considerando o coeficiente de Spearman foi possível observar que conforme o grau de endocardiose aumenta há diminuição na intensidade de marcação e número de células marcadas para MMP-2, bem como aumenta o número de células marcadas para MMP-9 na área apical do FAVM de cães (Tabela 3 e Figura 2).

TABELA 3 - Valores do coeficiente de Spearman obtidos na comparação entre a intensidade de marcação (I) e número de células marcadas (CM) por MMP-2 e MMP-9 nas camadas atrial, esponjosa, fibrosa e ventricular do ápice do FAVM do cão com o grau de endocardiose

Camada	MMP-2 (I)	MMP-2 (CM)	MMP-9 (I)	MMP-9 (CM)
Atrial	-0,053	-0,259	-0,058	-0,079
Esponjosa	-0,181	-0,091	-0,380	0,106
Fibrosa	-0,141	-0,201	0,023	0,440
Ventricular	-0,079	0,021	0,100	0,302

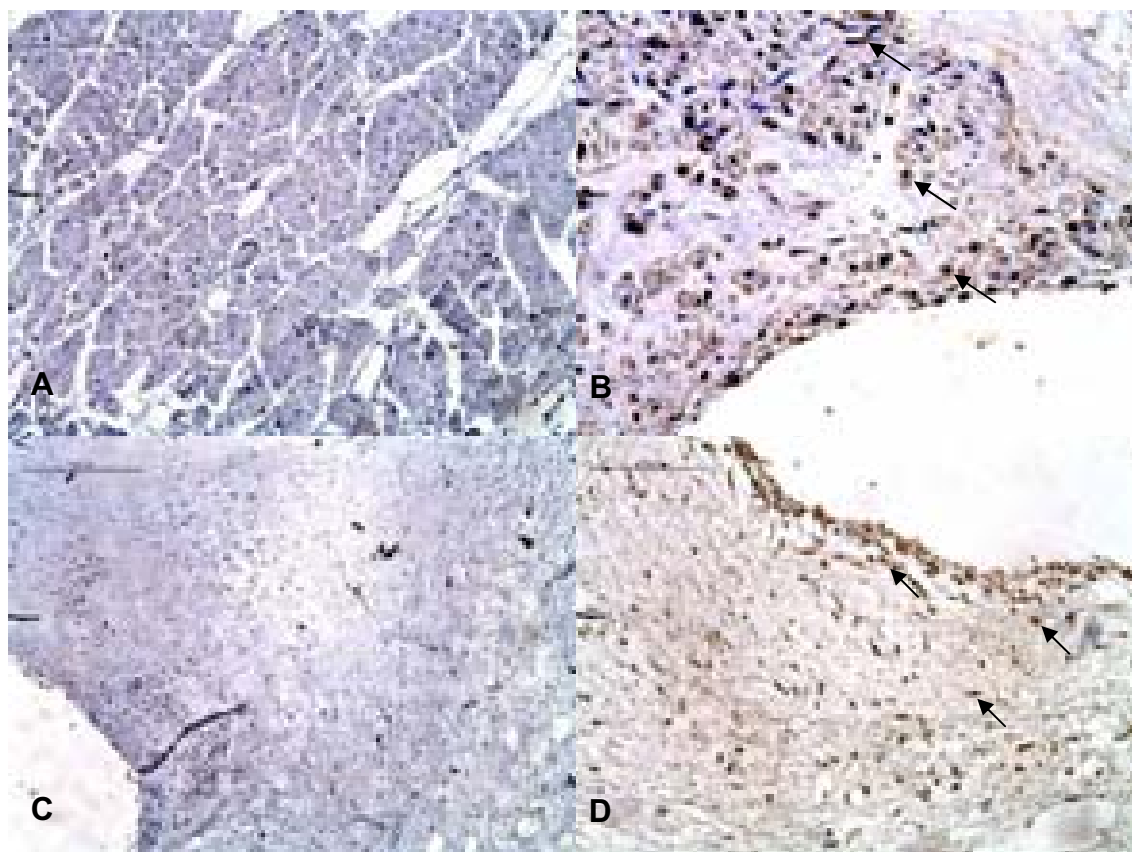


FIGURA 2 - Fotomicrografias de válvula mitral canina. IHQ. A) Ausência de marcação para o anticorpo MMP-2. B) Células da camada fibrosa com marcação para o anticorpo MMP-2 (setas). C) Ausência de marcação para o anticorpo MMP-9. D) Células das camadas atrial e esponjosa marcadas com MMP-9 (setas).

b) Suínos

À avaliação macroscópica foram obtidas dez válvulas normais de suínos jovens e 22 de matrizes, não sendo observadas válvulas com sinais de endocardiose (Figura 3). Apesar disso, as válvulas suínas apresentaram diferentes graus de deposição de MPS, degeneração do colágeno e fibrose à avaliação microscópica.

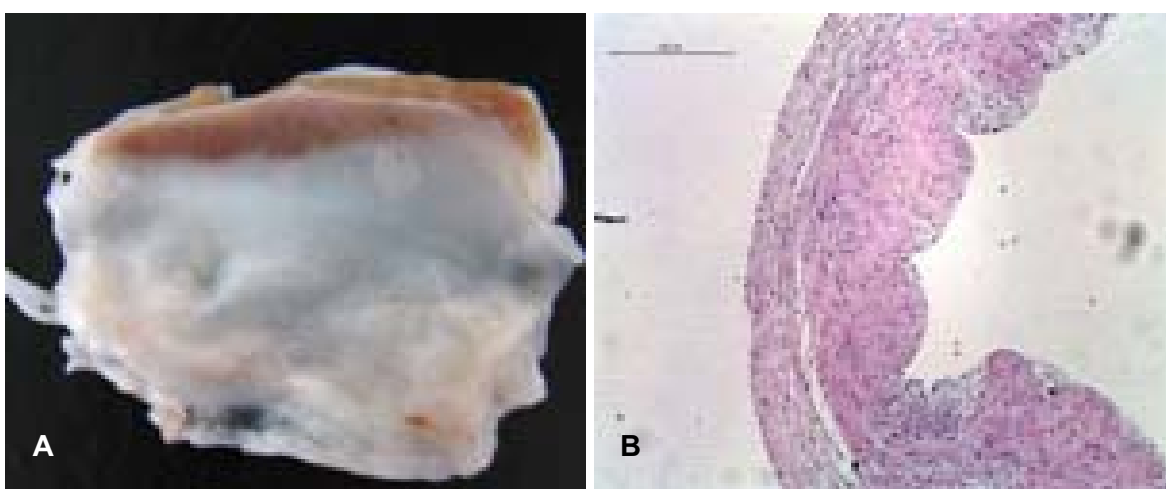


FIGURA 3 - Válvula mitral suína. A) Aspecto macroscópico do folheto anterior mitral sem sinais de degeneração mixomatosa. B) Estrutura morfológica valvular microscópica em camadas. Da esquerda para a direita, atrial, esponjosa, fibrosa e ventricular. HE.

Na comparação entre a deposição de MPS e degeneração do colágeno no FAVM suína e a idade de abate não houve diferença ($p > 0,05$). Já quando considerada a presença de fibrose no FAVM observou-se que esta foi maior nas matrizes ($p < 0,05$).

Quando comparada a intensidade de marcação e o número de células marcadas para MMP-2 nas células das camadas atrial, esponjosa, fibrosa e ventricular do FAVM e a idade dos suínos (jovens e matrizes) não houve diferença significativa ($p > 0,05$).

No que diz respeito à intensidade de células marcadas para MMP-9 nas quatro camadas em comparação com idade dos suínos não foi observada diferença ($p>0,05$), ao contrário do verificado quanto ao número de células marcadas pela MMP-9 na camada esponjosa, que apresentou diferença em relação a idade dos suínos, sendo maior nas matrizes ($p<0,05$) (Figura 4).

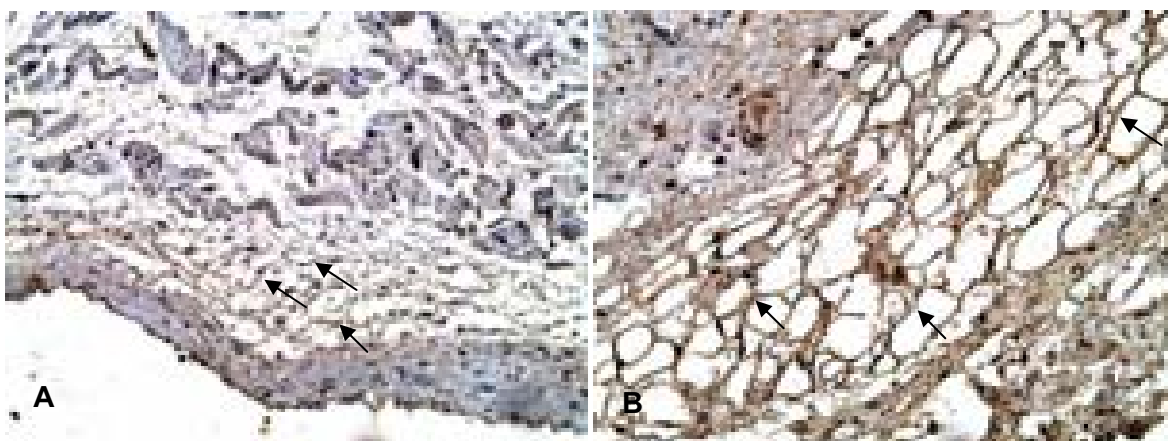


FIGURA 4 - Fotomicrografia de válvula mitral suína. IHQ. A) Camada esponjosa de mitral de suíno jovem com células marcadas para MMP-9 em intensidade discreta (setas). B) Camada esponjosa de mitral de matriz com células marcadas para MMP-9 em intensidade acentuada (setas).

DISCUSSÃO

Neste estudo constatou-se que, nos cães, quanto maior o grau de endocardiose maior é a deposição de MPS, assim como a degeneração do colágeno, o que também é descrito por FENOGLIO et al. (1972), KOGURE (1980), MUCHA (2002), OLSEN et al. (2003) e DISATIAN (2008), confirmando a modificação degenerativa de acúmulo na MEC valvular como a principal alteração da DMVM. Consagrando, portanto, a denominação “degeneração mucóide” proposta por BUCHANAN (1977) e avalizada por KOGURE (1980).

A presença de fibrose nas válvulas caninas, também apontada como uma das possíveis alterações microscópicas da DMVM (KOGURE, 1980; OLSEN

et al., 2003), mas a ausência de relação entre esta e o grau de endocardiose também reitera a observação de OLSEN et al. (2003) quando descrevem que a fibrose trata-se de uma alteração valvular secundária e pouco freqüente na endocardiose canina, mesmo naqueles com graus acentuados da doença. Contudo, esses mesmos autores afirmam que a espessura do folheto não reflete a gravidade da DMVM, o que não está de acordo com o verificado neste estudo, já que quanto maior a deposição de MPS e degeneração do colágeno maior a espessura da válvula e, conseqüentemente, a gravidade da doença valvular.

Já nos suínos, como não foram encontradas válvulas com sinais macroscópicos de endocardiose, mas constatadas alterações microscópicas pertinentes à doença, optou-se por relacioná-las à faixa etária dos animais, não sendo observada relação entre a idade e a deposição de MPS e degeneração do colágeno, mas entre a idade e a fibrose, que foi maior nas matrizes. Nesse sentido, é possível que a presença de fibrose no ápice do FAVM dos suínos se desenvolva ao longo dos anos a partir do repetido impacto entre os folhetos durante o ciclo cardíaco, conforme descreveram DAVIES et al. (1978) em relação à válvula humana e KOGURE (1980) à canina, o que é provável que também ocorra com a mitral suína, justificando a maior evidência dessa variável microscópica nas matrizes em comparação aos suínos jovens.

Ainda, a ausência de válvulas suínas com sinais macroscópicos de endocardiose, a despeito das 680 mitrais avaliadas durante inspeção no abatedouro, pode se justificar pela baixa incidência da doença em suínos jovens, já que GUARDA et al. (1988) relataram DMVM em apenas 0,8% em um total de 2653 suínos abatidos entre oito e nove meses de idade. Ressalta-se que entre as vinte válvulas com diagnóstico macroscópico de endocardiose no estudo de GUARDA et al. (1988), todas apresentaram alterações microscópicas características de doença valvular degenerativa, como deposição de MPS e degeneração do colágeno, o que não ocorreu neste estudo, sendo apenas observadas as alterações microscópicas, o que sugere que tais mudanças possam ocorrer na válvula suína independente da evidenciação macroscópica de DMVM.

No estudo imunoistoquímico das válvulas caninas com e sem DMVM não houve diferença entre o grau de endocardiose e a intensidade de marcação

de MMP-2 e MMP-9, assim como não houve diferença entre o grau de DMVM e o número de células marcadas para esses mesmos anticorpos ($p > 0,05$). Contudo, considerando o coeficiente de Spearman foi possível observar que conforme o grau de endocardiose aumenta há diminuição na intensidade de marcação e número de células marcadas para MMP-2, o que também foi descrito por AUPPERLE et al. (2009) na mitral canina, mas em contraste com o encontrado por RABKIN et al. (2001), SOINI et al. (2001) e KOULLIAS et al. (2004) em válvulas humanas com doença degenerativa, em que há aumento na expressão de MMP-2.

Quanto à MMP-9, AUPPERLE et al. (2009) não obtiveram marcação para essa enzima na mitral canina, em contraste do encontrado neste estudo, em que além de verificar a expressão, constatou-se aumento do número de células marcadas para MMP-9 na área apical do FAVM de cães com endocardiose, como também observaram RABKIN et al. (2001) em válvulas humanas com DMVM. A marcação de MMP-9 em comparação ao estudo citado pode ser justificada por diferenças metodológicas, já que foram empregados anticorpos e diluições diferentes em ambos os experimentos.

As observações relacionadas a alterações de expressão de MMP-2 e MMP-9 em válvulas caninas com doença degenerativa sugerem a participação dessas enzimas no remodelamento da MEC valvular com DMVM, conforme também descrevem SOINI et al. (2001) e RABKIN et al. (2001) na espécie humana. Ainda, segundo STETLER-STEVENSON (1996) e VU et al. (1998), o aumento da atividade das MMP pode alterar o balanço entre a síntese e degradação de MEC, resultando em mudanças na morfologia e propriedades mecânicas do tecido.

A marcação imunoistoquímica das enzimas proteolíticas MMP-2 e MMP-9 foi obtida tanto em válvulas de suínos jovens quanto em matrizes, não havendo diferença entre a intensidade de marcação e número de células marcadas e a idade dos animais para MMP-2. Já no que diz respeito à intensidade de células marcadas para MMP-9 nas quatro camadas em comparação com idade dos suínos não foi observada diferença, ao contrário do verificado quanto ao número de células marcadas por essa enzima na camada esponjosa, que apresentou diferença em relação a idade dos suínos, sendo maior

nas matrizes. Acerca disso, não foram encontrados na literatura consultada trabalhos relacionados à expressão de MMP-2 e MMP-9 na válvula suína, traduzindo o ineditismo deste estudo. Apesar disso, a expressão constitutiva dessas enzimas na mitral dos suínos aponta para sua participação no remodelamento da MEC valvular normal desses animais, o que tem suporte no descrito por HAY (1981) e BIRKEDAL-HANSEN (1995) que enfatizaram a ação dessas, tanto em processos normais quanto patológicos de diferentes tecidos.

Com base nos resultados deste estudo surge o questionamento acerca do padrão de expressão das MMP na válvula suína com evidências macroscópicas de endocardiose e, portanto, com graus mais avançados de doença valvular, já que apenas as observações microscópicas aqui constatadas não podem ser atribuídas a DMVM. Segundo DREGER et al. (2002), em humanos as válvulas cardíacas normais apresentam padrão específico de expressão de MMP, que varia de acordo com os diferentes tipos de válvulas, não sendo observada a expressão de MMP-2 e MMP-9 na mitral humana normal. Em contraste, nas válvulas suínas normais a expressão dessas enzimas reitera o possível envolvimento das MMP no remodelamento da MEC dessa espécie, especialmente considerando a porção apical aqui avaliada, já que compreende o local de maior atrito durante o funcionamento valvular. Ainda, segundo AUPPERLE et al. (2009), há possibilidade de diferenças estruturais e no funcionamento das válvulas, assim como na gênese da degeneração valvular entre as espécies, ressaltando que quando os tecidos necessitam de remodelamento, as MMP são rapidamente induzidas e ativadas, por isso o aumento na expressão de MMP na endocardiose.

CONCLUSÕES

Nos cães, a DMVM é caracterizada especialmente por acúmulo de MPS, sendo que essa deposição e a degeneração do colágeno estão diretamente relacionadas ao grau de endocardiose e, conseqüentemente, a gravidade da doença valvular. Ainda, as enzimas MMP-2 e MMP-9 estão envolvidas no processo de degeneração mixomatosa da válvula mitral canina. Em suínos,

mesmo na ausência macroscópica de endocardiose podem ser observadas alterações como deposição de MPS, degeneração do colágeno e fibrose, sendo esta última evidente em matrizes. Também, nesses animais há expressão constitutiva de MMP-2 e MMP-9, sugerindo a participação dessas enzimas no remodelamento da MEC valvular mitral normal em suínos jovens e matrizes.

REFERÊNCIAS

1. AMORESANO, A.; AMEDEO, S.; D'ANDREA, G.; SICILIANO, R.; GAGNA, C.; CASTAGNARO, M.; MARINO, G.; GUARDA, F. N-Linked glycans of proteins from mitral valves of normal pigs and pigs affected by endocardiosis. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.267, p.1299 – 1306, 2000.
2. AUPPERLE, H.; THIELEBEIN, J.; KIEFER, B.; MÄRZ, I.; DINGES, G.; SCHOON, H. A. An immunohistochemical study of the role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in chronic mitral valvular disease (valvular endocardiosis) in dogs. **The Veterinary Journal**, London, v.180, p.88-94, 2009.
3. BIRKEDAL-HANSEN, H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. **Current Opinion in Cell Biology**, London, v.7, p.728-735, 1995.
4. BUCHANAN, J. W. Chronic valvular disease (endocardiosis) in the dogs. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, San Diego, v.21, p.75-106, 1977.
5. DAVIES, M. J.; MOORE, B. P., BAIMBRIGE, M. V. The floppy mitral valve. Study of incidence, pathology, and pathology, and complications in surgical, necropsy, and forensic material. **British Heart Journal**, London, v.40, p.468-481, 1978.
6. DISATIAN, S. **Valve interstitial cell phenotypes and signaling pathways involved with canine mixomatous degenerative mitral valve disease**. 2008. 133f. Dissertation (Doctor of Philosophy) – Department of Clinical Sciences, Colorado State University, Fort Collins.
7. DREGER, S. A.; TAYLOR, P. M.; ALLEN, S. P. et al. Profile and localization of matrix metalloproteinase (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) in human heart valves. **Journal of Heart Valve Disease**, St. Paul, v.11, p.875-880, 2002
8. DURBIN, A. D.; GOTLIEB, A. I. Advances towards understanding heart valve response to injury. **Cardiovascular Pathology**, Philadelphia v.11, p.69–77, 2002.

9. FENOGLIO Jr., J. J.; PHAN, T. D.; WIT, A. L.; BASSET, A. L.; WAGNER, B. M. Canine mitral complex: Ultrastructural and electromechanical properties. **Circulation Research**, Baltimore, v.31, p.417-430, 1972.
10. GUARDA, F.; NEGRO, M.; AMADEO, S. The pathology of mitral valve prolapse in swine. **Schweizer Archiv fur Tierheilkunde**, Berna, v.130(10), p.583-590, 1988.
11. HAY, E. D. Extracellular matrix. **Journal of Cell Biology**, New York, v.91, p.205s-223s, 1981.
12. KOGURE, K. Pathology of chronic mitral valvular disease in the dog. **Japanese Journal of Veterinary Science**, Tokio, v.42, p.323-335, 1980.
13. KOULLIAS, G. J.; KORKOLI, D. P.; RAVICHANDRAN, P.; PSYRRI, A.; HATZARA, I.; ELEFTERIADES, J.A. Tissue microarray detection of matrix metalloproteinases in diseased tricuspid and bicuspid aortic valves with or without pathology of the ascending aorta. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, Berlin, v.26, p.1098–1103, 2004.
14. MUCHA, C. J. **Caracterização morfológica da valva mitral de cães normais e com degeneração valvar mixomatosa**. 2002. 67f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
15. MUCHA, C. J. Insuficiência valvular mitral: Endocardiose mitral. In: BELERENIAN, G. C.; MUCHA, C. J.; CAMACHO, A. A. **Afecções Cardiovasculares em Pequenos Animais**. São Caetano do Sul: Interbook, 2003. cap.15, p.146 – 151.
16. OLSEN, L. H.; MORTENSEN, K.; MARTINUSSEN, T.; LARSSON, L. I.; BAANDRUP, U.; PEDERSEN, H. D. Increased NADPH-diaphorase activity in canine myxomatous mitral valve leaflets. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v.129, p.120 – 130, 2003.
17. PEDERSEN, L. G.; ZHAO, J.; YANG, J.; THOMSEN, P. D.; GREGERSEN, H.; HASENKAM, J. M.; SMERUP, M.; PEDERSEN, H. D.; OLSEN, L. H. Increased expression of endothelin B receptor in static stretch exposed porcine mitral valve leaflets. **Research in Veterinary Science**, London, v.82, p.232 – 238, 2007.
18. RABKIN, E.; AIKAWA, M.; STONE, J. R.; FUKOMOTO, Y.; LIBBY, P.; SCHOEN, F. J. Activated interstitial myofibroblast express catabolic enzymes and mediate remodeling in myxomatous heart valves. **Circulation**, Dallas, v.104, p.2522-2532, 2001.

19. SOINI, Y.; SATTA, J.; MÄÄTÄ, M.; AUTIO-HARMAINEN, H. Expression of MMP-2, MMP9, MT1-MMP, TIMP1, and TIMP2 mRNA in valvular lesions of the heart. **Journal of Pathology**, Sussex, v.194, p.225-231, 2001.
20. STETLER-STENVENSON, W. G. Dynamics of matrix turnover during pathologic remodeling of the extracellular matrix. **American Journal of Pathology**, Bethesda, v.148, p.1345-1350, 1996.
21. STRICKLIN, G. P.; JEFFREY, J. J.; ROSWIT, W. T.; EISEN, A. S. Human skin fibroblast procollagenase: Mechanisms of activation by organomercurials and trypsin. **Biochemistry**, Easton, v.22, p.61-68, 1983.
22. TOGASHI, M.; TAMURA, K.; NITTA, T.; ISHIZAKI, M.; SUGISAKI, Y.; FUKUDA, Y. Role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor of metalloproteinases in myxomatous change of cardiac floppy valves. **Pathology International**, Victoria, v.57, p.251-259, 2007.
23. VU, T. H.; SHIPLEY, J. M.; BERGES, G.; HELMS, J. A.; HANAHAN, D.; SHAPIRO, S. D.; WERB, Z. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. **Cell**, Cambridge, v.93, p.411-422, 1998.

CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na realização desta pesquisa observou-se, durante a revisão bibliográfica, que as primeiras publicações sobre a DMVM no cão foram direcionadas para caracterizar suas alterações macroscópicas e microscópicas, bem como sua incidência e prevalência nas diversas raças. Nesses estudos ficou evidente a grande semelhança desta enfermidade valvular nas espécies humana, canina e suína.

Em período subsequente, as pesquisas sobre a DMVM enfocaram mais o diagnóstico, com exames ultrassonográficos, o tratamento da doença, com fármacos e protocolos mais eficientes, ficando em segundo plano o estudo das alterações histológicas.

Somente na última década é que se voltou a avaliar os aspectos histológicos da doença degenerativa valvular, visando elucidar a atuação das células do folheto valvular, que são responsáveis pela produção de MEC, e a participação de substâncias que atuam no seu remodelamento, como o óxido nítrico, a endotelina, as metaloproteinases, entre outras.

No início dessa nova onda de pesquisas, tanto os cães como os suínos foram utilizados de forma equilibrada como modelos experimentais para o estudo da DMVM. Com o tempo, foi possível observar uma preferência na utilização das válvulas suínas, provavelmente pela maior facilidade na obtenção do material em frigoríficos, e por serem maiores que as dos cães, permitindo a submissão da válvula a situações de estresse e avaliação da liberação de substâncias que atuam no remodelamento da MEC.

Mais recentemente o cão passou a ser novamente utilizado, justificado pela necessidade de obter alterações macroscópicas evidentes de DMVM, que é observada com maior frequência nesta espécie. Nos suínos, apesar da grande disponibilidade de válvulas, a incidência é muito baixa, como constatado na literatura e nos resultados deste trabalho.

Os resultados deste estudo indicam que o NO e as MMPs estão envolvidos no remodelamento de válvulas normais e com DMVM na espécie canina. Nos suínos observou-se, pela primeira vez, a expressão das MMPs,

entretanto a avaliação do NO não foi possível, provavelmente devido à pequena presença na válvula do suíno ou a diferenças entre as espécies.

Desta forma, deve-se reavaliar a utilização de válvulas de suíno como modelo para a DMVM, já que a incidência desta lesão valvular pouco freqüente na espécie suína. Apesar disso, parece haver participação de substâncias que atuam no remodelamento da MEC, como demonstrado neste trabalho em relação às MMPs. Já o cão mostrou-se um modelo importante no estudo da DMVM. As alterações macroscópicas e histológicas, nesta espécie, são semelhantes à do homem, assim como a participação das substâncias que atuam no remodelamento da MEC. Apesar dos resultados divergentes da marcação das MMPs, torna-se necessária a realização de mais estudos para que a sua participação no processo da DMVM seja esclarecido, uma vez que a utilização dessa substância em experimentos é muito recente.