

A MICROCIRCULAÇÃO CORONÁRIA NA REPERFUSÃO MIOCÁRDICA. O FENÔMENO DA NÃO REPERFUSÃO

PAULO AFONSO RIBEIRO JORGE, HERALDO V CURTI, KONRANDIN METZE
Campinas, SP

Objetivo - Estudo da ultraestrutura dos capilares do coração, na reperfusão que sucede ao infarto do miocárdio.

Material e Métodos - Cinco cães de ambos os sexos, pesando de 12 a 17,5 kg, anestesiados com pentobarbital, na dose de 30 mg/kg, de peso e ventilados com ar atmosférico, tiveram aberto o tórax e a artéria descendente anterior (DA) isolada, antes da emergência dos ramos septais. As pressões de aorta e átrio direito, eletrocardiograma e o fluxo coronário foram medidos para análise da relação pressão fluxo, objetivo de outro estudo. A DA foi ocluída por 90 min. após o que, procedeu-se à reperfusão por 20 min. Imediatamente, a DA foi canulada, injetou-se Nankin, o coração retirado, colocado em salina gelada, e em seguida fatiado, retirando-se fragmentos para estudo à microscopia eletrônica, na área marcada pelo nankin, desde o endocárdio até o epicárdio. Foi retirado um fragmento da região dorsal do coração, para estudo controle. As fatias do coração foram incubadas com TTC a 1%, a 37°C, durante 10 min.

Resultados - Na área infartada observaram-se alterações dos capilares, com edema da célula endotelial e desaparecimento das vesículas de pinocitose. Verificou-se a presença de blebs, hemácias e neutrófilos no volume vascular. Os miócitos apresentavam desarranjo e ruptura dos miofilamentos, critólise e ruptura da membrana mitocondrial com intenso edema celular. No mesocárdio, próximo à área de não reperfusão, observaram-se capilares, com grau de lesão semelhante aos da área infartada. Os miócitos, entretanto, mostraram-se pouco alterados.

Conclusão - O comprometimento da microcirculação durante reperfusão representa o

THE CORONARY MICROVESSELS IN MYOCARDIAL REPERFUSION. THE NOW REFLOW PHENOMENON

Purpose - The study of the ultrastructural features of the coronary microvessels in postischemic reperfusion.

Material and Methods - Five mongrel dogs of either sex, weighing 2 to 17 kg were studied. Each dog was anesthetized with 30 mg. of pentobarbital and ventilated with room air. A thoracotomy was done and the left descendent coronary artery was isolated. Aorta and right atria pressures, electrocardiogram and coronary blood flow was measured. After 90 minutes of coronary occlusion and 20 minutes of reperfusion carbon black was injected into the anterior descending coronary artery to identify the area of impaired perfusion. The heart was excised and placed in a ice-cold saline. The left ventricle was cut transversely in six slices of 1 cm thickness parallel to the atrioventricular sulcus. Tissue specimens were taken from the subendocardial, mid-myocardial (in the non reperfused area) subepicardial and control layers for electron microscopic examination. Each slice was then incubated in a 1% solution of triphenyltetrazolium chloride (TTC) at 37°C for 10 minutes.

Results - The infarcted areas showed widespread tissue damage with relaxed myofibrils cellular edema, swollen mitochondria with fractured cristae and nuclear changes. The vascular endothelium demonstrated severe injury with edema, cytoplasmic clearing, loss of pinocytotic vesicles, nuclear changes, formation of blebs into the vascular lumen and intravascular neutrophil. In the mid-myocardial layer, near the non reperfused vessels, a striking contrast was observed between the vessel and myocardium cells patterns. The usual picture was a severe vascular damage without myocyte injury.

Conclusion - This study showed that prominent capillary damage with coagulation

substrato anátomo-patológico da redução da reserva circulatória coronária, observada nas mesmas condições de estudo. Salienta-se a existência de áreas de não reperfusão, na presença de miócitos viáveis.

Palavras-chave - lesão capilar, fenômeno de não reperfusão, infarto do miocárdio.

necrosis was the morphologic pattern observed in areas of myocardial infarction. In the mid-myocardium, near the non reperfused vessel, severe capillary damage was found in areas of preserved myocytes. Obstruction of flow at the capillary level, correlates well with the decrease of the coronary flow reserve observed during the post-ischemic reperfusion.

Key words capillary damage, no-reflow phenomenon, myocardial infarction.

Arq Bras Cardiol 56/6: 471-476 Junho 1991

O estudo da hemodinâmica coronária, durante a reperfusão que sucede ao infarto do miocárdio, revela diminuição da reserva circulatória e aumento da resistência ao fluxo sanguíneo local. A diminuição da reserva circulatória coronária teria início aos 15-29 min de reperfusão, progredindo até 4 h, quando permaneceria estável¹⁻³.

Discutem-se a causa e os mecanismos responsáveis pelo comprometimento da circulação coronária, durante a reperfusão. Aparentemente, a resistência ao fluxo sanguíneo coronário, estaria situado na microcirculação. As células endoteliais capilares, sofreriam graves alterações morfológicas e funcionais durante o processo de reperfusão, o que limitaria o fluxo sanguíneo local^{4,5}. De outro lado, discute-se se as lesões da microcirculação seriam restritas à área de necrose, ou se ocorreriam também, na área peri-infarto, de músculo viável. Nesta última hipótese, a intervenção farmacológica, preservando os capilares sanguíneos, permitiria a perfusão de tecido miocárdico ainda viável, aumentando a extensão de músculo salvo pela reperfusão.

Estudamos a morfologia dos pequenos vasos e capilares intra-miocárdicos, através da microscopia eletrônica, na reperfusão que sucede ao infarto do miocárdio, com dois objetivos principais: 1. caracterizar um substrato morfológico para a redução de fluxo coronário durante a reperfusão; 2. comparar a magnitude das lesões capilares com as alterações das células contráteis, na transição do tecido não reperfundido.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados 5 cães, com peso entre 12,0 e 17,5 kg, anestesiados com pentobarbital na dose de 30 mg/kg de peso e mantidos sob respiração controlada.

Através dos vasos femorais, foram introduzidos cateteres para registro das pressões de aorta e átrio direito, utilizando-se transdutores de pressão, Siemens-Elema AB e polígrafo da Mingograf, modelo 804.

Aberto o tórax, foi rebatido o pericárdio e dissecada a artéria descendente anterior (D A), onde foi posicionado um probe para medida do fluxo coronariano, antes da emergência dos ramos perfurantes. O fluxo, pulsátil, foi medido através de fluxômetro Caroline Medical Electronics, modelos 501D. Logo abaixo do probe, foi passado um fio que permitia a oclusão do vaso. Após estabilização dos parâmetros hemodinâmicos o vaso foi ocluído por 90 min. Em seguida, procedeu-se a reperfusão por 20 min.

Imediatamente após o estudo funcional, que representou motivo de outra publicação, foi canulada a DA, logo abaixo do ponto de oclusão inicial e injetada tinta nankin, manualmente, a uma pressão que permitisse a visualização dos pequenos vasos, sem provocar extravasamento, com o objetivo de destacar os vasos reperfundidos. Em seguida, o coração foi retirado, mergulhado em solução de salina gelada, e o ventrículo esquerdo fatiado, revelando os vasos reperfurados. Orientado pela distribuição do corante, foram retirados fragmentos para estudo à microscopia eletrônica, desde o endocárdio até o epicárdio, assim como, um fragmento da região dorsal do ventrículo esquerdo, que serviu como controle. O processamento dos fragmentos para microscopia eletrônica seguiu a rotina do laboratório, fixando-se os fragmentos em Kanowsky e tetróxido de ósmio a 1%. Após, foram desidratados em soluções de acetona e embebidas em analocite. As secções foram coradas em uranila examinadas em microscópio eletrônico.

Em seguida as fatias de miocárdio foram incubadas com cloreto de trifetil tetrazólio (TTC) à 1%, durante 10 min à temperatura de 37°C. Foram examinados fragmentos de cinco corações.

RESULTADOS

Em todos os casos, foi constatada a presença de infarto do miocárdio, através da coloração pelo TTC. Atendendo aos objetivos do trabalho, foram estudados fragmentos de miocárdio das seguintes áreas: 1—área controle; 2—área infartada; 3—mesocárdio (limite de transição da zona não penetrada pelo nankin; na áreas controle (fig. 1) observaram-se nos miócitos: preservação das membranas celulares e dos túbulos do retículo, mitocôndrias com membrana externa e cristas mitocondriais preservadas, com discreto edema sarcômeros de forma e aparência normais, com preservação dos miofilamentos; espaço intersticial normal; membranas da célula endotelial dos capilares preservadas, núcleo de aspecto normal; presença de vesículas de pinocitose.

Na área de infarto (figs, 2, 3, 4) os miócitos apresentavam presença de bandas de contração;

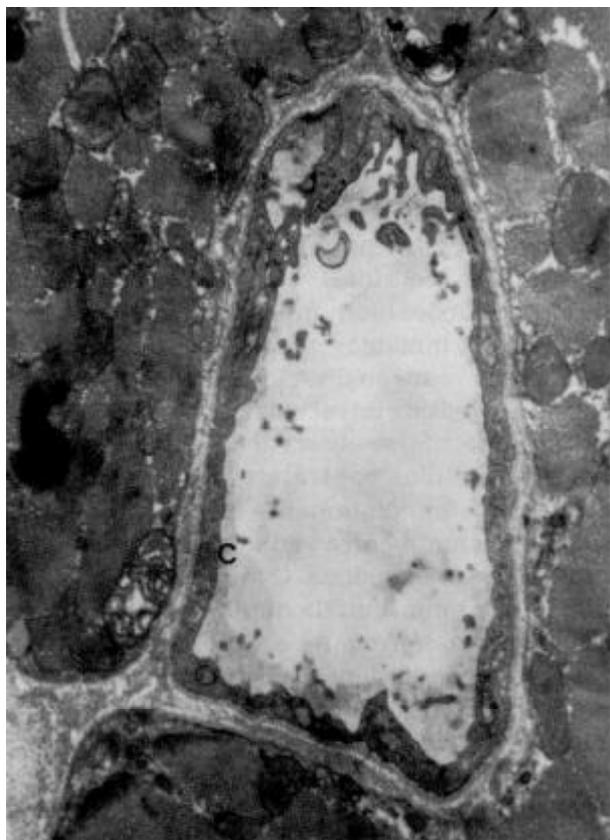


Fig. 1—Fotomicrografia (x8660) do miocárdio controle. Capilar sem alterações ultraestruturais. Edema discreto nos mitocôndrios dos cardiomiócitos adjacentes. C—vaso capilar.

ruptura da membrana mitocondrial com desaparecimento das cristas e presença de corpúsculos eletrôn-densos; ruptura de miofilamentos; edema

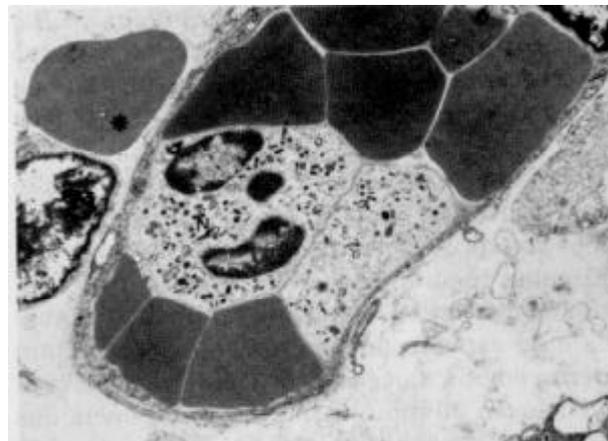


Fig. 2—Fotomicrografia (x14100) do miocárdio, na área infartada. Capilar acentuadamente dilatado, preenchido por hemácias e neutrófilos. Observa-se extravasamento de uma hemácia (*), indicando ruptura capilar em outro lugar. H—hemácia; N—neutrófilo.

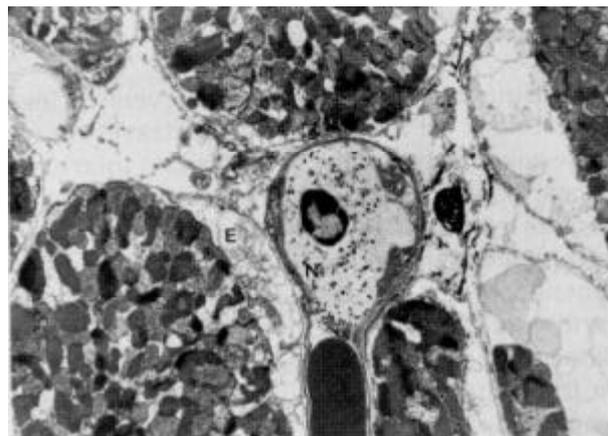


Fig. 3—Fotomicrografia (x3650) do miocárdio, na área infartada. Presença de granulócito com pseudópode, nos capilar central, indicando movimentação ativa. Cardiomiócitos com organelas intensamente lesadas e acentuado edema subsarcolemal. N—neutrófilo; E - edema.

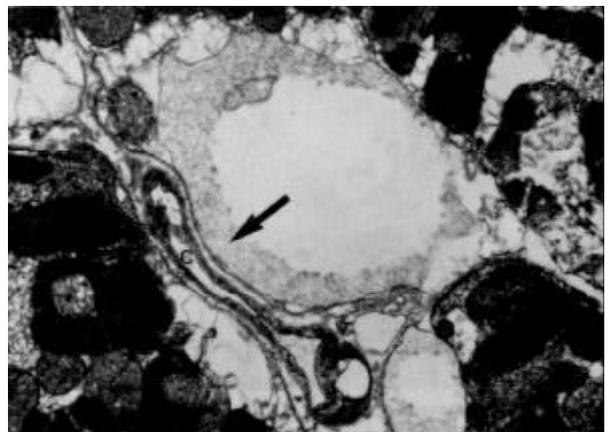


Fig. 4—Fotomicrografia (x7650) do miocárdio, na área infartada. Observa-se destruição das organelas dos cardiomiócitos. Note bolhas de edema intra-celular, comprimindo um vaso capilar. C—capilar.

intersticial; os capilares mostravam acentuado edema da célula endotelial capilar; áreas com rarefação das vesículas de pinocitose; lesões mitocondriais com desaparecimento das cristas e ruptura de membrana; presença de granulócitos e “blebs” intravasculares; em áreas observa-se extravasamento de hemácias e compressão extríntrica do capilar pelo edema tecidual.

Na área de mesocárdio, na transição da não reperfusão (fig. 5) os miócitos apresentavam áreas com preservação das estruturas da célula muscular, membrana celular íntegra, mitocôndrias com discreto edema; miofilamentos alinhados e de aspecto normal; os capilares tinham intenso edema da célula endotelial capilar, com sub-oclusão do lume vascular. A aparência das lesões observadas nesta área, permite concluir que os miócitos apresentam-se preservados. As lesões capilares, contudo, são intensas, desproporcionais ao acometimento dos miócitos.

DISCUSSÃO

A isquemia miocárdica se não reversível leva à morte das células miocárdicas através da necrose coagulativa, o que caracteriza o infarto do miocárdio. É importante ter em mente que o infarto do miocárdio apresenta uma evolução temporal, comprometendo, inicialmente, a região subendocárdica e progredindo através do mesocárdio ao epicárdio, pare se tornar transmural. Esta progressão tem sido comparada a uma “wave front” que progride do subendocárdio para o epicárdio⁷. A extensão do infarto depende da duração e da magnitude da isquemia que genericamente se relaciona à severidade da oclusão vascular (circulação anterógrada), cir-

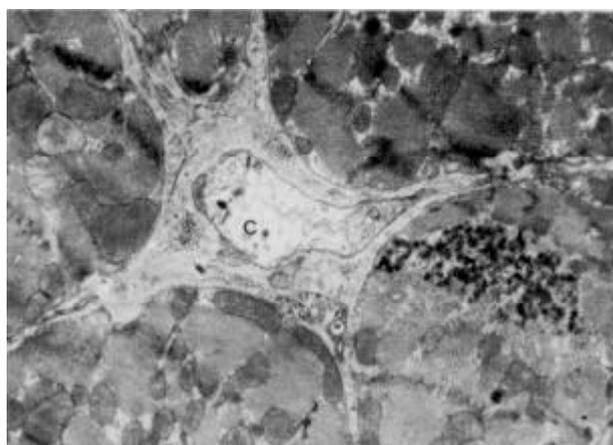


Fig. 5—Fotomicrografia (x3625) do miocárdio, na região de transição entre o mesocárdio e a Área infartada. Observe o edema maciço da parede capilar, com oclusão sub-total do lume vascular. Em comparação com as outras ilustrações o grau de alterações das organelas dos cardiomiócitos adjacentes é significativamente menor C— capilar

culação colateral (fluxo retrógrado) e ao consumo de oxigênio local⁸. Dentro desta visão, é possível caracterizar no infarto do miocárdio, uma área subendocárdica de necrose celular, portanto irrecuperável e uma área do mesocárdio e subepicárdio com células ainda viáveis, mas com graus variáveis de reversibilidade, à medida que se distanciam da área do infarto. Esta área de tecido miocárdico viável é o objeto dos procedimentos terapêuticos que buscam limitar ou reduzir a área infartada. Esta área de células recuperáveis é heterogênea e o estágio de comprometimento celular depende da magnitude e do tempo de isquemia. É preciso distinguir as alterações teciduais localizadas entre o subendocárdio e subepicárdio, daquelas localizadas na chamada lateral “border zone”. Admite-se que esta borda lateral do infarto do miocárdio é claramente definida e a gravidade das lesões dos miócitos isquêmicos nesta borda é semelhante a dos contidos no centro do infarto^{7,9}. Para estes autores, esta borda lateral do infarto não se beneficiaria da reperfusão.

São numerosos os trabalhos que estudam a evolução da área infartada. Com a intenção de organizar a discussão do assunto, seria pertinente, inicialmente, distinguir as alterações que ocorrem a nível das células musculares contráteis daquelas que ocorrem na microcirculação, especialmente na célula endotelial.

A isquemia tecidual pode ser entendida como um inadequado suprimento de substrato, particularmente oxigênio e glicose, e uma inadequada remoção de produtos do metabolismo, especialmente lactato, H^+ e K^{+10} . Em conseqüência, as alterações bioquímicas que aparecem nos primeiros 10 min de isquemia, referem-se principalmente à redução do ATP e do “pool” de adenosina nucleótide intracelular. Do ponto de vista morfológico, não se observam alterações expressivas nas células contráteis, e nas endoteliais vasculares⁵. Imediatamente à redução de ATP no mioplasma, ocorre redução da função contrátil na área isquêmica. Com a manutenção da isquemia e a continuada diminuição do ATP intracelular, compromete-se a bomba de sódio e potássio, energia dependente, com retenção de sódio no interior da célula e conseqüente acúmulo de água. O potássio intracelular diminui e aumenta a sua concentração extracelular.

Aos 20 min de isquemia, aproximadamente, começa a cair o pH intracelular, em decorrência do metabolismo anaeróbico. Nesta fase evolutiva, compromete-se a bomba de cálcio, e o íon começa

a aumentar sua concentração no citosol. Do ponto de vista morfológico ocorre diminuição dos grânulos de glicogênio, marginalização da cromatina nuclear e desorganização das cristas mitocondriais. Até este ponto de isquemia, as alterações celulares são consideradas reversíveis⁵. Não há informação precisa na literatura sobre a situação das células endoteliais vasculares. Aparentemente, estas células estariam preservadas. É possível deduzir que a maior preservação das células endoteliais à isquemia, deve-se ao consumo menor do que o das células contráteis miocárdicas. Neste tempo de isquemia os vasos da microcirculação estariam dilatados, pela ação, dentre outros fatores, da adenosina, decorrente do metabolismo da AMP.

Entre os 40 e 60 min de isquemia, verificam-se aumento da concentração da Ca^{++} intracelular e dilatação dos túbulos do retículo sarcoplasmático. A bomba de Ca^{++} ao nível do retículo é que retira este íon do mioplasma, levando ao desacoplamento dos miofilamentos e a diástole⁴. A função contrátil compromete-se mais acentuadamente. Observam-se ruptura da membrana mitocondrial e presença de corpúsculos eletrondensos dentro das mitocôndrias, interpretados como acúmulo de Ca^{++} . Estas alterações morfológicas exprimem a irreversibilidade da vida celular. Nesta etapa, o tecido contrátil encontra-se em estado de "rigor". As células dos capilares apresentam-se tumefeitas. De acordo com Arminger e col¹² entre 10 a 60 min de isquemia, observa-se progressivo edema da célula endotelial que resulta em diferentes graus de obstrução do lume vascular. Após 120 min de isquemia, observam-se sinais de degeneração da célula endotelial, com alterações estruturais das organelas destas células. Em trabalho prévio¹³ observamos edema da célula endotelial capilar, muitas vezes com presença de microtromboses, sugerindo expressivo comprometimento deste vasos, na área peri-infarto.

Na reperfusão miocárdica é preciso distinguir o efeito sobre as células isquêmicas com alterações morfológicas consideradas reversíveis, do sobre as em situação irreversível. Estudos concluíram que a reperfusão acelera a morte das células com lesões consideradas irreversíveis, provavelmente através do aumento do Ca^{++} e edema celular, desde que a magnitude das alterações das membranas não permita à célula regular o seu volume e o conteúdo iônico¹⁴. Mas qual seria a ação da reperfusão sobre as células consideradas reversíveis? Admite-se aumento da concentração do cálcio intracelular em situação reversível, mais que nas isquemias não reperfundidas³.

A reperfusão também acentua o edema das células musculares, e o conteúdo de água aumenta 21%.

Em relação às células endoteliais vasculares, na reperfusão há um consenso de que se apresentam tumefeitas¹⁵. Para alguns autores este edema celular, com microtromboses, poderia comprometer ou limitar a perfusão tecidual, caracterizando o fenômeno da não reperfusão⁴. Entretanto, as células capilares comprometidas, estariam situadas dentro da área necrosada e, conseqüentemente, não teriam maior influência na recuperação do miocárdio^{4,16}. Desta forma a morte dos miócitos, ocorreria antes das alterações microvasculares. Fishbein e col¹⁷ estudando as lesões vasculares no infarto do miocárdio, após reperfusão, também concluíram que as alterações dos capilares, mais graves, encontram-se dentro da área infartada.

Nossos resultados mostram graves lesões dos vasos capilares, na área infartada. Elas parecem proporcionais em intensidade às alterações dos miócitos. Deve-se ressaltar a presença de neutrófilos, no interior dos capilares, o que reforça a hipótese que eles devem ter influência no agravamento das lesões vasculares, possivelmente pela ação de radicais livres¹⁸. Estes achados estão em acordo com a literatura^{4,16-19}.

Achado inédito do presente trabalho, que carece de mais ampla confirmação, refere-se à constatação de lesões capilares, em tecido miocárdico viável no limite da área de não reperfusão. De fato, cerca da área não penetrada pelo nankin, observamos acentuado comprometimento das células endoteliais capilares, ao lado de miócitos suficientemente conservados. Nossos achados sugerem ser possível ampliar a recuperação de células miocárdicas contráteis, durante a reperfusão, se de alguma forma, se conseguir preservar a estrutura dos vasos capilares.

Quando se analisa o comportamento da relação pressão/fluxo, durante a reperfusão que sucede ao infarto do miocárdio, conclui-se que há aumento da resistência coronária e diminuição da reserve circulatória, que se inicia e que progride com o processo de reperfusão¹⁻³. Esta constatação é extremamente importante, pois demonstra a existência de mecanismos deletérios à célula endotelial capilar, vinculados à própria reperfusão tecidual. Mais recentemente, Ambrosio e coral²¹ demonstraram a existência de lesões ultraestruturais da microcirculação, em curso com o processo de reperfusão, confirmando o comportamento da hemodinâmica circulatória coronária, avaliada pela relação pressão/fluxo. De outro lado,

existem claras evidências, que radicais livres, produzidos em consequência da reperfusão, seriam os principais responsáveis pelas lesões capilares¹⁸.

Em conclusão, entendemos que durante a reperfusão que sucede ao infarto do miocárdio, ocorrem lesões da microcirculação, em curso com o processo de reperfusão, e responsáveis pela redução do fluxo e da reserva circulatória coronárias. cremos que lesões da microcirculação impedem a reperfusão em tecido miocárdico viável, dando suporte às propostas de intervenção farmacológica para evitar a injúria de reperfusão, buscando ampliar o salvamento do músculo cardíaco.

REFERÊNCIAS

1. Parker PE, Bashour A, Downey F, Kechejian J, Williams G—Coronary hemodynamics during reperfusion following acute coronary ligation in dogs. *Am Heart J*, 1975; 90: 593-9.
2. Johnson WB, Halome SA, Pantely GA, Anselone CG, Bristow —No reflow and extent of infarction during maximal vaso dilatation in the porcine heart *Circulation*, 1988; 78: 462-72
3. Chua A, Cobb FR—Reperfusion alters the relation between flow and the remaining myocardial infarction. *Circulation*, 1989; 79: 884-9.
4. Kloner RA, Ellis SG, Lange R, Braunwald E—Studies of experimental coronary artery reperfusion. Effects on infarction size, myocardial function, biochemistry, ultrastructure, and microvascular damage. *Circulation*, 1983; 68: 18-115.
5. Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB—"No reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest*, 1974;54: 1496-508.
6. Jennings RB, Schaper J, Hill ML, Steenbergen C, Reimer KA —Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury. *Circ Res*, 1985; 56: 262-78.
7. Reimer AK, Jennings RB—The wave front phenomenon of myocardial ischemic cell death. *Lab Invest*, 1979; 40: 633-44.
8. Becker LL, Ambrosio G—Myocardial consequences of reper fusion. *Prog in Cardio Diseases*, 1987; 30:23-44.
9. Gately RAA, Wiison GJ—The border zone in myocardial infarction. *Am J Pathol*, 1988; 131: 452-64.
10. Allen DG, Orchard CH—Myocardial contractile function during ischemia and hipoxia. *Circ Res*, 1987; 60: 153-68.
11. Jennings RB, Reimer RA—Lethal myocardial ischemic injury. *Am J Pathol*, 1981; 102: 241-55.
12. Arminger LC, Gavin JB—Changes in the microvasculature of ischemic and infarcted myocardium. *Lab Invest*, 1975; 33: 51-7.
13. Ribeiro Jorge PA—Contribuição ao estudo da cardiopatia isquêmica. Estudo dos capilares do coração pela microscopia eletrônica. Tese. Faculdade de ciências Médicas da Unicamp. 1972.
14. Fox KAA, Bergmann SR, Sobel BE—Pathophysiology of myocardial reperfusion. *Ann Rev Med*. 1985; 36: 125-44.
15. Willerson JT, Scales F, Mukherejee A, Pilat M, Templenton H, Fink GS, Buja LM —Abnormal myocardial fluid retention as an early manifestation of ischemic injury. *Am J Pathol*, 1977; 87: 159-81.
16. Braunwald E, Kloner RA—Myocardial reperfusion. A double edge sword. *J clin Invest*, 1985; 76: 1713-19.
17. Fishbein MC, Y-Rit J, Lando U—The relationship of vascular injury and myocardial hemorrhage to necrosis after reperfusion. *Circulation*, 1980;62: 1274-6.
18. Engler RL—Free radical and granulocyte-mediated injury during myocardial ischemia and reperfusion. *Am J Cardiol*, 1989; 63: 19E-23E.
19. Kloner RA—No reflow revisited. *J Am Coll Cardiol*, 1988;
20. Ambrosio G, Weisman HF, Mannisi JA, Becker LC—Progressive impairment of regional myocardial perfusion after initial restoration of post ischemic blood flow. *Circulation*, 80 1946-61.