

## Efeitos dos Corticosteroides nas Lesões por Radiofrequência na Coxa de Ratos em Diferentes Faixas Etárias

*Effects of the Corticosteroids in the Lesions by Radiofrequency on Rats' Thigh in Different Age Groups*

Mieko Okada, Sérgio de Araújo, Marcello Franco, Angelo de Paola, Guilherme Fenelon

Disciplina de Cardiologia e Departamento de Patologia - Escola Paulista de Medicina - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP - Brasil

### Resumo

**Fundamento:** Os corticosteroides limitam o crescimento tardio das lesões por radiofrequência (RF) no músculo da coxa de ratos filhotes, mas seus efeitos em ratos púberes e adultos são desconhecidos.

**Objetivo:** Avaliar os efeitos dos corticosteroides na cicatrização das lesões por RF no músculo da coxa de ratos em diferentes faixas etárias.

**Métodos:** Realizou-se ablação no músculo da coxa de 30 ratos (1 lesão por animal): infantis (30 dias de idade, peso 73 g, n = 10), púberes (60 dias de idade, peso 230 g, n = 10) e 10 adultos (90 dias de idade, 310 g, n = 10), subdivididos em controles e tratados, que receberam Hidrocortisona (10 mg/kg IM pós-RF) e Betametasona (3,5 mg/kg IM, duas vezes por semana, por 29 dias). Os ratos foram sacrificados 60 dias após a ablação para análise histopatológica e planimétrica com *software* específico (ImageJ®).

**Resultados:** Nos infantis, púberes e adultos o ganho de peso no seguimento não diferiu entre controles e tratados. Nos controles, as lesões dos infantis e púberes eram maiores ( $p = 0,01$ ) que as dos adultos. O tratamento reduziu o tamanho da lesão nos infantis ( $5,58 \pm 0,61 \text{ mm}^2$  vs  $4,02 \pm 0,23 \text{ mm}^2$ ;  $p < 0,01$ ) e nos púberes ( $5,20 \pm 0,47 \text{ mm}^2$  vs  $4,16 \pm 0,48 \text{ mm}^2$ ;  $p < 0,01$ ), mas não nos adultos ( $4,44 \pm 0,50 \text{ mm}^2$  vs  $4,79 \pm 0,53 \text{ mm}^2$ ,  $p = \text{NS}$ ). Tratados Infantil e Púbere apresentaram menor deposição de colágeno e menos traves fibróticas invadindo o tecido saudável a partir da área de fibrose central, e compondo lesão de dimensões notadamente mais reduzidas que seus controles. Não houve diferenças nos grupos adultos.

**Conclusão:** Os corticosteroides parecem reduzir o crescimento tardio da lesão, além de atenuar a proliferação fibrótica nos ratos infantis e púberes. (Arq Bras Cardiol 2010; 95(2) : 207-214)

**Palavras-chave:** Corticosteroides, ratos, miocárdio/lesões.

### Abstract

**Background:** The corticosteroids limit the late growth of the lesions by radiofrequency (RF) on the rats' infants' thighs, but the effects on the pubescent and adult rats are unknown.

**Objective:** Evaluate the effects of the corticosteroids in the healing of the lesions by RF on the rats' thighs muscles in different age groups.

**Methods:** Ablation was performed on the thigh muscle of 30 rats (1 lesion per animal): infants (30 days old, weight 73 g, n = 10), pubescents (60 days old, weight 230 g, n = 10) and 10 adults (90 days old, 310 g, n = 10), subdivided in control and treated groups, that received Hydrocortisone (10 mg/kg IM post-RF) and Betametasone (3.5 mg/kg IM, twice a week, for 29 days). The rats were sacrificed 60 days after the ablation for hystopathological and planimetric analysis with specified software (ImageJ®).

**Results:** In the infant, pubescent and adult groups, the weight gain in the follow up did not differ between the control and the treated ones. In the control group, the lesions of the infants and pubescents were superior ( $p = 0.01$ ) to the adults'. The treatment reduced the size of the lesion in the infants ( $5.58 \pm 0.61 \text{ mm}^2$  vs  $4.02 \pm 0.23 \text{ mm}^2$ ;  $p < 0.01$ ) and pubescents ( $5.20 \pm 0.47 \text{ mm}^2$  vs  $4.16 \pm 0.48 \text{ mm}^2$ ;  $p < 0.01$ ), but not in the adults ( $4.44 \pm 0.50 \text{ mm}^2$  vs  $4.79 \pm 0.53 \text{ mm}^2$ ,  $p = \text{NS}$ ). Infant and pubescent treated groups presented lower collagen deposition and less fibrotic bands invading the healthy tissue from the central fibrosis area, and forming lesions with remarkably more reduced dimensions than their controls. There were no differences in the adult groups.

**Conclusion:** The corticosteroids seem to reduce the late growth of lesion, in addition to attenuate the fibrotic proliferation in the infant and pubescent rats. (Arq Bras Cardiol 2010; 95(2) : 207-214)

**Key words:** Corticosteroids; rats; myocardium/injuries.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Guilherme Fenelon •

Rua Pedro de Toledo, 781 - 10º andar - Fundos - 04039-032 - São Paulo, SP - Brasil

E-mail: guifenelon@cardiol.br, guilhermefenelon@uol.com.br

Artigo recebido em 15/11/09; revisado recebido em 13/01/10; aceito em 22/02/10.

## Introdução

Atualmente a ablação por cateter com energia de radiofrequência (RF) é o procedimento de eleição para o tratamento de pacientes portadores de taquiarritmias, inclusive pediátricos<sup>1</sup>, devido a sua eficácia e segurança. Entretanto, os efeitos da ablação por RF não se restringem apenas ao momento da aplicação da energia. Efeitos tardios podem se manifestar até seis meses pós-procedimento, como, por exemplo, o bloqueio atrioventricular tardio após ablação de taquicardia por reentrada nodal atrioventricular<sup>2</sup>. Os mecanismos desses efeitos tardios ainda permanecem obscuros, mas parecem estar relacionados ao crescimento da lesão durante a sua cicatrização, provavelmente por progressão do processo inflamatório e/ou injúria à microcirculação ou dano ultraestrutural ao tecido circunjacente.

Saul e cols.<sup>3</sup> demonstraram que lesões por RF no miocárdio ovino imaturo apresentam acentuado crescimento tardio e invasão do tecido miocárdico normal por tecido fibroelástico, achados esses que apontam para possíveis efeitos pró-arrítmicos em populações pediátricas submetidas à ablação por RF, eventualmente levando à morte súbita. Como o processo inflamatório parece participar da extensão tardia da lesão, temos como hipótese que os corticoesteroides poderiam atenuar esse processo<sup>4</sup>. Nesse aspecto, demonstramos em publicação prévia que os corticoesteroides limitam o crescimento tardio das lesões por RF no músculo da coxa de ratos filhotes<sup>5</sup>. Porém, essa investigação apresentava algumas limitações relevantes: os efeitos do tratamento nas dimensões da lesão foram aferidos apenas qualitativamente, sem qualquer quantificação; como os animais foram sacrificados no último dia do tratamento (30 dias pós-ablação), o resultado final da cicatrização não foi estabelecido; por fim, não foi determinada a faixa etária na qual o crescimento tardio deixa de ocorrer, uma vez que a faixa etária intermediária (púberes) não foi investigada. O esclarecimento dessas questões motivou a realização do presente trabalho.

Portanto, avaliamos aspectos qualitativos e quantitativos da cicatrização consolidada das lesões por RF sob efeito dos corticoesteroides no músculo da coxa de ratos em diferentes faixas etárias (infantis, púberes e adultos).

## Métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo.

### Delineamento experimental

#### A amostra

Foram utilizados 30 ratos (*Rattus norvegicus*) EPM-1 Wistar, machos, divididos em seis grupos após a ablação com RF, a saber:

- 1) 05 (cinco) ratos infantis com  $30 \pm 03$  dias de idade - Controles (1m-C).
- 2) 05 (cinco) ratos infantis com  $30 \pm 03$  dias de idade - Tratados (1m-T).
- 3) 05 (cinco) ratos púberes com  $60 \pm 03$  dias de idade - Controles (2m-C).

4) 05 (cinco) ratos púberes com  $60 \pm 03$  dias de idade - Tratados (2m-T).

5) 05 (cinco) ratos adultos com  $90 \pm 03$  dias de idade - Controles (3m-C).

6) 05 (cinco) ratos adultos com  $90 \pm 03$  dias de idade - Tratados (3m-T).

As faixas etárias dos ratos infantis, púberes e adultos corresponderiam aproximadamente em humanos, respectivamente, a lactentes e crianças pequenas, ao início da puberdade, e a adolescentes e adultos jovens.

### Protocolo da ablação

Na indução anestésica foram utilizados: Acepromazina a 0,2% (0,1 mg/kg IM), e associação dos Cloridratos de Tiletamina e Zolazepam (30 mg/kg IM); com manutenção do plano anestésico cirúrgico através da inalação do Isoflurano, sob ventilação espontânea.

Foram realizadas tricotomia e antisepsia do membro posterior direito do rato; procedeu-se à incisão sobre a região do músculo da coxa de aproximadamente 1,0 cm. Pele e fáscia foram dissecadas e afastadas, expondo a região dos músculos mediais do membro pélvico (Semitendinoso e Gastrocnêmio)<sup>5</sup>.

Um cateter de ablação convencional (Marinr, Medtronic®, 7Fr - ponta de 4mm), conectado ao gerador de RF (Atakr™, Medtronic® CardioRhythm) com potência máxima de 50 Watts, foi paralelamente posicionado, sob pressão manual constante, sobre o tecido muscular exposto<sup>5</sup>. Aplicações unipolares de RF (uma por animal) foram realizadas, sob controle de temperatura (70°C, 60 segundos), entre o eletrodo distal do cateter de ablação e placa-eletrodo indiferente sub-posicionada na face medial do membro pélvico. Durante cada aplicação, potência, impedância, temperatura da ponta do cateter e tempo foram monitorados e suas médias anotadas para posterior análise. Posteriormente à ablação, a ferida foi suturada.

Os procedimentos foram realizados pelo mesmo operador, sob condições estéreis, para prevenir infecções. Antibióticos profiláticos não foram utilizados. Em todo o protocolo, a coxa esquerda (a ablação foi feita na coxa direita) foi utilizada para a inoculação dos anestésicos e corticoesteroides.

### Protocolo pós-ablação

Metade da população recebeu corticoesteroides consoante a sua respectiva faixa de peso, enquanto a outra metade nada recebeu, servindo de grupo controle. Antes desse procedimento, o peso inicial de cada rato foi anotado para ajuste da dosagem dos corticoesteroides: Hidrocortisona (10 mg/kg IM) inoculada imediatamente após a ablação e, posteriormente, Betametasona (3,5 mg/kg IM) duas vezes por semana - 2ª e 5ª feiras - durante 29 dias pós-procedimento. Para ajuste das dosagens, os ratos foram pesados semana a semana, imediatamente antes de cada inoculação.

Os animais permaneceram albergados no laboratório, sob supervisão médico-veterinária, sendo sacrificados  $60 \pm 05$  dias pós-ablação, ou seja, 30 dias após o término da terapia, de forma a avaliar o aspecto consolidado da cicatrização da lesão.

## Artigo Original

### Análise macroscópica

Ao final do seguimento, os ratos foram repesados para avaliação do ganho ponderal (Tabela 1) e submetidos à eutanásia inalatória pelo isoflurano para extração do bloco

muscular da coxa. A peça foi examinada a olho nu quanto ao seu aspecto macroscópico e suas impressões qualitativas registradas para posterior comparação.

A exemplo do nosso estudo anterior<sup>5</sup>, não foi realizada a

**Tabela 1 - Dados biométricos dos ratos, parâmetros biofísicos das aplicações e dimensão das lesões por radiofrequência nos grupos infantis, púberes e adultos**

Rato nº	Grupo	Peso inicial (g)	Peso ao sacrifício (g)	Ganho ponderal (%)	Lesão área (mm <sup>2</sup> )	Impedância (Ohms)	Potência (Watt)	Temperatura (°C)	Tempo (seg)
1	IC	75	375	400	5,30	136	2	70	60
2	IC	75	350	366	5,27	115	1	70	60
3	IC	75	452	466	4,89	83	1	71	60
4	IC	65	350	438	6,18	123	1	70	60
5	IC	75	350	366	6,26	134	2	70	60
TOTAL		73±4	†370±32	407±44	*5,58±0,61	118±21	1,4±0,5	70,2±0,4	60,0±0,0
6	IT	70	275	292	3,97	134	2	69	60
7	IT	70	260	271	4,23	182	2	69	60
8	IT	75	350	366	3,76	136	2	70	60
9	IT	75	300	300	3,86	111	2	70	60
10	IT	75	360	380	4,28	100	2	70	60
TOTAL		73±3	†309±44	322±48	4,02±0,23	132±31	2,0±0,0	69,6±0,5	60,0±0,0
11	PC	225	350	55	5,23	154	2	70	60
12	PC	230	350	52	4,87	150	2	69	60
13	PC	230	350	52	5,97	127	2	70	60
14	PC	240	400	66	4,78	147	2	69	60
15	PC	240	400	66	5,16	119	2	70	60
TOTAL		233±7	†370±27	58±7	§ 5,20±0,47	139±15	2,0±0,0	69,6±0,5	60,0±0,0
16	PT	250	470	88	3,73	127	2	69	60
17	PT	240	400	66	3,92	96	2	70	60
18	PT	245	450	83	4,79	145	2	70	60
19	PT	240	400	66	4,57	105	2	70	60
20	PT	245	450	83	3,81	98	2	70	60
TOTAL		244±4	†434±32	77±10	4,16±0,48	114±21	2,0±0,0	69,8±0,4	60,0±0,0
21	AC	325	475	46	5,01	136	2	70	60
22	AC	320	450	40	3,95	115	1	70	60
23	AC	320	450	40	3,89	83	1	71	60
24	AC	325	475	46	4,58	123	1	70	60
25	AC	330	500	51	4,78	134	2	70	60
TOTAL		324±4	†470±20	45±4	‡4,44±0,50	118±21	1,4±0,5	70,2±0,4	60,0±0,0
26	AT	300	475	58	4,77	99	2	69	60
27	AT	290	425	46	4,15	145	2	69	60
28	AT	290	400	37	5,53	144	2	69	60
29	AT	300	500	66	5,04	152	3	69	60
30	AT	295	450	52	4,48	149	2	70	60
TOTAL		295±5	†450±39	52±10	4,79±0,53	137±21	2,2±0,5	69,2±0,4	60,0±0,0

IC - infantil controle; IT - infantil tratado; PC - púbere controle; PT - púbere tratado; AC - adulto controle; AT - adulto tratado. (\*)  $p < 0,001$  em relação a IT; (†)  $p < 0,001$  em relação ao peso inicial; (‡)  $p = 0,01$  em relação a IC e PC. (§)  $p < 0,01$  em relação a PT.

aferição das dimensões macroscópicas das lesões crônicas, sejam dos ratos infantis, dos púberes ou dos adultos. A principal razão para isso é que tais lesões são mal delimitadas, principalmente nos dois primeiros grupos, tornando muito imprecisa a sua medição.

### Análise histológica

As peças retiradas foram conservadas individualmente em formol a 10%. A lesão foi fatiada em diversos cortes histológicos de modo que a abrangesse completamente. As lâminas (três lâminas/peça) foram coradas por H.E. e tricrômico de Masson. Durante a análise qualitativa, as lesões eram delimitadas na própria lâmina (Figura 1) pelo médico patologista, cego aos grupos do estudo, para a realização da análise quantitativa.

### Análise qualitativa

Além dos aspectos histopatológicos de cada lesão dedicou-se especial atenção à leitura da proliferação fibrótica e dos infiltrados celulares inflamatórios. Como previamente demonstrado em ovinos<sup>3</sup> e no músculo da coxa de ratos<sup>5</sup>, as lesões agudas por RF em adultos e filhotes são semelhantes. Contudo, enquanto nos adultos as dimensões das lesões crônicas se mantêm comparáveis às das lesões agudas, nos filhotes elas aumentam acentuadamente. Portanto, no presente estudo, por definição<sup>5</sup>, o crescimento tardio da lesão foi caracterizado pelo aumento na dimensão das lesões por RF em relação aos adultos, enquanto que a sua extensão tardia foi definida como a ocorrência de múltiplas extensões de tecido fibroelástico que, a partir da área fibrótica central, invadem o tecido muscular saudável circunjacente às lesões crônicas por RF.

### Análise quantitativa

Para a avaliação planimétrica das lesões, utilizou-se o software ImageJ<sup>®6,7</sup> - amplamente difundido em citometria<sup>8</sup> e outros estudos planimétricos<sup>9-12</sup> - que calcula automaticamente a área da lesão (Figura 1) com boa precisão e conversor de

medidas para qualquer unidade desejada pelo operador. A aferição se faz manualmente através do mouse do computador que, contornando os bordos da lesão gera automaticamente o resultado da mensuração.

Em cada animal, a lâmina que apresentasse a maior área de lesão (largura e comprimento em mm<sup>2</sup>) era utilizada como estimativa do tamanho da lesão. Em função da complexa geometria das lesões, muito irregulares e espalhadas, principalmente nos infantis, apesar do número relativamente grande de cortes histológicos realizados, não foi possível quantificar o volume das lesões.

### Análise estatística

As variáveis são expressas como média ± desvio-padrão. Utilizou-se análise da variância (ANOVA) para a comparação entre os grupos da amostra. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes.

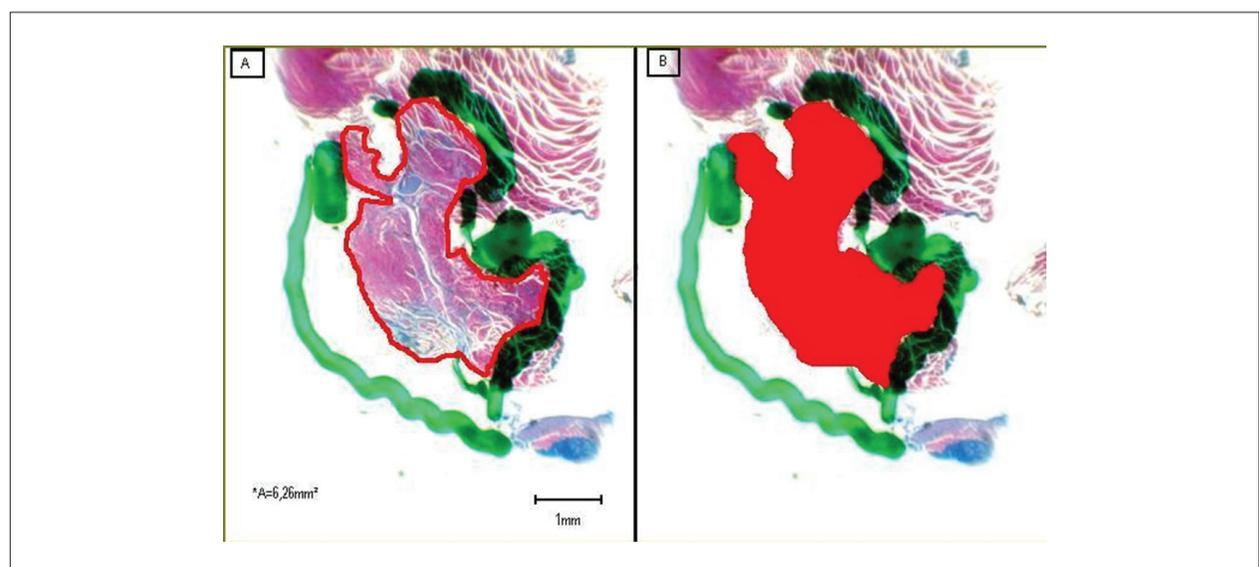
## Resultados

### Parâmetros biofísicos das aplicações de RF

Uma lesão por RF foi criada na coxa de cada animal. Como exemplificado na Tabela 1, não houve diferenças entre os grupos em relação aos parâmetros avaliados.

### Desenvolvimento e evolução pós-ablação dos animais

Durante o seguimento, nenhum animal apresentou intercorrências, tampouco infecções locais ou sistêmicas. Do procedimento à eutanásia, todos os grupos apresentaram ganho ponderal significativo (Tabela 1), não havendo diferenças significantes entre os controles e tratados. Como esperado, o ganho ponderal médio dos infantis (controles 407%, tratados 322%) foi superior ao dos púberes (controles 58%, tratados 77%) e dos adultos (controles 45%, tratados 52%).



**Fig. 1** - Forma de mensuração da área de lesão com o programa ImageJ. Lâmina do rato número cinco do grupo Infantil Controle, corada pelo Tricrômico de Masson em aumento de 10X. (A) A linha grossa externa circunscrevendo a lesão foi marcada à caneta pelo patologista, enquanto a linha fina, interna, foi demarcada pelo mouse do operador do ImageJ. (B) A área delimitada pela linha fina (hachurada) foi calculada pelo programa como estimativa do tamanho da lesão.

## Artigo Original

### Análise macroscópica das lesões

Nos infantis e púberes, as lesões eram extensas (aproximadamente 2 cm de largura), de coloração pálida e bordos irregulares, dificultando a visualização de seus limites e inviabilizando a aferição macroscópica das suas dimensões. Nos adultos, por sua vez, as lesões eram mais bem delimitadas, com bordos regulares e caracterizadas por áreas arredondadas de coloração pálida com cerca de 1 cm de largura. Em todos os grupos, as lesões eram rasas, com profundidade em torno de 2 mm.

### Análise qualitativa das lesões

Os achados qualitativos foram muito consistentes em todos os grupos, como se observa na Figura 2. As maiores lesões foram verificadas nos infantis controles (Figura 3), apresentando grandes áreas de fibrose mal delimitadas com acentuada extensão tardia, ou seja, invasão do tecido muscular adjacente por múltiplas traves de tecido miofibroblástico, por vezes envolvendo fibras musculares sãs. Os púberes controles mostraram lesões com áreas de fibrose pouco menores que a dos infantis, mas melhor delimitadas. Nesse grupo, também foi observada extensão tardia, porém as traves fibrosas tinham menor número e extensão quando comparadas aos infantis. Nos adultos controles, as lesões eram menores que as dos outros grupos, bem delimitadas e sem extensão tardia. As cicatrizes eram bem organizadas, com substituição dos miócitos por tecido fibroso.

Já nos infantis e púberes tratados, as lesões apresentaram

dimensões notadamente reduzidas em relação aos controles. As cicatrizes eram imaturas, com retardo na cicatrização, caracterizada por menor deposição colágena e presença de tecido de granulação. Além disso, havia menos traves fibróticas invadindo o tecido saudável a partir da área de fibrose central. Nos adultos tratados, não se notaram diferenças apreciáveis em relação aos controles.

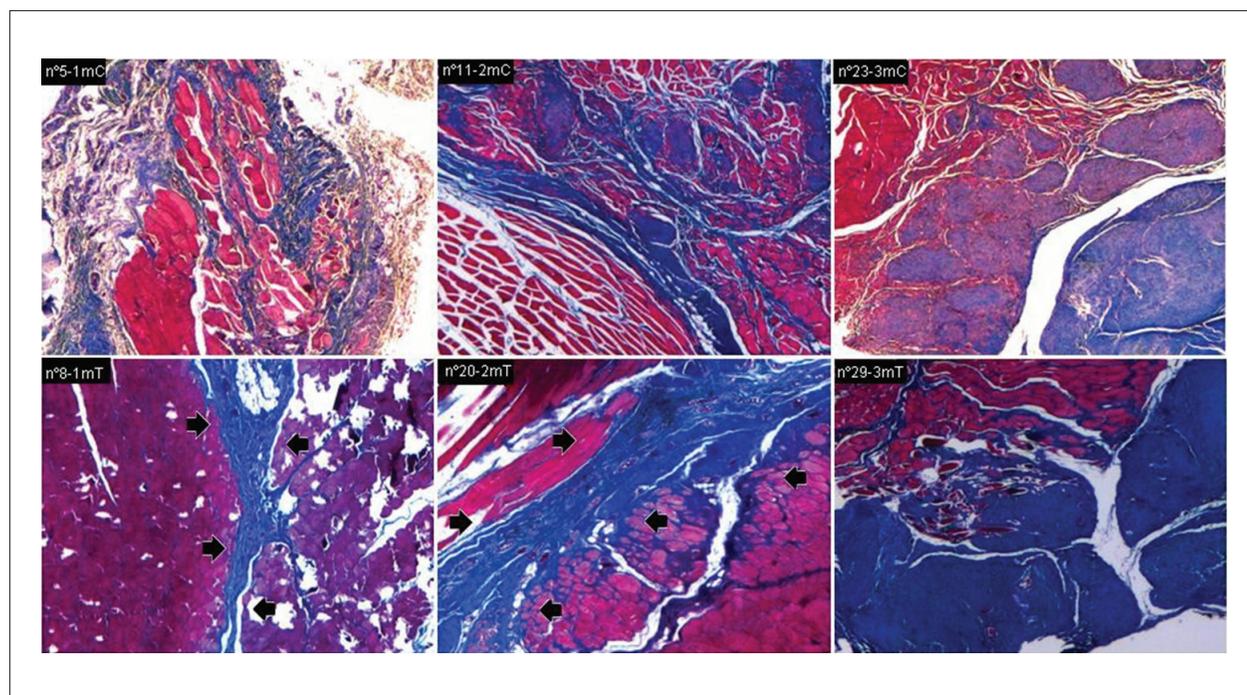
### Análise quantitativa das lesões

Como ilustrado na Tabela 1 e Figura 4, nos controles, as lesões dos infantis ( $5,58 \pm 0,61 \text{ mm}^2$ ) e púberes ( $5,20 \pm 0,47 \text{ mm}^2$ ) apresentaram crescimento tardio, sendo significativamente ( $p = 0,01$ ) maiores que as dos adultos ( $4,44 \pm 0,50 \text{ mm}^2$ ). As lesões dos infantis eram maiores que as dos púberes, mas essa diferença não atingiu significância estatística ( $p > 0,10$ ). Digno de nota: o tratamento reduziu a área da lesão nos infantis ( $5,58 \pm 0,61 \text{ mm}^2$  vs  $4,02 \pm 0,23 \text{ mm}^2$ ;  $p < 0,001$ ) e nos púberes ( $5,20 \pm 0,47 \text{ mm}^2$  vs  $4,16 \pm 0,48 \text{ mm}^2$ ;  $p < 0,01$ ), mas não nos adultos ( $4,44 \pm 0,50 \text{ mm}^2$  vs  $4,79 \pm 0,53 \text{ mm}^2$ ,  $p = \text{NS}$ ). A magnitude da redução da área de lesão foi semelhante nos infantis (28%) e púberes (20%).

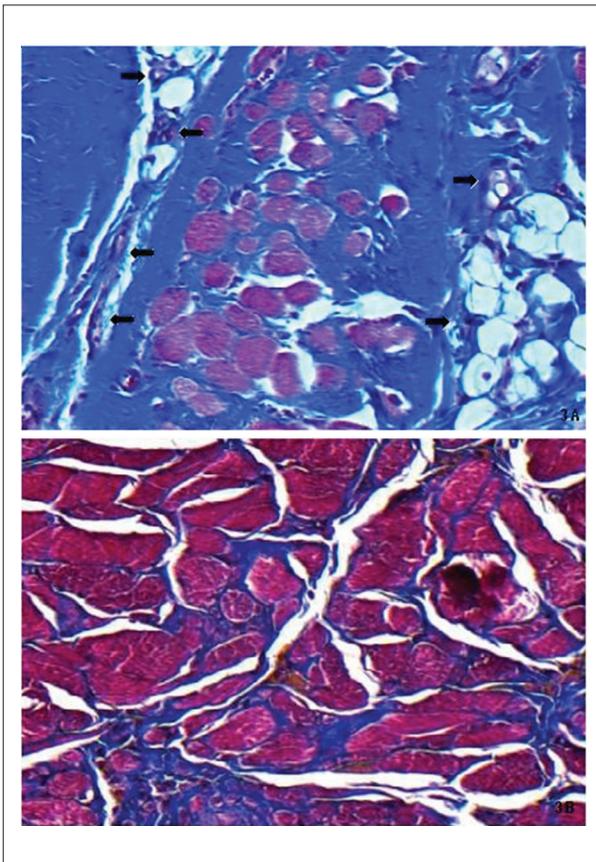
## Discussão

### Achados principais

Neste modelo de ablação por RF no músculo da coxa de ratos, pudemos demonstrar, qualitativamente e quantitativamente, que: 1) as lesões nos infantis e púberes apresentam crescimento e extensão tardios, de forma mais



**Fig. 2 -** Comparação qualitativa entre as lesões crônicas nas diferentes faixas etárias (os animais estão identificados na lâmina). Lâminas coradas pelo Tricrômico de Masson em aumento de 40X. Nos grupos 1mC (Infantil Controle) e 2mC (Púbere Controle), as lesões são grandes, irregulares, mal delimitadas e com acentuada extensão tardia, ou seja, largas bandas fibroblásticas invadem e espraiam-se na musculatura sã aumentando a dimensão da lesão, fenômeno mais acentuado no grupo Infantil. Note-se que apenas segmentos das lesões são exibidos, pois as dimensões das mesmas ultrapassam em muito os limites do campo visual da lâmina. Nos grupos 1mT (Infantil Tratado) e 2mT (Púbere Tratado), as lesões apresentam dimensões notadamente reduzidas (setas), com deposição colágena mais concentrada e menor extensão tardia. Nos grupos 3mC (Adulto Controle) e 3mT (Adulto Tratado), as lesões mostram-se bem delimitadas e sem extensão tardia, não havendo diferença observável entre eles. Note-se também que, neste caso, praticamente toda a lesão está contida no campo visual da lâmina.



**Fig. 3** - Aspecto qualitativo dos grupos *Infantis Controle (1mC)* e *Tratado (1mT)* ilustrando os efeitos do tratamento nas lesões. Nos controles (*painel A*), há vários núcleos arredondados de fibroblastos (*setas*) indicando intensa proliferação; largas bandas de colágeno predominam no campo visual e invadem o interstício, deixando apenas poucas fibras musculares sãs. Já nos tratados (*painel B*), a lesão é menos invasiva, pois não se observa atividade proliferativa e as traves fibróticas que adentram o tecido muscular normal são finas. Coloração pelo Tricrômico de Masson, 100X.

acentuada nos infantis, o que não ocorreu com os adultos; 2) os corticoesteroides parecem atenuar tais fenômenos nessas faixas etárias. Esses achados corroboram e estendem nossas observações prévias neste modelo experimental, quando demonstramos que os corticoesteroides reduzem o crescimento tardio da lesão em filhotes<sup>5</sup>.

No presente estudo, observamos o efeito final dos corticoesteroides, pois a eutanásia foi realizada 30 dias após o término do tratamento, totalizando seguimento de 60 dias pós-ablação. Desse modo, estudamos as lesões já consolidadas. Em nosso estudo inicial, o sacrifício deu-se imediatamente ao final do tratamento (30 dias pós-ablação). Portanto, não se sabia se os efeitos dos corticoesteroides se mantinham a longo prazo, o que agora podemos confirmar.

Além disso, em nosso trabalho pioneiro<sup>5</sup>, os efeitos do tratamento nas dimensões das lesões não puderam ser quantificados, baseando-se exclusivamente em critérios histológicos qualitativos. No presente trabalho, por outro lado, pela primeira vez na literatura, as lesões foram mensuradas através de *software* específico<sup>6-12</sup>, confirmando que os corticoesteroides reduzem a área de lesão nos filhotes

e púberes. Esses resultados não podem ser atribuídos a variações individuais ou a discrepâncias no procedimento de ablação. Os parâmetros biofísicos das aplicações de RF e o ganho de peso dos animais durante o seguimento não diferiram entre controles e tratados. Ademais, os achados histológicos qualitativos e quantitativos foram muito consistentes em todos os grupos, indicando que a casuística era adequada.

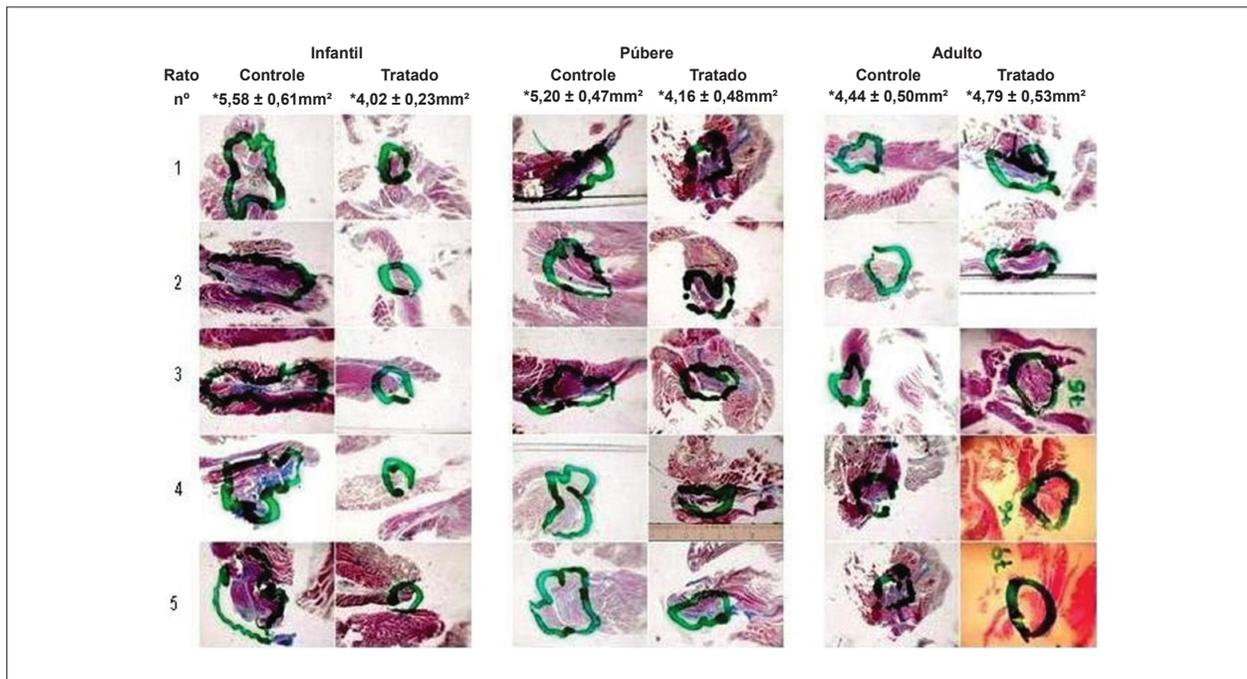
É importante ressaltar que não foi possível aferir o volume das lesões, pois sua geometria é muito irregular (principalmente em sua periferia), e por isso optamos pela aferição da área central da lesão em mm<sup>2</sup>. Para tal, dentre os vários cortes histológicos de uma mesma peça, selecionamos o que apresentava maiores dimensões de largura e comprimento como representante da lesão. Embora não possibilite determinar volume total da lesão, o método utilizado se mostrou adequado e reprodutível para estimativa do tamanho da lesão e comparação entre os grupos - nosso maior objetivo. Reforçando a adequação da nossa metodologia, observou-se redução na área de lesão secundária ao tratamento nos infantis (28%) e nos púberes (20%), mas não nos adultos, nos quais já se demonstrou que os corticoesteroides não reduzem o tamanho das lesões por RF<sup>4</sup>. Por fim, os achados quantitativos foram corroborados pela análise qualitativa realizada pelo patologista.

Outra contribuição inédita do presente estudo foi demonstrar que as lesões por RF nos púberes ainda apresentam crescimento e extensão tardios, embora menos acentuados que nos infantis. Já havíamos relatado que a evolução dessas lesões nos ratos infantis (correspondentes a lactentes e crianças pequenas) e adultos (correspondentes a adolescentes e adultos jovens) era semelhante à observada no miocárdio ovino<sup>3</sup> e canino<sup>4</sup>. Enquanto nos adultos, histologicamente, a lesão crônica se caracteriza por cicatriz bem definida, com bordos delimitados, nos infantis ocorre acentuado crescimento da lesão, com cicatrizes mal delimitadas e extensas, evidenciando invasão do músculo adjacente por múltiplas traves de tecido fibroblástico. As lesões nos púberes (correspondentes ao início da puberdade) apresentam características intermediárias entre os infantis e os adultos. Embora as lesões revelem aumento das suas dimensões em relação aos adultos (crescimento tardio), a cicatriz se apresenta mais bem delimitada que nos infantis e com menor invasão do tecido adjacente por traves fibrosas (extensão tardia).

O aumento de tamanho das lesões por RF em tecidos musculares imaturos tem sido atribuído a dois fatores: distensão passiva secundária ao crescimento do músculo, como ocorre nas cicatrizes de atriectomia criadas em cães filhotes<sup>13</sup>, e proliferação celular dos elementos constituintes da lesão, responsável pelas traves fibrosas invadindo o tecido circunjacente. Isso porque, nessa fase, em contraste com o músculo adulto, as células musculares e intersticiais se dividem ativamente<sup>14,15</sup>. Nossos achados sugerem que, nos púberes, o crescimento passivo predomina em relação à proliferação celular, enquanto nos infantis os dois componentes imperam.

Durante o seguimento, o ganho ponderal dos filhotes foi de 350% e o dos púberes 70%, valores esperados para essas faixas etárias. A análise histológica qualitativa foi consistente

## Artigo Original



**Fig. 4** - Lâminas utilizadas para mensuração das lesões crônicas nos diversos grupos; coloração Tricrômico de Masson, 10X, régua em mm. A linha grossa circunscrevendo a lesão foi marcada à caneta pelo patologista. Posteriormente, como ilustrado na Figura 1, a área da lesão em mm<sup>2</sup> era calculada pelo programa Image J e usada como estimativa do tamanho da lesão. Note-se que as áreas de lesão são consistentes em cada grupo. Nos infantis tratados e púberes elas são visivelmente menores que a de seus pares tratados, enquanto nos adultos não há alterações apreciáveis. Observe-se também que nos controles, as lesões dos infantis e púberes são maiores que as dos adultos, caracterizando crescimento tardio. \* - área média ± desvio padrão de cada grupo.

ao observar que as lesões dos infantis eram maiores que as dos púberes. Entretanto, embora a área de lesão dos infantis (5,58+0,61 mm<sup>2</sup>) tenha sido maior que a dos púberes (5,20+0,47mm<sup>2</sup>), essa diferença não atingiu significância estatística ( $p > 0,10$ ). Isso pode estar relacionado ao tamanho da amostra ou à metodologia de medição empregada, que, por aferir apenas a área central da lesão, tende a subestimar lesões extensas e de geometria irregular, como são características dos ratos infantis.

Nosso estudo não é capaz de identificar as vias pelas quais os corticoesteroides reduzem o crescimento tardio das lesões por RF na coxa de ratos infantis e púberes. Essas ações podem estar correlacionadas aos complexos efeitos dessas drogas no processo cicatricial<sup>16-18</sup>, como diminuição progressiva do número dos fibroblastos inibindo, dessa forma, a síntese de colágeno com consequente retardo da cicatrização. É também possível que, além da inibição de leucócitos e fibroblastos, os corticoesteroides exerçam essas ações através da redução de citocinas e fatores de crescimento celular<sup>17</sup>.

### Implicações clínicas

Nossos achados sugerem que os corticoesteroides reduzem o crescimento tardio da lesão por RF não só nos ratos infantis como nos púberes. Se confirmados por estudos posteriores, nossos resultados indicam a possibilidade de limitar a extensão tardia das lesões por RF através de intervenções farmacológicas, o que poderia ser clinicamente útil especialmente na ablação de lactentes e crianças pequenas,

faixa etária na qual o crescimento da lesão tem sido associado a efeitos pró-arrítmicos<sup>19</sup>. O fato de as lesões nos púberes serem menores, mais homogêneas e com menor intensidade de traves fibrosas em comparação aos infantis, sugere uma menor propensão à formação de substrato arritmogênico nessa faixa etária. Entretanto, novas investigações são necessárias a fim de determinar o significado funcional dessas lesões.

### Limitações

O estudo foi realizado no músculo esquelético normal de roedores. Portanto, os resultados não se prestam à inferência direta ao coração humano ou a pacientes pediátricos com arritmias<sup>5</sup>. A formulação e a dosagem dos corticoesteroides foram arbitrárias, não sendo determinada a dose mais eficaz<sup>20,21</sup>. As lesões agudas não foram estudadas. Entretanto, nosso estudo prévio<sup>5</sup> já havia demonstrado que as lesões agudas em filhotes e adultos são semelhantes. As faixas etárias dos roedores podem não corresponder com exatidão às dos humanos.

### Conclusões

Neste modelo, as lesões por RF na coxa de ratos infantis e púberes, apresentam crescimento e extensão tardios, mais acentuadamente nos infantis - o que não ocorre nos adultos. Os corticoesteroides parecem reduzir esses fenômenos nos infantis e púberes. Esses achados podem ter implicações para a ablação por RF em populações pediátricas.

## Agradecimentos

Ao Sr. Wladimir Martins, pela orientação da computação gráfica deste estudo.

### Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

### Fontes de Financiamento

O presente estudo não teve fontes de financiamento externas.

### Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de dissertação de Mestrado de Miekko Okada pela Universidade Federal de São Paulo.

## Referências

1. Tanel RE, Walsh EP, Triedman JK, Epsteins MR, Bergau DM, Saul JP. Five-year experience with radiofrequency catheter ablation: implications for management of arrhythmias in pediatric and young adult patients. *J Pediatr*. 1997; 131 (6): 878-87.
2. Fenelon G, Brugada P. Delayed effects of radiofrequency energy: Mechanisms and clinical implications. *Pacing Clin Electrophysiol*. 1996; 19 (4 Pt 1): 484-9.
3. Saul J, Hulse J, Walsh E. Late enlargement of radiofrequency lesions in infant lambs: implications for ablation procedures in small children. *Circulation*. 1994; 90 (1): 492-9.
4. Fenelon G, Franco M, Mora O, Katchburian E, de Paola AA. Combined therapy with steroids and antioxidants prevents ultrastructural damage surrounding chronic radiofrequency lesions. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2004; 27 (1): 65-72.
5. Fenelon G, Fernandes R, Franco M, de Paola A. Steroids prevent late extension of radiofrequency lesions in the thigh muscle of infant rats: implications for pediatric ablation. *J Interv Card Electrophysiol*. 2003; 9 (1): 7-13.
6. Wayne R. Research Services Branch. National Institute of Mental Health. Bethesda, Maryland, USA. [Access in 2007 Aug 22]. Available from: <http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/intro.html>
7. Papadopoulos F, Spinelli M, Valente S, Foroni L, Orrico C, Pasquinelli G, et al. Common tasks in microscopic and ultrastructural image analysis using image. *J Ultrastruct Pathol*. 2007; 31 (6): 401-7.
8. Roszik J, Lisboa D, Szöllosi J, Vereb G. Evaluation of intensity-based ratiometric FRET in image cytometry-approaches and a software solution. *Cytometry*. 2009; 75 (9): 586-94.
9. Hinton Jr RB, Alfieri CM, Witt SA, Glascock BJ, Khoury PR, Yutzey KE, et al. Mouse heart valve structure and function: echocardiographic and morphometric analyses from the fetus through the aged adult. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008; 294 (6): 480-8.
10. Porzio S, Masseroli M, Messori A, Forloni G, Olivetti G, Latini R, et al. A simple, automatic method for morphometric analysis of the left ventricle in rats with myocardial infarction. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1995; 33 (4): 221-9.
11. Risebro CA, Searles RG, Melville AAD, Ehler E, Jina N, Riley PR, et al. Prox1 maintains muscle structure and growth in the developing heart. *Development*. 2009; 136 (3): 495-505.
12. Souza HC, Martin-Pinge MC, Neto OB, Teixeira VPA, Blanco JHD, da Silva VJD. Nitric oxide synthesis blockade increases hypertrophy and cardiac fibrosis in rats submitted to aerobic training. *Arq Bras Cardiol*. 2007; 89 (2): 99-104.
13. Denfield SW, Kearney DL, Michael L, de Groot AG, Garson A. Developmental differences in canine cardiac surgical scars. *Am Heart J*. 1993; 126 (2): 382-9.
14. Rakusan K. Cardiac growth, maturation and aging. In: Zak R. (editor). *Growth of the heart in health and disease*. New York: Raven Press; 1984. p. 131-64.
15. Banerjee I, Fuseler JW, Price RL, Borg TK, Baudino TA. Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 293 (3): H1883-H1891.
16. Giovannini UM. Treatment of scars by steroid injections. *Wound Repair Regen*. 2002; 10 (2): 116-7.
17. Young M. Adrenal steroids and cardiac fibrosis. *Steroids*. 1995; 60: 133-6.
18. Mitsuya N, Kishi R, Suzuki N, Tamura M, Imai Y, Koike J, et al. Efficacy of steroid therapy for pacing failure in a patient with chronic myocarditis. *Intern Med*. 2004; 43 (3): 213-7. 19. Birnbaum S E. Mechanisms of atrial reentry tachycardia after surgery for congenital heart disease. *Prog Pediatr Cardiol*. 2002; 14: 205-9.
20. Ried LD. Reducing medication errors, comparative effectiveness, and glucocorticosteroid dosing. *J Am Pharm Assoc*. 2009; 49 (4): 576.
21. Schroeder VA, Pearl JM, Schwartz SM, Shanley TP, Manning PB, Nelson DP. Combined steroid treatment for congenital heart surgery improves oxygen delivery and reduces postbypass inflammatory mediator expression. *Circulation*. 2003; 107 (22): 2823-8.