

Henrique Murad  
Allan Douglas Ribeiro de Queiróz  
Marcos Macedo Piedade  
Luíza Helena Francescutti Murad  
Gerson Cotta Pereira  
Solange Chalfun de Mattos  
Eduardo Sérgio Bastos  
Antônio de Pádua Jazbik

## Alterações da ultra-estrutura miocárdica durante cirurgia cardíaca

*Os autores fazem uma revisão da ultra-estrutura miocárdica normal e alterada por isquemia cardíaca e circulação extracorpórea, analisando a quantificação das alterações encontradas. Admitem que o estudo da ultra-estrutura miocárdica é um bom método para estudar a proteção miocárdica durante cirurgia cardíaca.*

As alterações da ultra-estrutura miocárdica durante as operações cardíacas permitem avaliar o dano miocárdico nos vários períodos de isquemia sofridos pelo coração durante o ato cirúrgico e servem para demonstrar a eficácia do método de proteção miocárdica usado.

No presente trabalho, faremos uma revisão da ultra-estrutura miocárdica normal e das alterações após isquemia cardíaca e circulação extracorpórea, bem como dos métodos usados para avaliar a intensidade das alterações ultra-estruturais miocárdicas.

### Ultra-estrutura miocárdica

As funções cardíacas são executadas por 2 grupos diferentes de células: as ligadas à atividade elétrica e as ligadas à atividade mecânica. Estudaremos aqui as alterações das células ligadas à atividade mecânica devidas à circulação extracorpórea e à isquemia cardíaca.

Os componentes morfológicos da célula miocárdica do cão são semelhantes aos do homem. Apenas, as mitocôndrias, no homem, são proporcionalmente menores do que no cão<sup>1</sup>. Assim sendo, o cão é um ótimo animal de experiência para o estudo da ultra-estrutura miocárdica.

As células ligadas à atividade mecânica são todas similares, com pequenas variações entre as células atriais e as ventriculares<sup>2</sup>. São compostas por grande número de miofibrilas e mitocôndrias, que respondem por 84% do volume celular<sup>3</sup>. As miofibrilas estão dispostas, dentro da célula, longitudinalmente, em série. Cada célula possui um núcleo central, uma membrana limitante (sarcolema), com 2 sistemas de membranas intracelulares (sistema tubular transverso e retículo sarcoplasmático) e quantidade

variável de sarcoplasma separando as miofibrilas.

Cada célula miocárdica, vista em corte longitudinal, apresenta em suas extremidades os discos intercalares e se junta à célula seguinte de modo a formar fibras longas e ramificadas. Lateralmente, as fibras estão separadas por espaços intercelulares contendo pequena quantidade de colágeno, ocasionais fibroblastos e numerosos capilares. Expansões citoplasmáticas estendem-se de muitas células de modo a unir fibras adjacentes, formando uma rede contínua de células. As células miocárdicas constituem, sob o ponto de vista funcional, um sincício (os discos intercalares representam regiões de baixa resistência elétrica), porém, anatomicamente, elas apresentam limites bem definidos. As fibras musculares são separadas por tecido conjuntivo, em longos feixes interligados. As fibras miocárdicas, dentro de um feixe, são paralelas, mas os feixes adjacentes podem ser paralelos, oblíquos ou mesmo transversos.

As miofibrilas são o elemento contrátil do coração. São estriadas, exibindo um padrão repetido de faixas transversais claras e escuras. As faixas escuras são denominadas faixas A (anisotrópicas ou birrefringentes à luz polarizada), sendo formadas por filamentos espessos, compostos por miosina, (macromoléculas de 10 nanômetros, que dão a característica anisotrópica) e filamentos finos, compostos principalmente por actina (5 nanômetros) e, ainda, por tropomiosina e troponina<sup>4</sup>. As faixas claras são denominadas faixas I (isotrópicas, ou menos birrefringentes), sendo formadas por filamentos finos. A faixa A é dividida por uma linha escura, chamada linha M (do alemão, "Mittellinie"), que corresponde a espessamentos focais,

Trabalho realizado no Serviço de Cirurgia Cardíaca do Hospital Universitário da UFRJ, no Departamento de Histologia e Embriologia da UERJ e no Serviço de Cirurgia Cardiovascular do Hospital da Polícia Militar do Rio de Janeiro, com auxílio do CNPq.

onde pequenos filamentos unem diversos filamentos espessos entre si<sup>5</sup>. A faixa I é dividida por uma linha escura, estreita denominada linha Z (do alemão, “Zwischenscheibe”), onde os filamentos finos se interligam. No centro da faixa A, existe uma faixa H (do alemão, “Hell”), ao redor da linha M, composta somente por filamentos espessos<sup>6</sup>.

A unidade morfológica fundamental do músculo estriado, o sarcômero, é a região entre duas linhas Z, composta de uma faixa A e uma metade de faixa I de cada lado<sup>3</sup>. Ao nível da faixa A, seis filamentos finos estão geometricamente colocados ao redor de cada filamento espesso, estando cada filamento fino equidistante de três filamentos espessos. Os filamentos finos têm superfície lisa, enquanto a superfície dos filamentos espessos apresenta espículas que os unem aos filamentos finos cada filamento espesso é unido, a intervalos regulares, pelas espículas, a 6 filamentos finos. Cada filamento fino recebe espículas de 3 filamentos espessos equidistantes.

A contração muscular ocorre por deslizamento dos filamentos finos sobre os filamentos espessos. Os filamentos finos são puxados para o centro do sarcômero, fazendo com que a faixa I e a faixa H fiquem mais estreitas, sem que se altere o comprimento dos filamentos espessos ou finos<sup>7</sup>. O comprimento da faixa A fica inalterado durante a contração muscular. O deslizamento dos filamentos finos se dá graças às espículas dos filamentos espessos, que se unem e se soltam, ciclicamente, em pontos diferentes dos filamentos finos, utilizando a energia derivada do ATP, produzida em mitocôndrias vizinhas.

As mitocôndrias contêm as enzimas responsáveis pela fosforilação oxidativa, sendo responsáveis pela produção aeróbica de energia química no miocárdio. Estão localizadas próximo às miofibrilas. Possuem uma dupla membrana (que faz com que sua composição iônica seja diferente da do sarcoplasma), com várias projeções transversais - as cristas - que se projetam a partir da membrana interna. A configuração das cristas ao microscópio eletrônico depende do estado funcional da mitocôndria no momento da fixação. Durante a fosforilação oxidativa ativa as cristas se apresentam como várias faixas paralelas, ocupando densamente a mitocôndria. O volume das mitocôndrias corresponde a cerca de 25 a 50% da massa miocárdica<sup>8</sup>. A observação da integridade da mitocôndria representa um meio importante de se estudar o comportamento do coração durante a isquemia.

Grande número de grânulos de glicogênio e gotículas de gordura estão situados próximo às mitocôndrias e representam, provavelmente, fontes de metabólitos para os processos enzimáticos.

O sarcolema possui invaginações periódicas que cruzam, transversalmente, as miofibrilas ao nível das linhas Z, representando o sistema tubular transversal ou sistema T. Além de seu trajeto transversal, o sistema T também aparece no sentido longitudinal, entre os sarcômeros, e liga-se diretamente a outros túbulos, transversos sucessivos<sup>9</sup>. O sarcolema e as membranas do sistema T permitem a manutenção de um meio intracelular diferente

do extra-celular, através de bombas iônicas, de canais iônicos, que efetuam alterações no potencial de membrana, e de enzimas (fig. 1).

O retículo sarcoplasmático é um sistema de membranas intracelulares, composto de uma parte granular e outra agranular. É um sistema longitudinal, representando um labirinto de túbulos, alguns transversalmente orientados, sem guardar qualquer relação com faixas ou linhas<sup>8</sup>. O retículo sarcoplasmático granular é pequeno, apresenta ribossomos em sua face externa e está ligado à síntese protéica. O retículo sarcoplasmático agranular, ou rede sarcotubular, entra em contato com o sistema T e o sarcoplasma através de cisternas é subsarcoplasmáticas. As membranas do retículo sarcoplasmático situam-se próximas às do sistema T ou do sarcolema, ao nível das cisternas, sem se fundirem ou estabelecerem íntimo contato. A estrutura formada pela cisterna subsarcoplasmática e a porção adjacente do sistema T ou do sarcolema é chamada díade. Aparentemente o sistema T seria o responsável pela difusão do impulso elétrico para dentro da célula, enquanto o sistema longitudinal seria o responsável pela fusão eletromecânica. Foi demonstrado que o cálcio se acumula ativamente no retículo sarcoplasmático<sup>3</sup>.

O disco intercelular forma a junção entre as células miocárdicas. Está localizado nas linhas Z, em ângulo reto com as fibras musculares. As células são divididas em níveis diferentes de linhas Z, dando ao disco intercalar uma aparência de escada.

Três tipos de junções intercelulares são encontrados ao nível dos discos intercalares: “fascia adherens”, “mácula adherens” (desmosoma) e “nexus” (junção comunicante). A “fascia adherens” representa as duas membranas celulares, paralelas separadas por uma distância de 20 a 30 nanômetros, onde os tonofilamentos se ligam fortemente. A “mácula adherens” (desmosoma) é uma estrutura mais complexa, não associada a miofibrilas, laminar, composta pelas duas membranas celulares e depósitos citoplasmáticos. O “nexus” representa uma região de contato mais íntimo entre as membranas celulares, permitindo passagem livre de íons e apresentando baixa resistência elétrica<sup>6</sup>. As junções através do “fascia adherens” e dos desmosomas dependem do cálcio e podem ser desfeitas com EDTA ou irrigação do coração isolado com soluções sem cálcio. Estas células assim tratadas não têm seu processo de excitação eletromecânica abolido, ao passo que a ruptura do “nexus” com soluções hipertônicas provoca a abolição do acoplamento elétrico entre as fibras. Assim, acredita-se que o “nexus” seja a junção responsável pela difusão da excitação elétrica no músculo cardíaco<sup>8</sup>.

O núcleo das células miocárdicas é central alongado, com envoltório formado por duas membranas. Apresenta nucleoplasma homogêneo finamente granular, onde se encontra cromatina dispersa, com algumas áreas de acúmulo<sup>10</sup>.

### **Alterações ultraestruturais miocárdicas da isquemia**

A isquemia provoca alterações na ultra-estrutura miocárdica. Os estudos da ultra-estru-

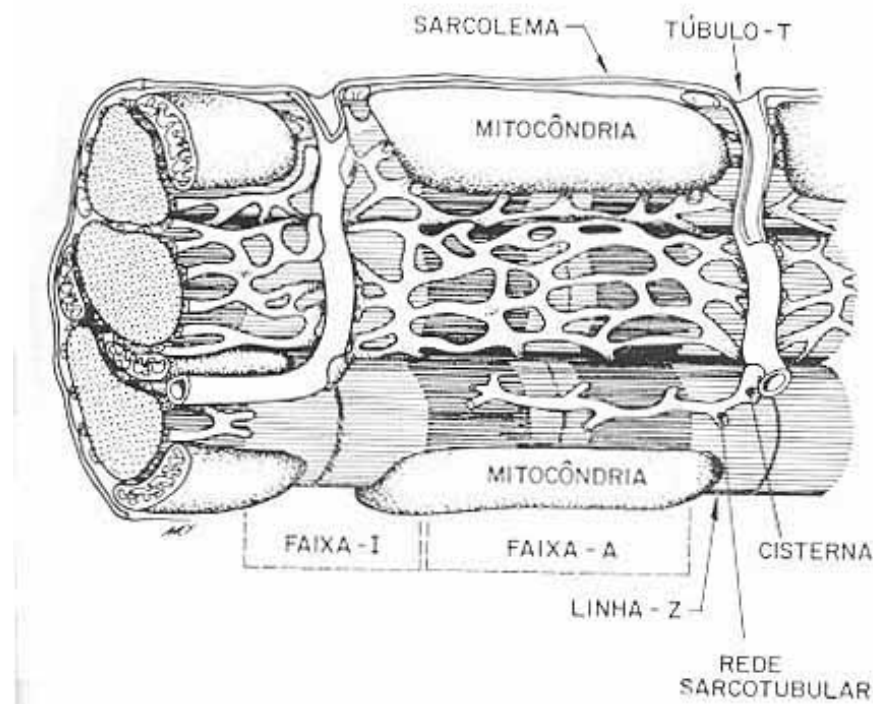


Fig. 1 - Esquema adaptado<sup>3</sup> da ultra-estrutura da célula miocárdica

tura miocárdica após a isquemia foram feitos por oclusão temporária de artérias coronárias<sup>11-13</sup>. Jennings e col.<sup>14</sup> estudaram, no músculo papilar posterior de cães, as conseqüências morfológicas da oclusão temporária da artéria circunflexa. Consideraram como alterações reversíveis: edema discreto das mitocôndrias, dilatação do retículo sarcoplasmático, marginação moderada da cromatina nuclear e edema das miofibrilas. Essas alterações foram encontradas após tempo de isquemia inferior a 18 min. As lesões irreversíveis, encontradas após 60 min de isquemia, caracterizaram-se por ausência de glicogênio, marginação total da cromatina nuclear, grande edema mitocondrial com ruptura e fragmentação das cristas, diminuição na densidade da matriz mitocondrial e aparecimento de densidades amorfas no interior da mitocôndria (fig. 2). A maioria dos estudos mostrou recuperação da função cardíaca no cão, após 30 min de isquemia normotérmica; grande depressão miocárdica, após 45 min e depressão severa ou ausência de recuperação funcional, após 60 min<sup>15,16</sup>. O estado de lesão irreversível é atingido mais precocemente pelas células subendocárdicas do que pelas células subepicárdicas<sup>13</sup> e mais pelas células de corações hipertrofiados do que pelas células de corações normais<sup>17</sup>.

Com a cirurgia cardíaca, houve grande interesse em estudar as alterações ultra-estruturais apresentadas durante a circulação extracorpórea, salvo algum edema celular e mitocondrial, seja conseqüência de isquemia

miocárdica<sup>18</sup>. Assim, podemos avaliar os métodos de proteção miocárdica durante isquemia cardíaca conhecendo as alterações ultra-estruturais presentes nos variáveis graus de isquemia. Essas alterações podem ser discretas, moderadas ou severas. Nas micrografias eletrônicas, os dados que devem ser procurados são: grau de separação e desorganização das miofibrilas, marginação da cromatina nuclear, edema mitocondrial, ruptura mitocondrial e de desorganização das cristas, presença de grânulos densos intramitocondriais, formação de faixas de contração, desaparecimento dos grânulos de glicogênio e edema endotelial, com formação de bolhas<sup>19,20</sup>.

As miofibrilas apresentam edema proporcional à isquemia sofrida. A aparência de alargamento dos espaços intercelulares na microscopia óptica é devida à formação de bolhas subsarcolêmicas. A maior parte do edema apresentado na isquemia é intracelular. O edema é mais pronunciado com a reperfusão sangüínea. A perda da habilidade de controlar o volume celular parece ser um evento importante na patogenia da lesão isquêmica irreversível<sup>21</sup>. O edema celular é moderado nas áreas isquêmicas, provavelmente porque o volume de líquido extracelular existente é pequeno. Entretanto, quando essas áreas isquêmicas são submetidas à reperfusão sangüínea, o edema que segue pode ser intenso, sendo proporcional ao tempo e intensidade da isquemia. O edema celular é

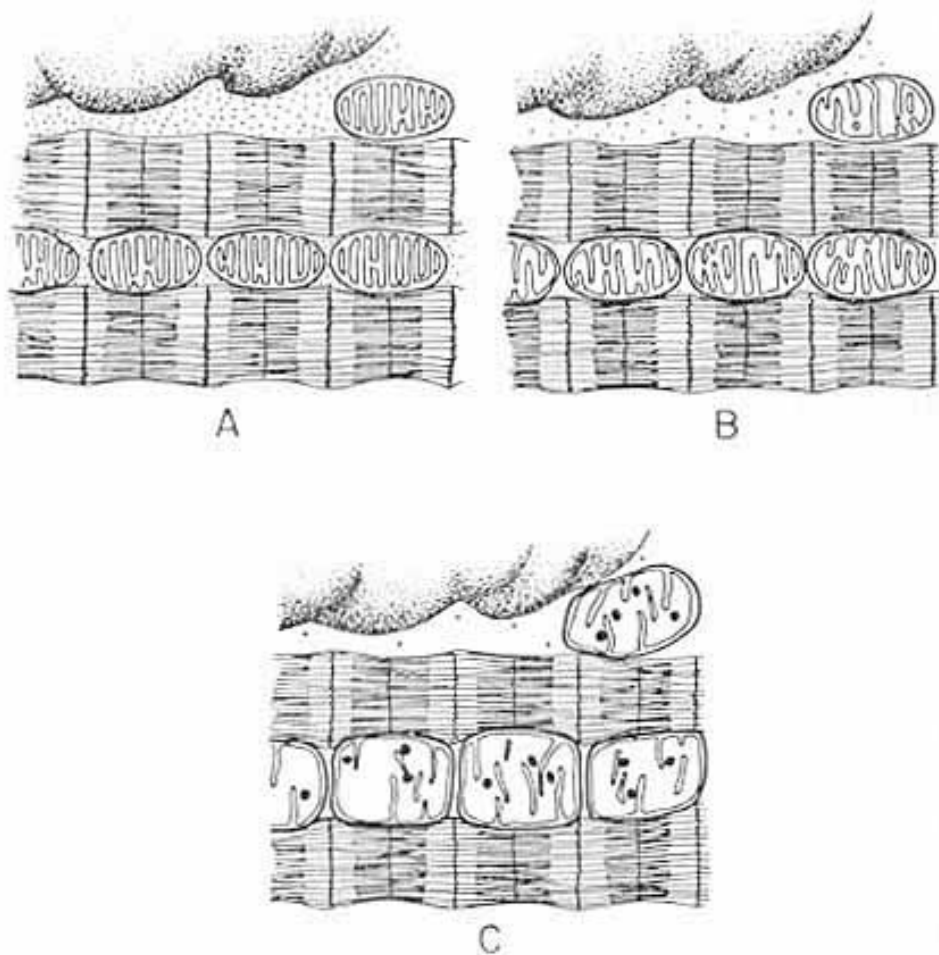


Fig. 2 - Esquema adaptado<sup>15</sup> das alterações ultra-estruturais miocárdicas da isquemia: A - ultra-estrutura miocárdica normal; B - isquemia miocárdica reversível; C - isquemia miocárdica irreversível.

essencialmente a isosmótico<sup>20</sup> e ocorreria por produção insuficiente de ATP para ativar a bomba de sódio e potássio; por acidose, que também inibe a bomba de sódio e potássio; por deficiência da função das mitocôndrias em produzir ATP<sup>22</sup>. A acidose intracelular ocorre porque o ácido láctico produzido pelo metabolismo anaeróbico não pode ser transportado para fora da célula miocárdica isquêmica<sup>23</sup>.

Reperusão com manitol diminui o edema celular e a necrose em estudos de isquemia regional e reperusão<sup>24</sup>. Essa diminuição do edema talvez resulte em melhora das lesões e permite a sobrevivência de organelas importantes para a manutenção da viabilidade celular. Além disso, o manitol e outros agentes hiperosmolares aumentam o fluxo sanguíneo do miocárdio não isquêmico e minimizam o edema mitocondrial.

Dependendo da isquemia, pode haver desorganização das miofibrilas. As membranas celulares podem romper-se, possivelmente por trauma mecânico dos batimentos cardíacos sobre células edemaciadas e frágeis. Quando a

membrana celular se rompe, podemos encontrar mitocôndrias ou outros corpúsculos celulares no espaço extracelular. Esses achados são comumente encontrados em presença de isquemia irreversível.

As células isquêmicas reperfundidas apresentam faixas de contração proporcionais ao tempo de isquemia<sup>12</sup>. As faixas de contração parecem ser formadas por liberação descontrolada de cálcio para dentro da célula miocárdica. Estudos histológicos em casos de “stone heart” mostraram necrose miocárdica com fibras musculares cardíacas hipercontraídas<sup>25</sup>. Os estudos de Hearse e col.<sup>26</sup> mostraram que a contração, isquêmica do miocárdio começava quando os níveis de ATP atingiam 55 a 60% dos níveis anteriores à isquemia e completava se quando atingiam 20%. A sequestração de cálcio é um processo que necessita de energia e depende da concentração extracelular de cálcio<sup>27</sup>. A mitocôndria normal, na presença de cálcio “in vitro”, acumula este íon por um processo ativo,

ao invés de fazer fosforilação oxidativa. Acúmulo de cálcio na mitocôndria implica que o sistema de transporte de elétrons esteja intacto, permitindo acumulação ativa de cálcio. O cálcio acumulado dentro das mitocôndrias pode lesá-las e impedir a recuperação da célula<sup>12</sup>. O acúmulo de cálcio no miocárdio, após reperfusão, é indicativo de uma lesão isquêmica significativa<sup>28</sup>. Depósitos granulares de cálcio também são encontrados nas mitocôndrias de células submetidas à isquemia e à reperfusão.

As lesões mitocondriais mais comuns são a perda da densidade da matriz e a fragmentação das cristas. Essas lesões têm sido encontradas também em células miocárdicas de cães submetidos a estado de choque. Após reperfusão de células isquêmicas, aparecem corpos granulares densos no interior das mitocôndrias, provavelmente contendo cálcio<sup>20</sup>. Esses, habitualmente, coexistem com as faixas de contração e representam uma lesão isquêmica severa.

Três grandes processos são realizados nas mitocôndrias: ciclo de Krebs, transporte terminal de elétrons e fosforilação oxidativa<sup>29</sup>. Esses processos são afetados pela isquemia. As mitocôndrias das células irreversivelmente isquêmicas perdem a capacidade de sintetizar ATP, mesmo em um meio favorável<sup>30</sup>. Não conseguem metabolizar alfa cetoglutarato e têm apenas 3 a 4% de sua capacidade de transformar completamente  $3C^{14}$  piruvato em  $CO_2$  e  $H_2O$ <sup>31</sup>.

As enzimas do ciclo de Krebs estão bastante deprimidas e não podem ser restabelecidas no estágio de irreversibilidade. Há uma correlação íntima entre alterações estruturais e funcionais das mitocôndrias<sup>31,32</sup>.

A lesão isquêmica mitocondrial faz com que menos oxigênio seja utilizado pela célula miocárdica<sup>13,33,34</sup>. A diferença arteriovenosa coronária é estreita nos corações isquêmicos<sup>35</sup>. Edema miocárdico<sup>20</sup>, acidose intracelular com diminuição da função de enzimas vitais<sup>36</sup>, redistribuição de fluxo coronário e perda de co-fatores vitais<sup>35</sup> também podem justificar essa diminuição de consumo de oxigênio pelo miocárdio isquêmico.

Nas lesões reversíveis, a cromatina nuclear, apenas discretamente, coloca-se na periferia, em quanto que, nas lesões irreversíveis, ela acumula-se totalmente na periferia do núcleo<sup>12</sup>.

O glicogênio está diminuído, mas não ausente nas lesões irreversíveis. No cão, há uma correlação entre o grau de isquemia miocárdica e a depleção de glicogênio<sup>37</sup>. Os lisossomos permanecem íntegros. Somente após 4 horas de isquemia, é que podemos demonstrar alterações significativas nas atividades enzimáticas dos lisossomos. Os discos intercalares mostram-se intactos.

Kloner e col.<sup>12</sup> encontraram edema celular endotelial discreto, após 40 min de isquemia e não encontraram fenômeno de obstáculo ao fluxo sanguíneo. Somente alguns capilares comprimidos pelo edema celular e bolhas subsarcolêmicas, foram encontrados em seu material.

Jellinek e col.<sup>38</sup> encontraram vacuolização intracelular e formação de bolas no endotélio, após 60 min de isquemia, melhorando após reperfusão. Acreditam serem tais alterações devidas à hipercaliemia e/ou hiperosmolaridade.

Takamoto e col.<sup>39</sup> encontraram lesões do endotélio capilar e extravasamento de hemácias em seu grupo de cães submetidos a proteção miocárdica com dose única de solução cardioplégica. Interpretaram esses dados como dependendo de lesão microvascular.

### **Alterações ultra-estruturais miocárdicas durante circulação extracorpórea**

Os achados ultra-estruturais encontrados nos estudos sobre circulação extracorpórea servem para avaliar os métodos de proteção miocárdica<sup>40</sup>. A microscopia óptica é de pouco valor na avaliação das lesões após a isquemia. No trabalho de Pereira e col.<sup>41</sup>, por exemplo, o grupo II apresenta grande alteração ultra-estrutural. (destruição de mitocôndrias, desarranjo de miofibrilas, depleção acentuada de glicogênio) com microscopia óptica normal.

Há uma grande correlação entre as alterações ultra-estruturais, as alterações hemodinâmicas e as alterações metabólicas. Roberts e col.<sup>42</sup>, em seu trabalho sobre cardioplegia contínua e intermitente em cães, não distinguiram alterações entre os grupos por meio de microscopia eletrônica. Observaram alterações metabólicas e funcionais antes que aparecessem alterações ultra-estruturais. Acreditam que, para lesões miocárdicas discretas, as variáveis funcionais e metabólicas sejam mais importantes do que as alterações ultra-estruturais. Schapper e col.<sup>43</sup>, por outro lado, mostraram severo dano ultra-estrutural em corações humanos submetidos à parada cardíaca cardiológica, sem que houvesse alterações hemodinâmicas apreciáveis.

A circulação extracorpórea, por si só, pode provocar edema provavelmente, como conseqüência de ganho de água corporal durante a circulação extracorpórea<sup>45</sup>. Ocasionalmente, degeneração de mitocôndrias aparece após 90 min de perfusão, sendo provavelmente reversível<sup>32</sup>. Albert e col.<sup>46</sup> encontraram alterações ultra-estruturais após 15 min. de circulação extracorpórea em normotermia. Essas alterações são agravadas por anóxia.

Biopsias do ventrículo esquerdo são apropriadas para estudos sobre circulação extracorpórea, uma vez que esse é o segmento mais exigido do coração durante o trabalho de contração muscular. Bahr e Jennings<sup>47</sup> não encontraram diferenças estruturais entre biópsias feitas em diferentes partes do ventrículo esquerdo. As biopsias de ventrículo esquerdo podem ser obtidas por meio de agulha especial desenvolvida por Braimbridge e Niles<sup>48</sup>. Como se necessita apenas de 1 mm<sup>3</sup> de tecido para o estudo ultra-estrutural, podemos, com essa agulha ou outro método semelhante, obter, com segurança, amostras durante operações em humanos<sup>49</sup>, ou ainda, em experimentação, obter amostras de ventrículo esquerdo e fazer, simultaneamente, estudos de função ventricular (fig. 3).

Para análise de enzimas miocárdicas, uma quantidade maior de tecido muscular é necessária, o que torna impossível fazer curvas de função ventricular simultâneas. A colheita de material para análise de enzimas miocárdicas é habitualmente feita no fim do experimento<sup>50</sup>.

Jellinek e col.<sup>38</sup> compararam os resultados de biópsias de ventrículo direito e ventrículo esquerdo, para análise de enzimas miocárdicas após isquemia e recuperação, encontrando resultados

semelhantes em 30 pares de biópsias. Pode-se, desse modo, colher amostras seriadas do ventrículo direito e estudar, simultaneamente, a função do ventrículo esquerdo.



Fig. 3A

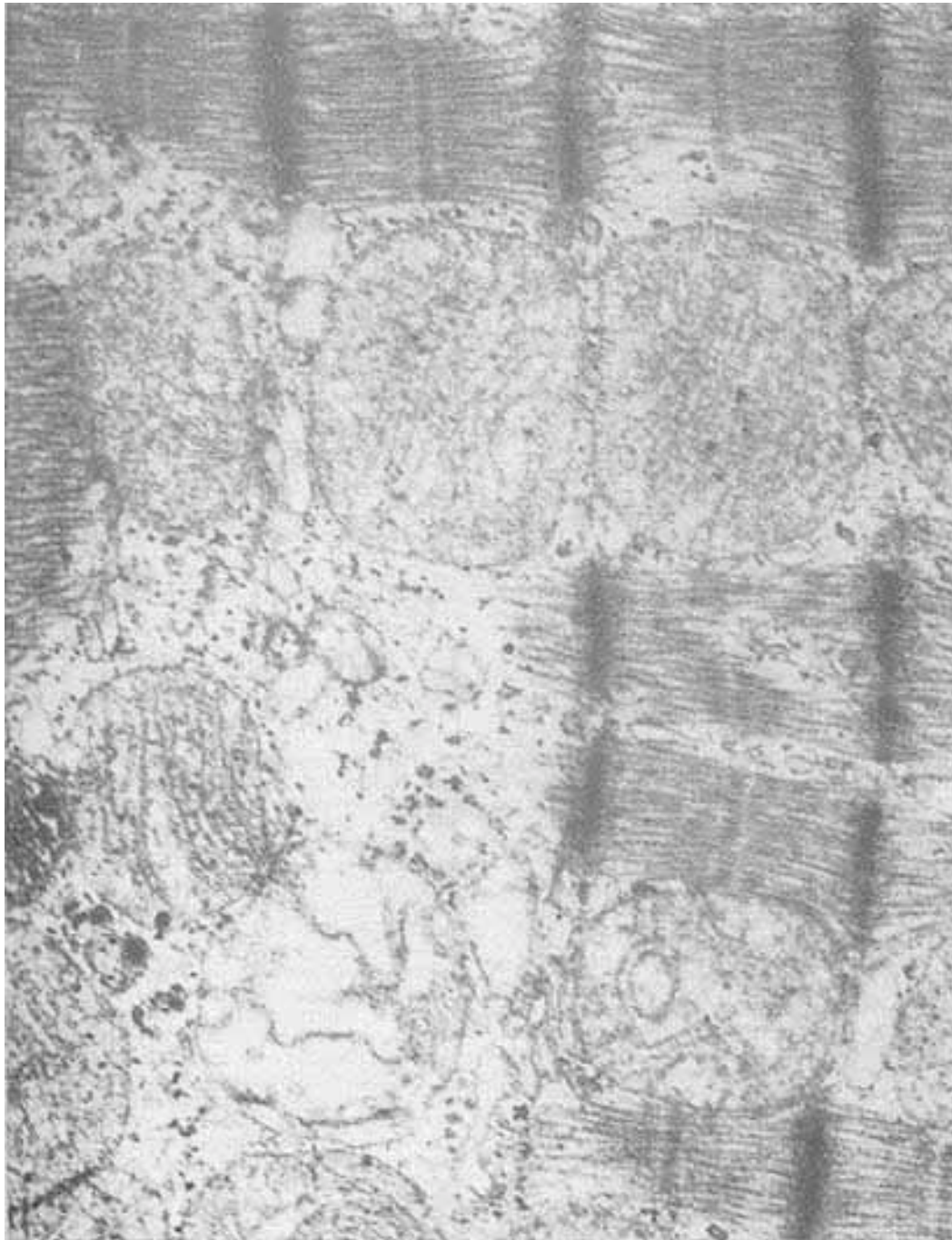


Fig. 3B

Fig. 3 - Micrografias eletrônicas de miocárdio de cães submetidos à circulação extracorpórea, com isquemia cardíaca por 60 min e reperfusão coronária por 60 min. Em A - biópsia obtida antes do período de isquemia. Corte longitudinal de célula muscular cardíaca, mostrando miofibrilas com distribuição normal dos seus filamentos e mitocôndrias com densidade dentro dos limites normais. Aumento: 13. 650 vezes. Em B - biópsia obtida após 60 min de reperfusão coronária (proteção miocárdica com cardioplegia cristalóide fria). Corte longitudinal de célula muscular cardíaca, mostrando desagregação e ruptura de miofibrilas. Matriz citoplasmática profundamente alterada por edema, com restos de membrana e algumas cisternas de retículo sarcoplasmático dilatadas. Mitocôndrias com alterações grosseiras, incluindo grandes áreas de rarefação, aumento de volume e desagregação da estrutura. Glicogênio diminuído. Aumento: 17. 850 vezes.

Kottmeier e Wheat<sup>32</sup> estudaram as alterações mitocondriais na circulação extracorpórea. Os seguintes tipos de degeneração foram en-

contrados: perda de densidade da matriz, com fragmentação das cristas; perda dos grânulos densos; degeneração granular; formação de

condrioesferas. Não consideraram o edema mitocondrial como uma forma de degeneração. Cães submetidos a anestesia, toracotomia e canulação apresentaram degeneração mínima das mitocôndrias. Alterações irreversíveis em grande número de mitocôndrias foram encontradas após parada cardíaca anóxica. Apenas 10% das mitocôndrias estavam alteradas com circulação extracorpórea normotérmica.

Uma correlação enzimática desses achados ultra-estruturais foi obtida por Gomes e col.<sup>51</sup>, que encontraram grande redução na atividade da desidrogenase alfa-cetoglutárica e da desidrogenase málica, após 60 min de parada cardíaca anóxica. Jynge e col.<sup>52</sup> demonstraram correlação estreita entre os achados ultra-estruturais, achados funcionais e liberação de creatinoquinase em preparação de coração isolado de rato. Liberação de menos de 60 UI de creatinoquinase em 32 min por grama de coração desidratado foi acompanhada de pobre recuperação funcional e alterações ultra-estruturais mais severas (faixas de contração, edema mitocondrial, fragmentação de miofibrilas, perda de glicogênio).

As alterações ultra-estruturais em parada cardíaca anóxica são pequenas em 30 min e muito severas em 60 min<sup>10,29,53</sup>. Stemmer e col.<sup>54</sup>, em cães submetidos a 2 h de parada cardíaca normotérmica, encontraram severas alterações ultra-estruturais e nenhum cão sobreviveu. Perfusionamento contínua da raiz da aorta com sangue a 15°C, durante a circulação extracorpórea normotérmica, manteve íntegra a ultra-estrutura miocárdica, e todos os cães sobreviveram. Esse grupo de cães apresentou melhores resultados do que os submetidos a circulação extracorpórea normotérmica sem pinçamento aórtico, nos quais alterações ultra-estruturais discretas foram notadas (marginação nuclear, edema de mitocôndrias, perda de densidade da matriz mitocondrial).

A parada cardíaca anóxica afeta principalmente a camada subendocárdica<sup>17</sup>, sendo o músculo subendocárdico do ventrículo esquerdo o mais vulnerável à isquemia<sup>55</sup>.

Laks e col.<sup>56</sup> só estudaram alterações ultra-estruturais, comparando, em cães, proteção miocárdica com solução cardioplégica fria e proteção miocárdica com sangue resfriado. Encontraram, sinais de edema extracelular (aumento dos espaços intercelulares) no grupo perfundido com sangue, enquanto a ultra-estrutura do grupo perfundido com soro fisiológico era essencialmente normal após 2 h de pinçamento aórtico. Este achado ultra-estrutural teve um correspondente bioquímico: a medida da água intramiocárdica foi de  $82,4 \pm 0,5$  ml/100g no grupo perfundido com sangue, contra  $79,9 \pm 0,6$  ml/100g no grupo perfundido com solução cardioplégica ( $p < 0,01$ ).

Biópsias miocárdicas têm sido obtidas no homem durante circulação extracorpórea para estudo das alterações ultra-estruturais com proteção miocárdica<sup>37,43,49,57</sup>.

Cunningham e col.<sup>49</sup> mostraram correlação entre presença de ATP intramiocárdico com os achados ultra-estruturais. Um grupo de pacientes com miocárdio inadequadamente protegido apresentou queda de ATP no final do pinçamento aórtico, que aumentou ao cabo de 30 min de reperfusão. Paralelamente, notaram diminuição da

matriz das mitocôndrias, fragmentação das cristas mitocondriais e edema celular no final do tempo de isquemia. Após 30 min de reperfusão, encontraram maior grau de lesão mitocondrial, marginação da cromatina nuclear, degeneração de miofibrilas e edema celular, indicando grave lesão ultra-estrutural.

Fischer e Barner<sup>37</sup> estudaram a ultra-estrutura miocárdica em 5 pacientes submetidos a parada cardíaca cardioplégica por período de tempo que variou de 66 a 125 min. Colheram biópsias antes do pinçamento aórtico e após 20 min de reperfusão. Encontraram apenas depósitos de glicogênio intramiocárdicos, acreditando ser esta lesão leve e reversível. O estado do glicogênio no homem não serve para avaliar a viabilidade miocárdica, ao contrário do cão, em que a depleção de glicogênio se correlaciona adequadamente com o grau de lesão miocárdica<sup>43</sup>.

Engedal e col.<sup>57</sup> mostraram excelente preservação ultra-estrutural das mitocôndrias após 96 min de pinçamento aórtico e 20 min de reperfusão, em pacientes operados com hipotermia a 30°C e hipotermia cardíaca com soro a 4°C.

#### **Avaliação das lesões ultra-estruturais miocárdicas**

O estudo da ultra-estrutura miocárdica permite avaliar a intensidade do dano sofrido pelo miocárdio durante a isquemia e, conseqüentemente, comparar diversos métodos de proteção miocárdica<sup>40,41,52</sup>.

Para a comparação dos métodos, além de uma análise qualitativa, é necessário que se compare quantitativamente o grau de lesão ultra-estrutural. Kottmeier, e Wheat<sup>32</sup> analisaram de modo quantitativo as lesões mitocondriais encontradas, calculando a porcentagem de formas degeneradas de mitocôndrias nas biópsias obtidas. Jennings e col.<sup>31</sup> usaram método semelhante. Page e McCallister<sup>58</sup> empregaram técnica estereológica para avaliar os volumes dos diversos componentes da célula miocárdica, obtendo diferenças significativas entre corações normais, hipertrofiados e estimulados por tireoxina. Sunamori e col.<sup>18</sup> graduaram de zero a 10 as alterações de membranas e cristas mitocondriais e calcularam a proporção entre grânulos de glicogênio e mitocôndrias, para analisar semiquantitativamente biópsias miocárdicas. Lucas e col.<sup>59</sup> catalogaram os sinais de isquemia miocárdica (presença e severidade de edema mitocondrial, ruptura de mitocôndrias e de miofibrilas depósitos de cálcio intramiocárdicos, faixas de contração, marginação da cromatina nuclear) em discretos, moderados e severos. Pereira e col.<sup>41</sup> graduaram as lesões encontradas (edema mitocondrial, edema extracelular, ruptura de miofibrilas e depleção de glicogênio) em muito leves, leves e intensas. Trump e col.<sup>30</sup> procuraram fazer uma análise muito precisa de micrografias eletrônicas, para classificar estágios de reação celular pós isquemia.

Magee e col.<sup>60</sup> dividiram as lesões ultra-estruturais em leves (edema mitocondrial discreto e ruptura focal de sarcômeros), moderadas (edema mitocondrial moderado, degeneração de miofibrilas) e severas (edema mitocondrial acentuado, ruptura de mitocôndrias, faixas de



contração, desorganização e separação de miofibrilas, marginação intensa da cromatina nuclear) e calcularam a porcentagem de lesões leves, moderadas ou severas existentes em cada grupo de estudo.

Kay e col.<sup>61</sup> fizeram análise ultra-estrutural semiquantitativa de biopsias do ventrículo esquerdo, em cães, usando método que julgamos muito adequado: encontraram correlação entre os achados ultra estruturais e a função ventricular após a isquemia. Analisaram 4 micrografias eletrônicas selecionadas, ao acaso, para cada biópsia, atribuindo nota zero para o tecido normal e nota 10 para o tecido afetado ao máximo. Estudaram 10 índices de alterações ultra-estruturais de isquemia miocárdica, atribuindo-lhes peso igual: edema intracelular, degeneração de mitocôndrias, dilatação do retículo sarcoplasmático ou sistema T, vacuolização citoplasmática, ruptura ou degeneração de miofibrilas, ruptura ou separação dos discos intercalares, marginação severa da cromatina nuclear, ruptura de membrana celular miocárdica, edema intersticial e edema endotelial capilar com formação de bolhas. Schapper e col.<sup>62</sup> usaram computador para calcular o volume de mitocôndrias, material contrátil e citoplasma em biópsias de ventrículo esquerdo, obtidas de 31 pacientes submetidos a troca valvar aórtica. As biopsias foram obtidas antes da parada cardíaca, no fim do período de isquemia e depois de 20 min de reperfusão coronária. Encontraram edema mitocondrial e celular apenas após reperfusão coronária.

### Summary

The authors reviewed the normal myocardial ultrastructure and the changes that occurs in the myocardial working cell after cardiac ischemia and extracorporeal circulation, with a quantitative evaluation of the ultrastructural alterations. It is their opinion that myocardial ultrastructural studies are an excellent method to evaluate myocardial protection during cardiac surgery.

### Referencias

- Hift H. ; Young, W. P. ; Gott, V. L. et al. - Electron microscope studies of human and dog heart biopses. *Circulation*, 24: 955, 1961.
- McNutt, N. S. ; Fawcett, D. W. - Myocardial ultrastructure. In: Langer, G. A; Brady, A. J. - *The Mammalian Myocardium*, Wiley, New York, 1974. p. 1.
- Katz, A. M. - *Physiology of the Heart*. Raven Press, New York, 1977.
- Fawcett, D. W. - *The Cell*. Saunders, Philadelphia, 1966.
- Braunwald, E. ; Ross, J. Jr. ; Sonnenblick, E. H. - Mechanisms of contraction of the normal and failing heart. *N. Engl. J. Med.* 277: 794, 1967.
- Hurst, J. W. - *The Heart, Arteries and Veins*. 4. ed. McGraw-Hill, New York, 1978. p. 57.
- Spotnitz, H. M. ; Sonnenblick, E. H. ; Spiro, D. - Relation of ultrastructure to function in the intact heart: sarcomere structure relative to pressure volume curves of intact left ventricles of dog and cat. *Circ. Res.* 18: 49, 1966.
- Sommer, J. R. ; Johnson, E. A. - Ultrastructure of cardiac muscle. In: Berne, R. M. - *Handbook of Physiology. The Cardiovascular System. Section 2. V. I - The Heart*. American Physiological Society, Bethesda, 1979.
- Katz A. M. - Congestive heart failure: role of altered myocardial cellular control. *N. Engl. J. Med.* 293: 1184, 1975.
- Burdette, W. J. ; Ashford, T. P. - Response on myocardial fine structure to cardiac arrest and hypothermia. *Ann. Surg.* 158: 513, 1963.
- Jennings, R. B. ; Baum, J. H. ; Herdson, P. B. Fine structural changes in myocardial ischemic injury. *Arch. Pathol.* 79: 135, 1965.
- Kloner, R. A. ; Ganote, C. E. ; Whalen, D. A. et al. -Effects of a transient period of ischemia on myocardial cells II. Fine structure during the first few minutes of reflow. *Am. J. Pathol.* 74: 399, 1974.
- Jennings, R. B. ; Ganote, C. E. - Structural changes in myocardium during acute ischemia. *Circ. Res. (Suppl. III)*: 156, 1974.
- Jennings, R. B. ; Ganote, C. E. ; Reimer, K. A. - Ischemic tissue injury. *Am. J. Pathol.* 81: 179, 1975.
- Buja, L. M. ; Levitsky, S. ; Ferrans, U. L. et al. - Acute and chronic effects of normothermic anoxia on canine hearts. Light and electron microscopic evaluation. *Circulation*, 43 (Suppl. 1): 44, 1971.
- Mac Gregor, D. C. ; Wilson, G. J. ; Tanaka, S. et al - Ischemic contracture of the left ventricle. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 70: 945, 1975.
- Iyengar, S. R. K. ; Ramchand, S. ; Charrette, E. J. P. et al. - An experimental study of subendocardial hemorrhagic necrosis after anoxic cardiac arrest. *Ann. Thorac. Surg.* 13: 214, 1972.
- Sunamori, M. ; Trout, R. G. ; Kaye, M. P. et al - Quantitative evaluation of myocardial ultrastructure following hypothermic arrest. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 76: 518, 1978.
- Lucas, S. K. ; Gardner, T. J. ; Elmer, E. B. et al. - Comparison of the effects of left ventricular distention during cardioplegic induced ischemic arrest ant ventricular fibrillation. *Circulation*, 62 (Suppl. I): 42, 1980.
- Whalen, D. A. ; Hamilton, D. G. ; Ganote, C. E. et al - Effects of a transient period of ischemia on myocardial cell. *Am. J. Pathol.* 74: 381 1974.
- Leaf, A. - Cell swelling: a factor in ischemic tissue injury. *Circulation*, 48: 455 1973.
- Shen, A. C. ; Jennings, R. B. - Kinetics of calcium accumulation in acute myocardial injury. *Am. J. Pathol.* 67: 441, 1972.
- Jennings R. B. - Myocardial ischemia-observation definitions and speculations. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1: 345, 1970. (Editorial).
- Powell, J. W. ; Jr. ; Bona, D. R. ; Flores J. - Effects of hyperosmotic mannitol in reducing ischemic cell swelling and minimizing myocardial necrosis. *Circulation*, 53 (Suppl. 1): 1, 1976.
- Baroldi, G. ; Milan, J. D. ; Wukasch, D. C. et al. - Myocardial cell damage in "stone hearts". *J. Mol. Cell. Cardiol.* 6: 395, 1974.
- Hearse, D. J. ; Garlick, P. B. ; Humphrey, S. M. - Ischemic contracture of the myocardium. Mechanisms and prevention. *Am. J. Cardiol.* 39: 986, 1977.
- Lager, G. A. - The structure and function on the myocardial cell surface. *Am. J. Physiol.* 235: 461, 1978.
- Shen, A. C. ; Jennings, R. B. - Myocardial calcium and magnesium in acute ischemic injury. *Am. Pathol.* 67: 417, 1972.
- Burdette, W. J. ; Al-Shamma, A. - Changes in high energy phosphates during cardiac arrest. *Arch. Surg.* 85: 40, 1962.
- Trump, B. F. ; Mergner W. J. ; Khang, M. W. et al. - Studies on the subcellular pathophysiology of ischemia. *Circulation*, 53 (Suppl. I): 17, 1976.
- Jennings, R. B. ; Henderson, P. B. ; Sommers, H. M. - Structural and functional abnormalities in mitochondria isolated from ischemic dog myocardium. *Lab. Invest.* 20: 548, 1969.
- Kottmeier, C. A. ; Wheat, M. W. - Ultrastructural evaluation of myocardial preservation during CPS: the mitochondrion. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 52: 786, 1966.
- Kane, J. G. ; Murphy, M. L. Bisset, J. K. et al. - Mitochondria function, oxygen extraction, epicardial. S-T segment changes and tritiated digoxin distribution after reperfusion of ischemic myocardium. *Am. J. Cardiol.* 36: 218, 1975.
- Wood, J. M. ; Hanley, H. G. ; Entman, M. L. et al. - Biochemical and morphological correlates of acute experimental ischemia in the dog. IV- Energy mechanisms during very early ischemia. *Circ. Res.* 44: 52, 1979.
- Lazar, H. L. ; Buckberg, G. D. ; Manganaro, A. J. et al. - Reversal of ischemic damage with secondary blood cardioplegia. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 78: 688, 1979.
- Williamson, J. R. ; Schaffer, S. W. ; Ford C. et al. - Contribution of tissue acidosis to ischemic injury in

- the perfused rat heart. I. The cellular basis of ischemia and infarction. *Circulation*, 53 (Suppl. I): 3, 1976.
37. Fischer, V. W. ; Barner, H. B. - Ultrastructural integrity of human ventricular myocardium following cardioplegic arrest. *Ann. Thorac. Surg.* 27: 49, 1979.
  38. Jellinek, M. ; Stamdeven, J. W. ; Mens, L. J. - Cold blood potassium cardioplegia. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 82: 26, 1981.
  39. Takamoto, S. ; Levine, F. H. ; La Raia, P. J. et al. - Comparison of single dose and multidose crystalloid and blood potassium cardioplegia during prolonged hypothermic aortic occlusion. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 79: 19, 1980.
  40. Cerra, F. B. ; Lajos, T. Z. ; Montes, M. et al. - Structural functional correlates of reversible myocardial anoxia. *J. Surg. Res.* 16: 140, 1974.
  41. Pereira, S. N. ; Ribeiro, C. T. ; Tabone, E. J. et al. - Proteção do miocárdio em cirurgia cardíaca. Estudo experimental. *Arq. Bras. Cardiol.* 36: 391, 1981.
  42. Roberts, A. J. Abel, R. M. ; Alonso, D. R. et al. - Advantages of hypothermic potassium cardioplegia and superiority of continuous versus intermittent aortic cross-clamping. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 79: 44, 1980.
  43. Schapper, W. ; Schapper, J. ; Palmowski, J. et al. - Ischemia tolerance following cardioplegic arrest in human patients and in experimental animals. *J. Cardiovasc. Surg. (Torino)* 16: 268, 1975.
  44. Lev, M. ; Birkner, M. L. ; Idriss, F. S. et al. - Extracorporeal circulation effects on dog's heart. Ultrastructure study. *Arch. Pathol.* 79: 257, 1965.
  45. Keen, G. ; Dowlatsahi, K. - The effects of circulatory arrest during profound hypothermia upon human myocardial fine structure. *Cardiovasc. Res.* 4: 348, 1970.
  46. Albert, H. M. ; Kattine, A. ; Glass, A. B. et al. - Electron microscopy of cardiac muscle during and after cold cardioplegia. *Circulation*, 24: 875, 1961.
  47. Bahr, G. R. ; Jennings, R. B. - Ultrastructure of normal and asphyxial myocardium of the dog. *Lab. Invest.* 10: 548, 1961.
  48. Braimbridge, M. V. ; Niles, N. R. - Left ventricular drill biopsy. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 47: 685, 1964.
  49. Cunningham, J. N. ; Adams, P. X. ; Knopp, E. A. et al. - Preservation of ATP, ultrastructure and ventricular function after aortic cross-clamping and reperfusion. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 78: 708, 1979.
  50. Heydorn, W. H. ; Moores, W. Y. ; Mack, J. et al. - The importance of hyperkalemia in a cold perfusion solution: a correlative study examining myocardial function, metabolism, tissue gases, and substrates. *Ann. Thorac. Surg.* 28: 281, 1979.
  51. Gornes, O. M. ; Pedroso, F. I. ; Pereira, S. N. et al. - Mitochondrial enzymatic alterations produced in the myocardium by anoxic cardiac arrest. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 67: 649, 1974.
  52. Jynge, P. ; Hearse, D. J. ; De Letris, J. et al. - Protection of the ischemic myocardium. Ultrastructure enzymatic and functional assessment of the efficacy of various cardioplegic infusates. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 76: 2, 1978.
  53. Stemmer, E. A. ; McCart, P. ; Stanton, W. W. et al. - Functional and structural alterations in the myocardium during aortic cross-clamping. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 66: 754, 1973.
  54. Stemmer, E. A. ; Joy, I. ; Aronow, W. S. - Preservation of myocardial ultrastructure. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 70: 666, 1975.
  55. Buckberg, G. D. - Left ventricular subendocardial necrosis. *Ann. Thorac. Surg.* 24: 379, 1977.
  56. Laks, H. ; Barner, H. B. ; Standeven, J. W. et al. - Myocardial protection by intermittent perfusion with cardioplegic solution versus intermittent coronary perfusion with cold blood. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 76: 158, 1978.
  57. Engedal, H. ; Skagselt, E. ; Saetersdal, T. S. et al. - Cardiac hypothermia evaluated by ultrastructural studies in man. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 75: 548, 1978.
  58. Page, E. ; McCallister, L. P. - Quantitative electron microscopic description of heart muscle cells. Application to normal, hypertrophied and thyroxin-stimulated heart. *Am. J. Cardiol.* 31: 172, 1973.
  59. Lucas, S. K. ; Gardner, T. J. ; Flaherty, J. T. et al. - Beneficial effects of mannitol administration during reperfusion after ischemic arrest. *Circulation*, 62 (Suppl. I): 34, 1980.
  60. Magee, P. G. ; Gardner, T. J. ; Flaherty, J. T. et al. - Improved myocardial protection with propranolol during induced ischemia. *Circulation*, 62 (Suppl. I): 49, 1980.
  61. Kay, H. R. - Levine, F. H. ; Fallon, J. T. et al. - Effects of cross-clamping time, temperature and cardioplegic agents on myocardial function after induced arrest. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 76: 590, 1979.
  62. Schapper, J. ; Schwarz, F. ; Kittstein, H. et al. - The effects of global ischemia and reperfusion on human myocardium: quantitative evaluation by electron microscopy morphometry. *Ann. Thorac. Surg.* 33: 116, 1982.