

Estudo histomorfométrico dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo das ratas albinas durante a prenhez

A.W. LIBERATORI FILHO, R.D. LOPES, O.A. MORA, M.J. SIMÕES, A.C. LOPES

Disciplina de Clínica Médica do Departamento de Medicina; Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, São Paulo, SP.

RESUMO - OBJETIVO. No presente estudo propu-se-nos a avaliar, por meio da microscopia de luz, os aspectos morfológicos e morfométricos dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo de ratas albinas durante a prenhez.

MÉTODOS. Acasalamos doze ratas virgens que foram divididas ao acaso em quatro grupos, de acordo com a idade gestacional. Os animais correspondentes a cada grupo foram sacrificados ao 1º(G-A), 7º(G-B), 14º(G-C) e 21º(G-D) dias de prenhez, sendo coletados fragmentos do terço médio do ventrículo esquerdo, os quais após processamento apropriado, permitiram observação adequada à microscopia de luz. A cariometria foi realizada mensurando-se os diâmetros maiores e menores dos cardiomiócitos com o auxílio de um tambor rotativo modelo K 8 X adaptado a um microscópio de luz.

INTRODUÇÃO

A gravidez fisiológica caracteriza-se por significativas alterações adaptativas do organismo materno, visando a manutenção das demandas metabólicas próprias do estado gravídico, propiciando, assim, condições adequadas para o crescimento e desenvolvimento do conceito¹. Tais ajustes fisiológicos são particularmente expressivos no sistema circulatório, e incluem aumento do volume sanguíneo, da frequência cardíaca, do débito cardíaco, além da redução na resistência vascular sistêmica, culminando com o desenvolvimento de um estado hemodinâmico de alto débito².

A sobrecarga volumétrica e o estado hiperdinâmico observados no período gestacional são de extrema importância na manutenção de uma gestação normal. Entretanto, o aumento fisiológico da volemia poderá representar risco ao binômio materno-fetal se houver cardiopatia de base associada. Por outro lado, a presença de hipervolemia insuficiente é geralmente encontrada e associada à complicações hipertensivas, retardo de crescimento fetal, oligohidramnio e/ou prematuridade³.

Ao analisarmos a literatura, observamos que a grande maioria dos autores concordam com o fato

RESULTADOS. O estudo em nível da microscopia de luz praticamente não mostrou alterações com o decorrer da prenhez. No entanto, a morfometria revelou que os volumes dos cardiomiócitos estão aumentados no 14º dia da prenhez, mostrando-se estatisticamente significante quando comparado aos demais grupos estudados. Assim, nossos resultados demonstraram haver hipertrofia ventricular esquerda durante a gestação.

CONCLUSÃO. Durante a gestação há um processo dinâmico reversível de remodelação ventricular em consequência das alterações adaptativas gravídicas.

UNITERMOS: Coração. Gravidez. Hipertrofia ventricular esquerda. Adaptação fisiológica. Cardiomiócito. Cariometria.

de que a área cardíaca está aumentada durante a gestação; discutem, porém, se tal processo seria devido à hipertrofia do músculo cardíaco ou somente às alterações decorrentes das modificações anatómicas próprias do período⁴⁻⁹.

Entre os métodos diagnósticos não-invasivos em cardiologia durante a gravidez, destaca-se o ecocardiograma por ser capaz de fornecer informações anátomo-funcionais sem efeitos prejudiciais para a mãe e/ou conceito, permitindo o acompanhamento cardiológico periódico no transcurso da gestação². Vários estudos ecocardiográficos seqüenciais em gestantes normais demonstraram haver aumento da massa e da espessura da parede ventricular esquerda a partir da 12ª semana de gestação, sugerindo que o processo de hipertrofia cardíaca seria um mecanismo compensador da dilatação ventricular induzida pela sobrecarga volumétrica, cuja principal finalidade é promover a manutenção do desempenho contrátil do coração¹⁰⁻¹⁵.

Podemos concluir, então, que a maioria dos autores acreditam na ocorrência da hipertrofia cardíaca durante o período gestacional normal, no entanto, suas hipóteses baseiam-se em dados de diagnóstico por imagem. Assim, o presente trabalho tem como objetivo estudar os aspectos morfológicos e morfo-

métricos dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo de ratas albinas durante a prenhez.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizadas ratas (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia, Mammalia), adultas, com idade variando entre 90 a 120 dias, virgens, pesando entre 240 e 280 gramas, provenientes da linhagem OUTB EPM-1 (Wistar) Br Epm (2c), procedentes do CEDEME - Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais em Medicina e Biologia da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM).

Os animais foram acondicionados em gaiolas e mantidos sob condições ideais, tendo alimentação e água ad libitum. Findo o período de adaptação, os animais foram acasalados na proporção de duas fêmeas para cada macho. A determinação da prenhez foi obtida por meio da pesquisa de espermatozoides na vagina¹⁶. O teste, quando positivo, foi considerado como o primeiro dia de prenhez. Obtido o acasalamento, doze animais foram divididos, ao acaso, em quatro grupos, de acordo com a idade gestacional: 1º (G-A), 7º (G-B), 14º (G-C) e 21º (G-D) dia de prenhez.

Salientamos que as ratas constituintes dos vários grupos estudados, excluindo-se as pertencentes ao primeiro dia de prenhez, quando sacrificadas, apresentavam sítios de implantações e fetos de acordo com a idade gestacional em que o animal se encontrava. Essa observação foi utilizada como critério determinante da inclusão da mesma no experimento.

No período estabelecido para cada grupo, os animais foram anestesiados por inalação de éter etílico, assim, foi possível executarmos a toracotomia e procedermos a retirada do coração em bloco. O material coletado foi prontamente acondicionado sobre uma placa de parafina, permitindo com auxílio de uma lâmina de bisturi nº 20, a obtenção de fragmentos do terço médio do ventrículo esquerdo, os quais foram destinados a processamento adequado, segundo a metodologia descrita em literatura^{17,18}, visando posterior observação à microscopia de luz.

O estudo cariométrico foi realizado a partir da mensuração dos diâmetros maiores e menores dos núcleos dos cardiomiócitos utilizando-se uma ocular de medição com tambor rotativo modelo K 8 X da marca Carl Zeiss, adaptada a um microscópio de luz com objetiva de 100 X. Após a projeção do campo ocular sobre o corte histológico de 10 µm de espessura corado pelo H.E., mensuramos os núcleos dos cardiomiócitos cortados longitudinalmente, des-

prezando aqueles cujos cortes fossem transversais ou oblíquos, para evitar falsos resultados. Após medir os dois diâmetros perpendiculares do núcleo, o volume foi calculado segundo a fórmula descrita por Salvatore¹⁹, a saber:

$$V = (A^2 \cdot B) / 1.91$$

onde: V → representa o volume nuclear, A → o menor diâmetro do núcleo, B → o maior diâmetro do núcleo e 1.91 → constante

Então, para cada animal, foram obtidos 50 volumes nucleares, totalizando 150 medidas para cada grupo estudado, dos quais se obteve o volume nuclear médio. Perfazendo um total de 600 núcleos para o experimento, que foram submetidos à análise de variância por postos de Kruskal Wallis, fixando-se $p < 0,05$.

O protocolo de pesquisa desta tese foi submetido à apreciação da Comissão de Ética Médica do Hospital São Paulo da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, tendo sido aprovado.

RESULTADOS

Notamos que o miocárdio achava-se constituído, principalmente, de cardiomiócitos, capilares e substância intercelular. Os cardiomiócitos apresentavam morfologia típica, ou seja, eram de pequeno tamanho, irregulares, com um ou dois núcleos em posição central. Com relação a orientação dos cardiomiócitos na parede do ventrículo esquerdo, verificamos que estavam agrupados, formando feixes em várias direções do espaço, ou seja, em um determinado campo do microscópio havia feixes cortados transversalmente ao lado de outros dispostos longitudinal ou mesmo obliquamente. Devemos mencionar que no 14º (G-C) e 21º (G-D) dia, os núcleos dos cardiomiócitos apresentavam-se mais evidentes, maiores e eucromáticos. Não se identificaram figuras de mitose nos cardiomiócitos nos diferentes grupos estudados.

No que diz respeito à cariometria, as médias dos volumes nucleares (µm³) calculados encontram-se resumidos na tabela abaixo, assim como, encontram-se demonstrado no gráfico da figura 1.

	Dia de prenhez			
	1º(G-A)	7º(G-B)	14º(G-C)	21º(G-D)
Médias	81,68	82,51	126,71*	81,18

*Significativo

Os volumes nucleares médios dos cardiomiócitos pertencentes ao 14º dia de prenhez apresentaram aumento estatisticamente significativo (Fig.1) quando comparados aos outros grupos estudados.

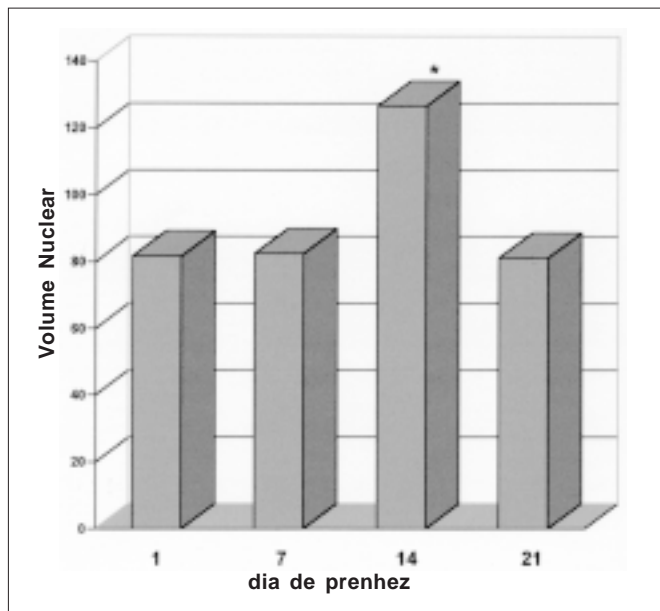


Fig. 1 - Valores cariométricos (μm^3) dos cardiomiócitos das ratas nos diferentes grupos estudados.

O teste de comparações múltiplas para os volumes nucleares entre os vários grupos revelou: 14^o (G-C) > 1^o (G-A), 7^o (G-B) e 21^o (G-D) dia de prenhez.

DISCUSSÃO

As características hemodinâmicas da gestação normal apresentam certas peculiaridades de grande interesse tanto para o cardiologista como para o obstetra. Seu conhecimento permite melhor compreensão das alterações clínicas que surgem durante a gestação, parto e puerpério, permitindo uma conduta clínica e obstétrica adequada, visando ao bem-estar materno e fetal¹.

Ainda persistem controvérsias na literatura a respeito da ocorrência de hipertrofia cardíaca no transcurso da gestação fisiológica. No entanto, a maioria dos autores que acreditam na ocorrência da hipertrofia cardíaca, baseiam suas hipóteses em dados de diagnóstico por imagem (radiológicos e ecocardiográficos)^{6,8,11,12,15,20}.

Deve ser salientado que a hipertrofia cardíaca é o mecanismo de compensação mais eficiente que o coração utiliza frente à sobrecarga hemodinâmica. Assim, o modelo de crescimento do miocárdio é um fenômeno adaptativo que apresenta características específicas para cada tipo de sobrecarga imposta ao coração; seja pressórica ou volumétrica²¹. No entanto, a importância da participação dos vários fatores envolvidos no processo de hipertrofia ventricular ainda permanece controverso na literatura²².

Durante a vida fetal e de três a quatro meses após o nascimento, o crescimento do coração faz-se

às custas de hiperplasia celular. Findo esse período, a fibra cardíaca perde sua capacidade mitótica, assim o aumento do miocárdio ocorre por meio da hipertrofia celular. Portanto, o processo de hipertrofia parece ser o método primário de aumento da massa cardíaca da infância à idade adulta²¹.

O aumento do diâmetro ventricular e da espessura de sua parede em modelos de sobrecarga volumétrica resultam na adição de novos sarcômeros em série e em paralelo, mantendo-se constante a população de cardiomiócitos ocorrendo, dessa maneira, alongamento das fibras cardíacas e hiperplasia das células não-musculares^{23,24}.

Portanto, o coração submetido à sobrecarga volumétrica altera sua arquitetura, via hipertrofia, promovendo uma remodelação ventricular com a finalidade de normalizar a tensão parietal, segundo a Lei de Laplace ($T = \pi.R / 2.H$, onde: $T \rightarrow$ representa a tensão da parede, $\pi \rightarrow$ constante, $R \rightarrow$ o raio da câmara e $H \rightarrow$ a espessura da parede). Assim, nos modelos de sobrecarga volumétrica, a razão entre o raio da câmara cardíaca e a massa do ventrículo esquerdo mantém-se dentro dos padrões de normalidade, caracterizando o processo de hipertrofia ventricular excêntrica²⁵.

No presente trabalho, a rata foi o animal escolhido por ser habitualmente utilizada neste tipo de experimento e por permitir que os resultados obtidos possam ser melhor comparados aos da literatura.

No que diz respeito ao estudo morfológico do grupo gestação, os resultados sugeriram que os cardiomiócitos pertencentes ao coração das ratas no 14^o (G-C) e 21^o (G-D) dia de prenhez possuem núcleos maiores e ricos em eucromatina, quando comparados ao início da prenhez. Tais resultados sugerem haver maior atividade metabólica das células cardíacas no período gestacional²⁶.

Salientamos ainda que no estudo dos cortes histológicos dos fragmentos do ventrículo esquerdo das ratas participantes da presente pesquisa, não foram encontradas figuras de mitose, confirmando a característica da célula cardíaca de coração adulto.

Portanto, baseado nos resultados morfológicos obtidos no decorrer da prenhez, não foi possível demonstrar a hipertrofia dos cardiomiócitos. Assim, optamos por realizar a cariometria, visando avaliar de forma objetiva a evolução dos volumes nucleares no transcurso da prenhez. Os nossos resultados, demonstrando aumento significativo dos volumes nucleares dos cardiomiócitos no 14^o (G-C) dia de prenhez, denotam a ocorrência de hipertrofia da fibra muscular cardíaca, conforme descrito por Gerdes *et al.*²⁶.

No que diz respeito aos demais grupos estudados (1^o, 7^o e 21^o dias de prenhez), observamos volumes

nucleares médios semelhantes entre si. Tal achado permite supor que talvez o processo de regressão da hipertrofia ventricular esquerda, inicia-se já no fim do período gestacional, cujo substrato morfológico somente poderá ser denotado no puerpério. Essas observações abrem as portas para futuras pesquisas na área.

Portanto, é possível concluir que a participação concomitante de vários fatores envolvidos direta ou indiretamente na gênese da hipertrofia dos cardiomiócito observado durante a prenhez dificulta a quantificação do papel de cada um isoladamente no processo de crescimento celular.

CONCLUSÃO

A análise de nossos resultados morfológicos e morfométricos permite concluir que, com o decorrer da prenhez, os cardiomiócitos do ventrículo esquerdo de ratas albinas sofrem hipertrofia, nitidamente observada no 14° dia do período gestacional.

SUMMARY

Histomorphometrical study of cardiomyocytes of the left ventricular of albino rats during pregnancy

PURPOSE. In the present study we evaluated, by light microscopy, and throughout morphometry, whether hypertrophy of cardiac striated muscular fibers of left ventricular occur in albino rat, during pregnancy.

METHODS. After mating, 12 nuliparous rats were divided into four groups with three animals for each group. The female rats corresponding to each group were killed at 1st, 7th, 14th and 21st days of pregnancy.

RESULTS. Observation, on light microscopy (H.E) had at one view, did not display any alterations during pregnancy. However, the morphometry revealed that nuclei of cardiomyocytes are augmented in volume at 14th day of pregnancy and statistically significant data show the hypertrophy.

CONCLUSION. The obtained data show the existence of a dynamic and reversible process of ventricular remodelling in consequence of adaptation physiological alterations of the cardiovascular normal pregnancy. [Rev Ass Med Brasil 1999; 45(3): 242-6.]

KEY WORDS: Heart. Pregnancy. Physiological adaptation. Hypertrophy left ventricular. Cardiomyocytes. Kariometry

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Liberatori Filho, A.W.; Lopes, M.D.; Lopes, A.C. - Alterações funcionais do sistema circulatório na gravidez. *Rev. Bras. Clin. Terap.*, 1998; 24: 123-7.

2. Campos Filho, O. - *Estudo Doppler-ecocardiográfico do comportamento fisiológico dos fluxos valvares na gravidez e puerpério.* São Paulo, 1992. (Tese de Doutorado - Escola Paulista de Medicina)
3. Longo, L. - Maternal blood volume and cardiac output during pregnancy: a hypothesis of endocrinologic control. *Amer. J. Physiol.*, 1983; 245: R720-7.
4. Mackenzie, Sir J. - *Heart disease and pregnancy.* London, Oxford, 1921.
5. Frey, W. - *Herz und Schwangerschaft.* Leipzig, Thieme, 1923.
6. Jensen, F.G. & Norgaard, E. - Studies on the functional cardiac diseases and essential cardiac hypertrophy in normal pregnant women. *Acta Obstet. Gynec. Scand.*, 1927; 6: 67-76.
7. Binhold, H. - Das Herzvolumen in der Schwangerschaft. *Arch. Gynäk.*, 1933; 154: 251-7.
8. Hamilton, B.E. & Thomson, K.J. - *The heart in pregnancy.* Boston, Little Brown, 1941.
9. Metcalfe, J.; Macnulty, J.H.; Ueland, K. - The effects of pregnancy on the cardiovascular system and oxygen transport. In: Burwell, C.S. & Metcalfe, J. - *Heart Disease and Pregnancy: physiology and management.* 2. ed., Boston, Little Brown, 1986. p.11-83.
10. Rubler, S.; Pradokumar, M.D.; Pinto, E.R. - Cardiac size and performance during pregnancy estimated with echocardiography. *Clin. Obstet. Gynec.*, 1977; 40: 534-9.
11. Katz, R.; Karliner, J.S.; Resnik, R. - Effects of natural volume overload state (pregnancy) on left ventricular performance in normal human subjects. *Circulation*, 1978; 58: 434-41.
12. Laird-Meeter, K.; Van De Ley, G.; Bom, T.H.; Wladimiroff, J.W.; Reolandt, J. - Cardiac adjustments during pregnancy: an echocardiographic study. *Clin. Cardiol.*, 1979; 2: 328-32.
13. Krajewski, A.; Wroblewski, T.E.; Zachwiej, E. - Echocardiographic assessment of the cardiocirculatory system in healthy pregnant women in the third trimester. *Gynecologia Pol.*, 1983; 54: 477-81.
14. Limacher, M.C. - Echocardiography in Pregnancy. *Echocardiographic*, 1986; 3: 19-32.
15. Castillon, G.; Weisburger, J.; Rouffet, M.; Castillon, V.; Barrat, J. - Étude échocardiographique des modifications hémodynamiques de la grossesse. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.*, 1984; 13: 499-505.
16. Hamilton, J.B. & Wolfe, J.M. - The effect of male hormone substance upon birth and prenatal development in the rat. *Anat. Rec.*, 1938; 70: 433-40.
17. Junqueira, L.C.U.; Bignolas, G.; Brentani, R.R. - A simple and sensitive method for the quantitative estimation of collagen. *Anal. Biochem.*, 1979; 94: 96-9.
18. Junqueira, L.C.U.; Montes, G.S.; Sanchez, E.M. - The influence of tissue section thickness on the study of collagen by picrosirius. *Histochemistry*, 1982; 74: 153-6.
19. Salvatore, C.A. - Sobre a natureza da hipertrofia nuclear das células musculares uterinas durante a gravidez. *An. Bras. Ginec.*, 1948; 26: 453-62.
20. Triulzi, M.; Gillan, L.D.; Gentile, F.; Newell, J.B.; Weyman, A.E. - Normal adult cross-sectional echocardiography values: linear dimensions and chamber area. *Ecocardiography*, 1984; 1: 403-23.
21. Anversa, P.; Ricci, R.; Olivetti, G. - Quantitative structural analysis of the myocardium during physiological growth and induced cardiac hypertrophy: a review. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1986; 7: 1.140-9.
22. Grossman, W. - Cardiac hypertrophy: useful adaptation or pathologic process? *Am. J. Med.*, 1980; 69: 576-83.

23. McCullagh, W.H.; Covell, J.W.; Ross Jr, J. - Left ventricular dilation and diastolic compliance changes during chronic volume overloading. *Circulation*, 1972; 45: 943-51.
24. Ross Jr, J. - Adaptations of the left ventricle to chronic volume overload. *Circ. Res.*, 1974; 35: 64-70.
25. Omens, J.H. & Covell, J.W. - Transmural distribution of myocardial tissue growth induced by volume overload in the dog. *Circulation*, 1991; 84: 1235-45.
26. Gerdes, A.M.; Liu, Z.; Zimmer, H.G. - Changes in nuclear size of cardiac myocytes during the development and progression of hypertrophy in rats. *Cardioscience*, 1994; 5(3): 203-8.