

BIOPSIA ENDOMIOCÁRDICA DO VENTRÍCULO DIREITO. SIGNIFICADO DAS ALTERAÇÕES ULTRA-ESTRUTURAIS NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA

MARIA DE LOURDES HIGUCHI, EDGARD AUGUSTO LOPES, ANTONIO CARLOS PEREIRA BARRETTO,
NOEDIR STOLF, GIOVANI BELLOTTI, GERALDO VERGINELLI, FULVIO PILEGGI

Foi feita análise ultramicroscópica de fragmentos de ventrículo direito, obtidos com o biótomo de Schultz-Cave, de 30 pacientes portadores de doença de Chagas (17 do sexo feminino e 13 do masculino, com idade média de 34 anos). Os pacientes foram distribuídos em três grupos: grupo I, constituído de 18 pacientes assintomáticos com eletrocardiograma (ECG) e radiografia (RX) normais; grupo II, constituído de 7 pacientes assintomáticos com ECG anormal e RX do coração normal o grupo III, constituído de 5 pacientes com sinais e sintomas de insuficiência cardíaca, ECG anormal e cardiomegalia.

Os fragmentos foram analisados de forma qualitativa e semiquantitativa. As alterações ultra-estruturais foram qualitativamente semelhantes. Quantitativamente, a alteração nuclear foi a que mostrou maior relação com os grupos clínicos, porém, não permitiu discriminação entre os pacientes. As alterações das mitocôndrias, do sistema sarcotubular, do sarcoplasma e dos miofilamentos pareceram representar aspectos degenerativos da fibra, de caráter inespecífico e não relacionados com o estágio clínico da doença. Várias das alterações ultra-estruturais observadas (bandas de contração e afastamento das membranas dos discos intercalares) foram atribuídas a artefato da técnica, ocorrendo, provavelmente, no momento da retirada do fragmento.

Conclui-se que o estudo da ultra-estrutura miocárdica evidenciou alterações não específicas para a doença e não forneceu substrato morfológico capaz de caracterizar o estágio clínico da doença.

A biopsia endomiocárdica vem sendo progressivamente realizada em diversos centros, dada sua importante contribuição para o conhecimento de aspectos morfológicos de doenças do músculo cardíaco¹⁻⁴. Embora introduzida em 1962, por Sakakibara e Konno⁵, trabalhos recentes mostram que o procedimento apresenta baixos índices de complicações⁶⁻⁹.

A maioria dos trabalhos sobre microscopia eletrônica de fragmentos endomiocárdicos, obtidos em diferentes doenças cardíacas, tem demonstrado certa inespecificidade nas alterações ultra-estruturais¹⁰⁻¹² e controvérsias quanto a possíveis correlações entre achados morfológicos e o estágio da doença^{13,14}.

Contudo, recentemente, Palacios-Prü e col.¹⁵ observaram correlação, entre as alterações ultramicroscópicas de fragmentos endomiocárdicos e o estágio clínico da cardiomiopatia chagásica crônica. Além disso, notaram que determinadas caracterís-

ticas morfológicas poderiam diferenciá-la de outras cardiomiopatias dilatadas.

No presente trabalho, apresentamos nossa experiência com a microscopia eletrônica de fragmentos obtidos por biopsia endomiocárdica, em um grupo de pacientes portadores de cardiomiopatia chagásica crônica.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados 30 pacientes, sendo 17 do sexo feminino e 13 do masculino, com idade variando de 21 a 53 anos (média 34 anos). Em todos, o diagnóstico de doença de Chagas foi confirmado, utilizando-se as reações de fixação do complemento (Machado-Guerreiro) e de imunofluorescência indireta para o *Trypanosoma cruzi*.

De acordo com as características clínicas, eletrocardiográficas e radiológicas, os pacientes foram distribuídos em 3 grupos: Grupo I, constituído de

18 pacientes assintomáticos, com traçado eletrocardiográfico (ECG) e imagem radiológica do coração (RX) normais; Grupo II - constituído de 7 pacientes assintomáticos, com ECG anormal e RX normal e Grupo III, constituído de 5 pacientes com sintomas e sinais de insuficiência cardíaca, ECG anormal e área cardíaca aumentada.

Após consentimento, os pacientes foram submetidos à biopsia endomiocárdica da parede septal do ventrículo direito, utilizando-se a pinça de Schultz-Cave, de acordo com o método proposto por Mason⁸.

Os fragmentos endomiocárdicos foram preparados para microscopia eletrônica. Inicialmente foram recortados em frações mínimas, com no máximo 0,1mm de espessura. A seguir, foram fixados em glutaraldeído a 3% por período de 3 horas, lavados em tetróxido de ósmio a 1% com 6,5% de sacarose, permanecendo nesta solução durante duas horas. Em seguida, foram lavados com solução salina e colocados em solução de acetato de uranila a 0,5% com sacarose sob temperatura de 4.°C durante 12 horas. A desidratação do fragmento foi realizada com álcool etílico a partir de uma concentração de 50% até o álcool absoluto. A seguir, os fragmentos foram transferidos para soluções contendo, sucessivamente óxido de propileno, óxido de propileno e resina de inclusão e, finalmente, resina de inclusão (Araldite FC 4205, DSAO, DMP-30 e DBP).

Foram, então, obtidos cortes finos e semifinos em ultramicrotomo MT-28. Os cortes semifinos, corados pelo azul II e pelo azul de metileno (mistura 1:1) serviram para a seleção dos blocos para a obtenção dos cortes finos. Estes foram corados com uranila e com acetato de chumbo e examinados em microscópio eletrônico Philips 301.

Para a graduação das alterações observadas nas diversas organelas, foram considerados os seguintes critérios semiquantitativos: grau 0 - ausência de alterações, grau 1 - alterações discretas; grau 2 - moderadas e grau 3 - intensas.

RESULTADOS

Os fragmentos dos três grupos clínicos I, II e III mostraram alterações ultra-estruturais qualitativamente semelhantes nas diferentes organelas analisadas.

Núcleo - Em 41%, 43% e 40% dos pacientes, respectivamente, dos grupos I, II e III, foi notada discreta marginalização e aglomeração (grau 1) da cromatina nuclear foi de grau 2. Em apenas 20% dos pacientes dos grupos II e III, a alteração da cromatina nuclear foi de grau 2. Em apenas 20% dos pacientes do grupo III a marginalização foi considerada como intensa (grau 3) (fig. 1).

Mitocôndria - Embora de forma normal, na maioria dos pacientes, notou-se aumento do volume mitocondrial em um paciente do grupo I e diminuição em dois casos (um do grupo II e um do grupo III). Por

outro lado, foi notado aumento do número de mitocôndrias, principalmente ao redor do núcleo (fig. 1) e entre as miofibrilas (fig. 2), em 9 pacientes. Em 18% dos casos do grupo I, este aumento foi discreto (grau 1) e, em 5%, foi moderado (grau 2). No grupo II, o aumento foi discreto e intenso (grau 3) em 29 e 14% dos casos, respectivamente. No grupo III, 40% dos casos mostraram aumento moderado (grau

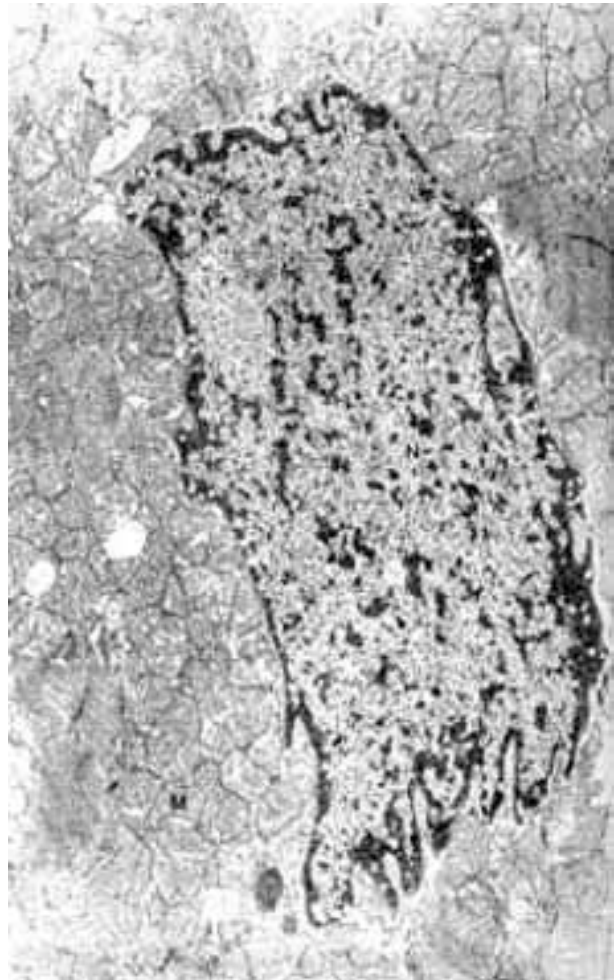


Fig. 1 - Ultramicrografia mostrando núcleo grande, cromatina aglomerada na periferia e mitocôndrias, de caso do grupo II. N = núcleo; M = mitocôndria. Aumento 13.500x.

2). Aspectos degenerativos das mitocôndrias, representados por lise de cristas e rarefação da matriz (fig. 2 e 4) foram evidenciados, em grau discreto, em 76% dos casos de grupo II e 60% do grupo III; em grau moderado em 6% do grupo I e 29% do grupo II e somente em 1 caso do grupo III (14%) com grau intenso.

Miofibrilas - Áreas de hiperconcentração dos miofilamentos (bandas de contração) (fig. 5) foram observadas em grau 1 em 82%, 57% e 50% dos grupos I, II e III, respectivamente e, em grau 2, em 12% e 10% dos grupos II e III, respectivamente. Áreas claras de aparente lise dos miofilamentos foram notadas, principalmente, ao lado das áreas de banda de contração (fig. 5), sendo de grau 1 em

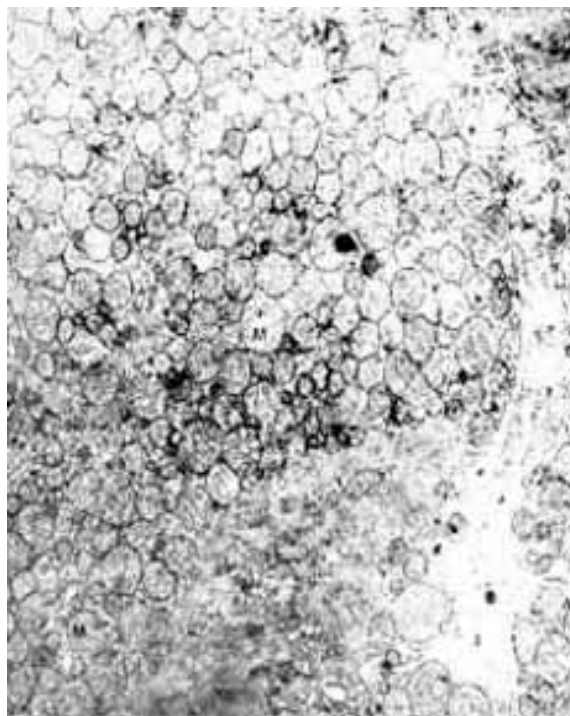


Fig. 2 - Ultramicrografia mostrando mitocôndrias aumentadas em número (mitocondriose, com áreas focais de lise de cristas e rarefação de matriz de caso do grupo II. M = mitocôndria; I - interstício. Aumento 14.000x.

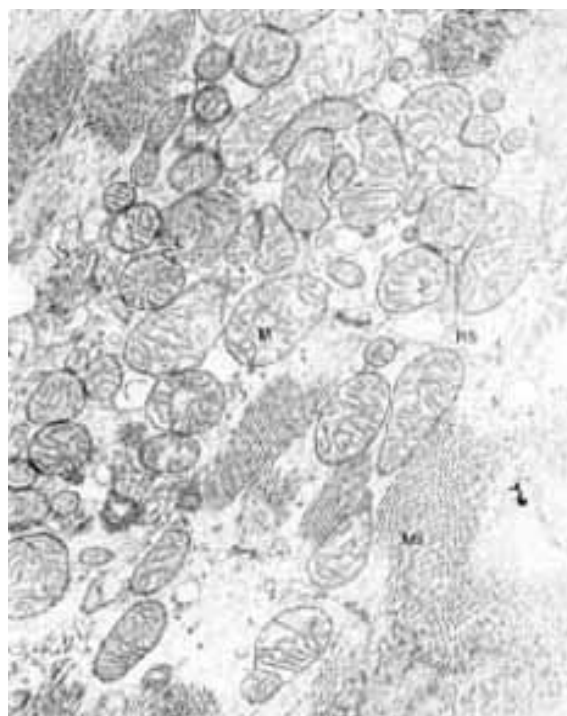


Fig. 4 - Ultramicrografia revelando mitocôndrias com áreas de lise de cristas e rarefação de matriz, além de focos de lise de miofilamentos e dilatação de retículo sarcoplasmático, de caso do grupo I. M = mitocôndrias; Mi = miofilamentos; L = lipofucsina; RS = retículo sarcoplasmático. Aumento 29.400x.

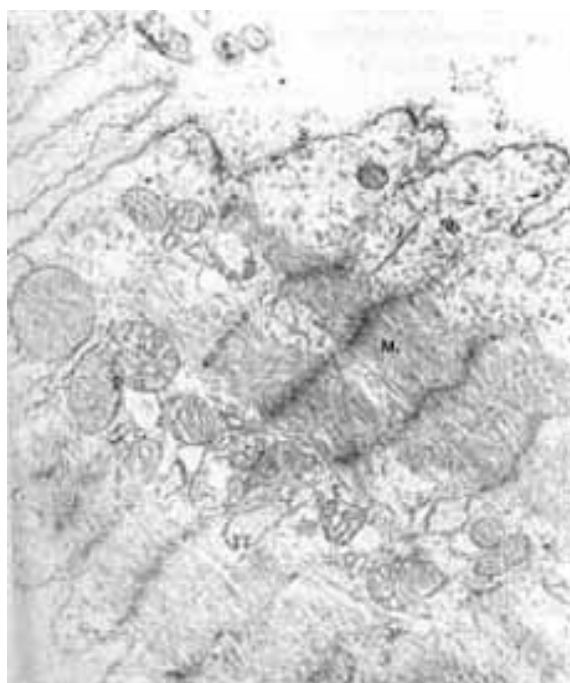


Fig. 3 - Ultramicrografia exibindo áreas claras subsarcolemmais, dilatação dos túbulos T e sarcolema normal de caso do grupo I. S = sarcolema; SS = espaço subsarcolemal; Mi = miofilamentos; TT = túbulo T. Aumento 23.100x.

24%, 29% e 40% dos casos dos grupos , II e III, respectivamente. Somente, em 20% dos pacientes do

grupo III, as áreas de lise foram graduadas como moderadas (grau 2).

Sarcolema - Foi considerado normal em todos os casos.

Retículo sarcoplasmático - Notou-se discreta ou moderada dilatação desta estrutura (fig. 4) em, praticamente, todos os casos, com exceção de 2 pacientes do grupo 1, que apresentavam retículo sarcoplasmático normal.

Túbulo T - Observou-se discreta dilatação (fig. 3) em 29%, 57% e 40% dos casos dos grupos I, II e III, respectivamente; moderada dilatação em 12% do grupo I e intensa dilatação em 1 caso do grupo III.

Lipofucsina - Foi notada em 59%, 86% e 100% dos casos dos grupos I, II e M, respectivamente. Embora mais freqüente no grupo III, sua intensidade foi maior (grau 2) em 12% e 14% dos casos dos grupos I e II, respectivamente.

Gordura - Presença de gordura foi observada em 86% no grupo II e em 60% do grupo III, sendo considerada como intensa (grau 3) em apenas 2 casos.

Disco intercalar - Ao nível da “fascia adherens”, evidenciou-se separação das membranas do disco intercalar (fig. 5), de grau 1, em 18% e 20% dos casos dos grupos I e II. Alterações moderadas ou intensas só foram observadas em 2 pacientes do grupo II.

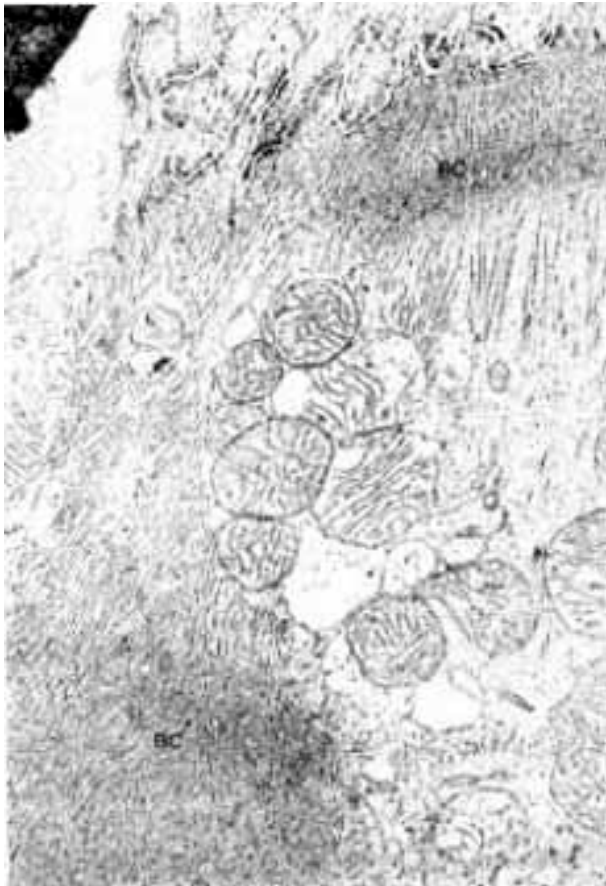


Fig. 5 - Ultramicrografia evidenciando alterações dependentes de artefatos: bandas de contração ao lado de áreas de lise e disco intercalar com separação das membranas ao nível da fascia adherens. BC - banda de contração; FA - fascia adherens. Aumento 29.400x.

. **Sarcoplasma** - Ocasionalmente, foram notadas áreas claras subsarcolemas (fig. 3) em 9 casos dos grupos I e em 1 caso do grupo II e III.

Capilares - Áreas focais de tumefação do endotélio foram observadas em quase todos os casos.

Finalmente, devemos ressaltar que as alterações observadas nas diversas organelas variaram, de forma importante, numa mesma área bem como conforme as áreas do mesmo fragmento.

COMENTÁRIOS

No presente trabalho, a ultra-estrutura do miocárdio de portadores da doença de Chagas foi estudada através de fragmentos endomiocárdicos obtidos por biópsia. O escopo principal foi o de analisar e correlacionar achados morfológicos e o estágio clínico da doença.

Nos diversos componentes da fibra cardíaca, foi notado comportamento qualitativamente semelhante nos 3 grupos de pacientes, com discretas diferenças quantitativas em algumas organelas. Assim, em nosso material, as variações morfológicas não permitiram reconhecer o estágio clínico e laboratorial dos pacientes. Apesar disso, a alteração

do núcleo foi a que mostrou maior relação com os grupos clínicos. A progressiva modificação da cromatina nuclear - aglomeração e marginalização (sinais indiretos de hipertrofia nuclear) - esteve, na maioria dos casos, relacionada com a gravidade da doença. Mesmo assim, em 1 caso do grupo II e do grupo III, foram notados núcleos de aspecto normal. Uma possível explicação para esse achado é que as alterações observadas apresentaram variações qualitativas e quantitativas nas diferentes áreas. Dessa forma, as alterações nucleares, quando presentes, parecem constituir dado inespecífico, que não permite discriminação entre os pacientes.

Várias das alterações ultra-estruturais observadas parecem ser devidas a artefatos da técnica, ocorridos, provavelmente, no momento da retirada do fragmento endomiocárdico. As bandas de contração, notadas na grande maioria dos pacientes, podem representar estados de hipercontração dos sarcômeros^{17,18}. Como conseqüência, as zonas entre as bandas de contração, ao permanecerem em estado de estiramento, também ocasionariam o aparecimento dos focos de lise. Essa ocorrência, pelo menos em parte, explicaria a presença de lise dos miofilamentos, próximos ou não, aos discos intercalares.

O afastamento das membranas dos discos intercalares, descrito na doença de Chagas por Tafuri¹⁹, como deiscência do disco intercalar, também pareceu-nos, pelo menos em alguns casos, como conseqüente a artefatos decorrente da hipercontração de sarcômeros adjacentes. De fato, foi freqüente a observação de bandas de contração de ambos os lados do disco intercalar (fig. 5).

As alterações ultra-estruturais das mitocôndrias, do sistema sarcotubular, do sarcoplasma e dos miofilamentos (fig. 3 e 4) parecem representar aspectos degenerativos da fibra cardíaca, de caráter inespecífico e não relacionados com o estágio clínico da doença de Chagas.

Por outro lado, a discreta tumefação das células endoteliais, sem trombose, constitui a única alteração da microcirculação. Esse achado, também observado em trabalho experimental²¹, é discordante do clássico estudo de Mac Clure e Poche²⁰ que notaram trombose vascular na cardiopatia chagásica aguda do camundongo. Assim, parece que a trombose vascular não estaria implicada como fator patogênico²⁰ na fibrose intersticial da cardiopatia chagásica crônica.

Da mesma forma, nossos trabalhos não confirmam os de Palacios-Prü e col.¹⁵ que consideraram a análise ultramicroscópica, elemento importante para a avaliação da gravidade clínica da cardiomiopatia chagásica crônica.

Em conclusão, nossos resultados sugerem que as alterações ultramicroscópicas observadas na cardiomiopatia chagásica crônica não são específicas da doença, sendo notadas em outras cardiomiopatias^{9,12,14} e parecem não fornecer substrato morfológico para caracterizar o estágio clínico da doença.

SUMMARY

The results from ultramicroscopic study of fragments of the right ventricle are presented. The Cave-Schultz biptome was employed in 30 patients with Chagas' disease (17 females and 13 males) with the mean age of 34 years. The patients were distributed in three groups based on their clinical situation and electrocardiographic and radiologic patterns: group I, with 18 asymptomatic patients with normal ECG and roentgenograms; group II, with seven asymptomatic patients with abnormal ECG and normal roentgenograms of the heart; and group III, with five patients with congestive heart failure, abnormal ECG and cardiomegaly in the chest roentgenograms.

The fragments were analyzed qualitatively and semiquantitatively. The study shows that the ultrastructural alterations were qualitatively similar in the three groups. Quantitative comparisons of nuclear alterations showed better correlation with the clinical state, but do not permit discrimination of the patients. The alterations of the mitochondria, sarcotubular system, sarcoplasma myofilaments appeared as inespecific degeneration of the myocardial fiber and did not correlate with the clinical state. Many of the ultrastructural alterations, such as the contraction band and the intercalar disc membranes were thought to be artifacts, related to the biopsy.

In conclusion, the ultrastructural study in chronic Chagas' disease shows inespecific alterations and does not correlate with the clinical state.

REFERÊNCIAS:

1. Sekiguchi, M.; Konno, S. - Diagnosis and classification of primary myocardial disease with the aid of endomyocardial biopsy. *Jap. Circulat. J.* 30: 737, 1971.
2. Olsen, E. G. J. - Endomyocardial biopsies: is pathological examination of use? *Br. Heart J.* 39: 349, 1977.
3. Nippoldt, T. B. et al. - Right ventricular endomyocardial biopsy. Clinicopathologic correlates in 100 consecutive patients. *Mayo Clin. Proc.* 57: 407, 1982.
4. Parrillo, J. E. et al. - The results of transvenous endomyocardial biopsy can frequently be used to diagnose myocardial disease in patients with idiopathic heart failure. *Circulation*, 69 (suppl. 1) 93, 1984.
5. Sakakibara, S.; Konno, S. - Endomyocardial biopsy. *Jan. Heart J.* 3: 537, 1962.
6. Sommers, L. et al. - Endomyocardial biopsy in diagnosis of cardiomyopathies. *Br. Heart J.* 33: 822, 1971.
7. MacKay, E. H. et al. - Critical assessment of diagnostic value of endomyocardial biopsy. Assessment of cardiac biopsy. *Dr. Heart J.* 40: 69, 1978.
8. Mason, J. N. - Techniques for right and left ventricular endomyocardial biopsy. *Am. J. Cardiol.* 41: 887, 1978.
9. Kawai, C.; Matsumori, A. - Myocardial biopsy. *Ann. Rev. Med.* 31: 139, 1980.
10. Knierem, H. J. - Electron microscopic findings in congestive cardiomyopathy. In: Kaltenbach, M. et al. - *Cardiomyopathy and Myocardial Biopsy*. Springer-Verlag, Berlin, 1978. p. 71.
11. Kunkel, B. et al. - Ultrastructural evaluation in early and advanced congestive cardiomyopathies. In: Kaltenbach, M. et al. - *Cardiomyopathy and Myocardial Biopsy*. Springer-Verlag, Berlin, 1978. p. 87.
12. Kuhn, H. et al. - Endomyocardial catheter biopsy in heart disease of unknown etiology. In: Kaltenbach, M. et al. - *Cardiomyopathy and Myocardial Biopsy*. Springer-Verlag, Berlin, 1978. p. 121.
13. Breitharat, C. et al. - Prognostic significance of endomyocardial biopsy in patients with congestive cardiomyopathy. In: Kaltenbach, M. et al. - *Cardiomyopathy and Myocardial Biopsy*. Springer-Verlag, Berlin, 1978. p. 258.
14. crônica da doença de Chagas. São Paulo, 1980. (Tese, Universidade de São Paulo).
15. Adomian, G. E. et al. - The Incidence and significance of contraction bands in endomyocardial biopsies from normal human hearts. *Am. Heart J.* 95: 348, 1978.
16. Olmesdahl, P. J. et al. - Ultrastructural artifacts in biopsied normal myocardium and their relevance to myocardial biopsy in man. *Thorax*, 34: 82, 1979.
17. Tafuri, W. L. - Alterações ultra-estruturais dos componentes muscular, intersticial e nervoso do coração, esôfago e intestinos na doença de Chagas experimental e humane. Belo Horizonte, 1974. (Tese).
18. MacClure, E.; Poche, R. - Die experimentelle Chagas myocarditis der weissen maus im elektronenmikroskopischen Bild. *Virchows Arch. Path. Anat.* 333: 405, 1960.
19. Lopes, E. A. et al. - Ultrastructural aspects of acute experimental Chagas' disease in the guinea-pig. *Arq. Bras. Cardiol.* 22: 161, 1969.