

Estereologia do Miocárdio em Fetos Humanos. Estudo Quantitativo das Modificações Estruturais nos dois Últimos Trimestres de Gestação

Ricardo Xavier Vidal, Margareth Costa Neves, Verônica Clemente Villar, William Nascimento Viana, Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda
Rio de Janeiro, RJ

Objetivo - Quantificar o miocárdio humano comparando o 2° e 3° trimestres gestacionais.

Métodos - Fragmentos de miocárdio de 8 corações de fetos humanos (sendo 4 do 2° e 4 do 3° trimestres) foram coletados e processados histologicamente. Quinze campos miocárdicos aleatórios de cada coração foram quantificados para miócitos, tecido conjuntivo e vasos contando pontos-teste e intersecções.

Resultados - As diferenças estereológicas para os miócitos, vasos e tecido conjuntivo, não foram significativas comparando os 2 trimestres ($p > 0,05$). A densidade volumétrica foi: miócitos (núcleos inclusive) = 75,6% no 2° trimestre e 67,7% no 3° trimestre; vasos = 3,7% no 2° trimestre e 6,4% no 3° trimestre; tecido conjuntivo (substância intersticial excluindo os vasos) de 20,6 a 25,9% do 2° para o 3° trimestres, respectivamente. Entretanto, a diferença das densidades volumétricas dos núcleos dos miócitos foi significativa ($p = 0,004$) e indicou redução do 2° para o 3° trimestres, de 15,2 para 8,1% respectivamente.

Conclusão - Esses resultados sugerem que há redução gradativa da síntese protéica nos 2 últimos trimestres gestacionais, sem alteração quantitativa importante na composição do tecido cardíaco, provavelmente relacionada à simultânea diminuição da multiplicação celular miocárdica.

Palavras-chave: miocárdio, feto, estereologia

Stereology of the Myocardium in Human Fetuses: Quantitative Study of the Structural Changes in the Last Two Trimesters of Gestation

Purpose - Quantitative study of the human myocardial comparing the 2nd and 3rd trimesters of gestation.

Methods - Fragments of the myocardium were collected from 8 fetal human hearts (4 from 2nd and 4 from 3rd trimesters) and prepared by histological methods. Fifteen random fields from each region were analyzed considering independently myocytes, connective tissue and vessels. Stereological determinations were possible by counting test-points and intersections on a multipurpose test lattice (M42).

Results - Stereological differences between last 2 trimesters of gestation were not significant ($p > 0,05$). The volume density was myocyte (including nucleus) = 75.6% in 2nd trimester and 67.7% in 3rd trimester; vessels = 3.7% in 2nd trimester and 6.4% in 3rd trimester; connective tissue (interstitial substance without vessels) = 20.6 to 25.9% for 2nd and 3rd trimesters respectively. However, considering the nuclei of the myocytes differences between last 2 trimesters were significant ($p = 0.004$). The volume density of the nuclei had a reduction from 2nd to 3rd trimesters (from 15.2 to 8.1% respectively).

Conclusion - This result suggests decreasing synthesis of proteins from nucleus of myocyte in the last 2 gestational trimesters, but without quantitative important changes in the cardiac tissue, probably in relation to the reduction of the myocardial cellular multiplication.

Key - words: *myocardium, fetus, stereology*

Arq Bras Cardiol, volume 60, n° 4, 221-224, 1993

Departamento de Anatomia, Centro Biomédico, Univ. do Estado do Rio de Janeiro
Correspondência: Carlos A. Mandarim-de-Lacerda - Departamento de Anatomia,
Centro Biomédico, Hospital Universitário Pedro Ernesto
Av. 28 de Setembro 77 (fundos) - CEP 20551-030 - Rio de Janeiro, RJ
Recebido para publicação em 19/10/92
Aceito em 11/1/93

Nos primeiros estágios de desenvolvimento embrionário vemos o miocárdio intensamente trabeculado e a cavidade ventricular praticamente alcançando a região subepicárdica. Nesse período o coração não necessita de sistema arterial específico já que a oxigenação requerida é adequadamente suprida por difusão, a partir do lúmen cardíaco¹⁻³ O coração embrionário apresenta basicamen-

te 2 camadas: uma mais externa (região epicárdica, que é mitoticamente ativa, chamada camada proliferativa), e outra, interna e trabeculada (camada contrátil). Essas camadas miocárdicas satisfazem as necessidades do desen-volvimento do embrião, que são: contrair incessantemente para suprir de sangue todo o corpo, e, simultaneamente, crescer para aumentar a capacidade de suprimento sangüíneo do embrião que cresce rapidamente⁴. No início do desenvolvimento pós-somítico (a partir da metade da 6ª semana, estágio 13) é possível observar batimentos cardíacos e suas possíveis falhas por ultrassonografia transvaginal⁵. O gradiente de proliferação celular trans-mural que é observado durante o período embrionário (da região epicárdica para a região endocárdica) não está mais presente após o nascimento⁶.

Tem sido registrado um crescimento acentuado da espessura da parede miocárdica em embriões de mamíferos a partir do estágio¹⁹ até o final do período embrionário propriamente dito⁷. Durante esses estágios, um sistema de vasos se desenvolve para irrigar o miocárdio que se espessa rapidamente⁸⁻¹². A partir da 8ª semana de vida intrauterina, o coração humano tem virtualmente completado a organogênese^{7,9}. O crescimento pós-natal do miocárdio é basicamente o resultado do aumento em volume das células contráteis, contudo, ainda é discutida a capacidade de hipertrofia e multiplicação celular perinatal do miocárdio^{5,13,14}. Neste aspecto, diferenças entre os ventrículos podem ser devidas às diferenças apresentadas em seus leitos capilares¹⁵.

Atualmente, novos métodos de estudo têm permitido fazer avaliações quantitativas, reduzindo as distorções nas quantificações morfológicas¹⁶. Esses métodos são capazes de avaliar o crescimento normal e hipertrofico do miocárdio com respeito às modificações de número e tamanho dos miócitos e outros componentes miocárdicos¹⁷. Estudos quantitativos, em especial aqueles que permitem identificar o grau de multiplicação celular em diferentes momentos do desenvolvimento cardíaco embrionário e fetal, têm relevância para o prognóstico de doenças cardíacas ainda na vida intrauterina. Isto se deve ao fato de que o potencial de regeneração do miocárdio nesta fase da vida está em proporção direta com a atividade de proliferação celular durante o período em questão¹⁴.

O presente trabalho tem o propósito de contribuir para o conhecimento do desenvolvimento pré-natal do miocárdio humano, empregando a estereologia, avaliando as modificações na estrutura miocárdica entre os 2º e 3º trimestres.

Métodos

Estudamos corações de 8 fetos humanos do 2º e 3º trimestres gestacionais (destes, 4 tinham idades entre 18 e 20 semanas, e os outros 4, entre 32 e 35 semanas). Estes foram obtidos de abortos espontâneos (Hospital Universitário Pedro Ernesto - UERJ). A paridade, idade ma-

terna e o sexo dos fetos não foram considerados para a seleção do material. As idades gestacionais foram ajustadas segundo o comprimento do maior pé¹⁸. OS corações foram dissecados e retirados. Amostras do miocárdio de cada coração foram coletadas profundamente da porção subendocárdica da parede livre do ventrículo esquerdo e fixadas por imersão, em solução tamponada de formaldeído 10% em tampão fosfato pH 7,2. O material foi incluído em parafina, seccionados com 51µm de espessura e corado por métodos de rotina (hematoxilina-eosina e tricrômico).

Quinze campos miocárdicos aleatórios por coração foram observados. Utilizamos o sistema-teste M42 montado em ocular Nikon CFW (10x)¹⁹, e objetiva de imersão (100x). Contamos o número de pontos-teste e intersecções superpostos à imagem dos componentes miocárdicos, e estimamos alguns parâmetros estereológicos, considerando separadamente miócitos, tecido conjuntivo e vasos^{16,20}: a) A_A (%) - fração de área da estrutura²⁰, $A_A = P_p \times 100 / P_T$ sendo: P_p = pontos-teste que se sobrepõem à estrutura, P_T = número total de pontos do sistema-teste ($P_T = 42$ no sistema-teste M42); b) N_V (1/mm³) - o número de estruturas por volume do miocárdio (método II de Aherne²¹). $N_V = 2N / (I \times d) + 2e$ sendo: N = número de estruturas na área-teste, I = intersecções da estrutura com a linha-teste, d = calibração do sistema-teste (distância entre dois pontos teste), e = espessura da microtomia; c) v - volume médio da estrutura (mm³)¹⁶ $V = A_A / N_V$ (A_A neste caso não é considerado em percentagem). O erro sistemático de superestimação de contagens estereológicas (efeito Holmes) devido a espessura da microtomia (e) foi considerado desprezível nas condições do presente estudo. Para estruturas opacas que apresentam diâmetro D (miócitos, núcleos de miócitos) sabe-se que o coeficiente de distribuição K da estrutura tende a 1 quando $e < D$ ²². As diferenças entre as médias dos parâmetros estereológicos, comparando os dois últimos trimestres gestacionais, foram analisadas pelo teste t de

Tabela I - Parâmetros estereológicos do miocárdio fetal (média ± erro padrão da média).

Parâmetros	2º trimestre	3º trimestre	p
A_A (%)			
miócito (nucleo excluído)	60,44 ± 2,42	59,57 ± 3,40	0,086
tecido conjuntivo	20,55 ± 2,81	25,88 ± 4,25	0,336
vasos	3,65 ± 0,67	6,39 ± 2,35	0,306
núcleo do miócito	15,16 ± 1,45	8,10 ± 0,56	0,004*
N_V (1/mm ³)			
núcleo do miócito	17500,0 ± 530,0	25500,0 ± 1840,0	0,006*
V (mm ³)			
núcleo do miócito	10042,5 ± 1149,2	4252,5 ± 543,0	0,004*
A _A - fração de área; N _V - densidade numérica; v - volume médio; * - diferença entre trimestres estatisticamente é significante.			

Student para amostras não pareadas.

Este teste considera que as amostras são aleatórias, de populações com distribuição normal, com variâncias iguais. Entretanto, em pesquisa biológica nem sempre estamos certos de poder respeitar essas premissas. Felizmente, sabe-se que o teste t é suficientemente robusto para suportar desvios dessas premissas teóricas, principalmente quando consideramos níveis de significância muito pequenos, digamos $p < 0,01^{23}$, o que foi o caso do presente trabalho.

Resultados

Os resultados estão indicados na tabela I e nas figuras 1 e 2. As diferenças de A_A para miócitos, vasos e tecido conjuntivo não foram significativas no período analisado. Os miócitos do ventrículo esquerdo representaram 75,60% do tecido cardíaco no 2° trimestre (sendo que destes, 15,16% foram relativos ao núcleo), e 67,67% no 3° trimestre (dos quais 8,10% foram relativos ao núcleo) ($p=0,086$). Os vasos sanguíneos, incluídos no interstício, representaram 3,65% do total do volume do miocárdio no 2° trimestre, e 6,39% no 3° trimestre, mas essa diferença entre os trimestres não foi significativa ($p > 0,05$). O tecido conjuntivo (substância intersticial excluindo os vasos) variou de 20,55 a 25,88% do 2° ao 3° trimestres respectivamente ($p > 0,05$). Como já assinalamos, houve redução do A_A dos núcleos dos miócitos do 2° para o 3° trimestres, respectivamente de 15,16% a 8,10%, redução esta que foi significativa ($p=0,004$) (fig. 1). O volume médio dos núcleos dos miócitos também teve redução significativa variando de cerca de 10000,0 mm^3 no 2° trimestre à 4250,0 mm^3 no 3° trimestre ($p=0,004$). A densidade numérica dos núcleos aumentou significativamente, passando de 17500,0/ mm^3 para 25500,0/ mm^3 ($p=0,006$) (fig. 2).

Discussão

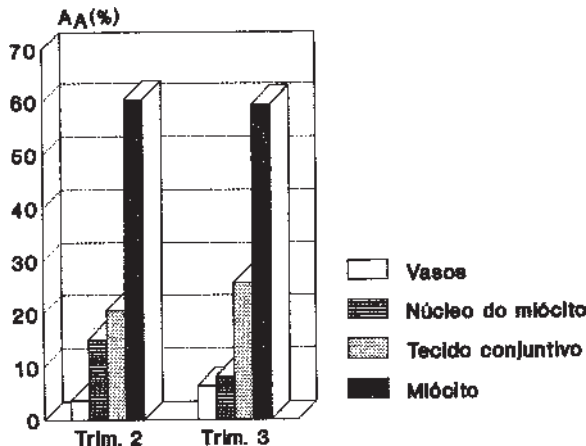


Fig. 1 - Variação da densidade de área (A_A %) ocupada pelos diferentes componentes do miocárdio nos dois últimos trimestres de gestação. Trim. 2 = 2° trimestre, Trim. 3 = 3° trimestre.

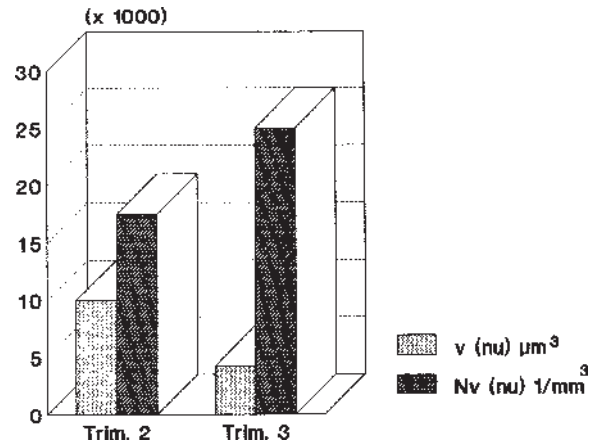


Fig. 2 - Variação do volume (v) e da densidade numérica (Nv) dos núcleos (nu) dos miócitos nos dois últimos trimestres gestacionais. Trim. 2 = 2° trimestre, Trim. 3 = 3° trimestre.

A literatura relata que os miócitos do miocárdio ventricular no adulto ocupam 75% do espaço estrutural, enquanto o interstício cardíaco (capilares e substância intercelular contendo células do tecido conjuntivo e fibras) ocupam os restantes 25%^{13,24}.

Porter e Bankston²⁵, em fotos de rato, encontraram densidade média de miócitos de 85,6%, para o tecido conjuntivo 2,8% (excluindo os vasos), e para os vasos 11,55%. Nossos resultados, em fetos humanos, foram ligeiramente inferiores a estes, com exceção dos valores do tecido conjuntivo. Entretanto, considerando as diferenças no tamanho das amostras e na metodologia empregada (fixação e método de quantificação estereológica), é difícil avaliar se estas diferenças são ou não significativas. Em certas circunstâncias, o principal fator de alteração do débito da função contrátil do coração é uma anormalidade estrutural no espaço extracelular. O termo “doença intersticial cardíaca” (*interstitial heart disease*) tem sido proposto para denominar esta patologia do miocárdio, onde os miócitos são “simples espectadores” das alterações de remodelamento estrutural ou bioquímico do interstício²⁴. Analisando separadamente os núcleos dos miócitos, encontramos aumento significativo da densidade numérica desses do 2° para o 3° trimestres. O volume nuclear apresentou redução significativa nesse período. Esses resultados sugerem que há diminuição gradativa da síntese protéica do 2° para o 3° trimestres gestacionais, provavelmente relacionada à simultânea diminuição da atividade de multiplicação celular miocárdica.

Mandarim-de-Lacerda⁷, em embriões humanos, observou que a taxa de crescimento do volume miocárdico nos estádios finais de desenvolvimento embrionário (estádios 21 a 23) é próximo ao dobro daquela encontrada nos estádios iniciais (15 a 20). Este crescimento mais in-tenso no final do período embrionário

é devido, provavelmente, à maior demanda hemodinâmica requisitada como suporte ao desenvolvimento dos períodos fetais sub-seqüentes. Sabemos que, no feto humano, há correlação forte e significativa entre o aumento da espessura da parede ventricular de ambos os ventrículos e o peso cardíaco²⁶.

Neste trabalho encontramos aumento significativo da densidade numérica dos núcleos dos miócitos no 3º trimestre em comparação ao 2º, o que indica ter havido proliferação celular significativa no período analisado. Anversa e col⁶, em ratos, também notaram um aumento do número de núcleos dos miócitos do ventrículo esquerdo do 1º para o 11º dia pós-coito. Contudo, estes dados de densidade numérica de núcleos de miócitos em roedores devem ser vistos com reserva, uma vez que na transição do período de multiplicação celular para o período hipertrofico, cerca de 90% dos miócitos ventriculares desses mamíferos são binucleados, o que pode ocasionar um certo grau de distorção dos resultados - o aumento da densidade dos núcleos não indicaria necessariamente aumento do número de células^{6,14}. O conhecimento do grau de multiplicação celular miocárdica relativo a cada momento do desenvolvimento pré-natal é relevante para o diagnóstico precoce e prognóstico de doenças cardíacas que afetem o miocárdio naquele período, mesmo que isto não seja aplicável atualmente. É considerado que a regeneração do miocárdio na vida intrauterina varia em proporção ao potencial de proliferação celular durante o período¹⁴. Além disso, a compreensão do interrelacionamento dos componentes específicos do miocárdio permite a compreensão do processo de desenvolvimento/crescimento que ocorre durante o desenvolvimento do miocárdio²⁷. Hoje, métodos sofisticados e acurados são de grande valia na pesquisa clínica de alterações cardíacas pré-natais. Esse é o caso da ecodoppler cardiografia²⁵, da ressonância nuclear magnética^{29,30} e da ultra-sonografia com sonda transvaginal⁵. Apesar disso, alguns detalhes do desenvolvimento e morfologia cardíacas ainda necessitam maiores elucidacões, como por exemplo a controversia quanto ao potencial de hipertrofia/multiplicação celular do miocárdio durante o desenvolvimento normal^{6,13-15}.

Neste trabalho pudemos observar que parâmetros quantitativos dos núcleos dos miócitos aumentam significativamente no final do período fetal, sugerindo uma importante multiplicação celular nesse período.

Referências

- Ostadal B, Schiebler TH, Rychter Z - Relations between the development of capillary wall and myoarchitecture of the rat heart. *Adv Exp Med Biol*, 1975; 53: 375-88.
- Viragh S, Challice CE - The origin of the epicardium and the embryonic myocardial circulation in the mouse. *Anat Rec*. 1981; 201: 157-68.
- Van Groniguen JP, Wenink ACG, Testers LHM - Myocardial capillaries: increase in number by splitting of existing vessels. *Anat Embryol*, 1991; 184: 65-70.
- Tokuyasu KT - Co-development of embryonic myocardium and myocardial circulation. In: Clark EB e Takao A, *Developmental Cardiology: Morphogenesis and Function*. Mount Kisco: Futura Publishing, 1990: 205-17.
- Drugan A, Timor-Tritsch E - Transvaginal ultrasonography. In: Evans MI, Dixler AO, Fletcher IC, Schulman JD, *Fetal Diagnosis and Therapy*. Science, Ethics and the Law. Philadelphia: Lippincott, 1989: 71.
- Anversa P, Olivetti G, Loud AV - Morphometric study of early postnatal development in the and right ventricular myocardium of the rat. I. Hypertrophy, hyperplasia, and bnucleation of myocytes. *Circ Res*, 1980; 46: 495-502.
- Mandarim-de-Lacerda CA - Growth allometry of the myocardium in human embryos (from stages 15 to 23). *Acta Anat*, 1991; 141: 251 -6.
- Xavier-Vidal R, Souza RMP, Mandarim-de-Lacerda CA - Development of the coronary arteries in staged embryos of the rat. *Quad Anat Pratica*; 1991; 47:1-4.
- Mandarim-de-Lacerda CA - Anatomia do Coração, Clínica e Cirúrgica Rio de Janeiro: Revinter, 1990.
- Hirakow R - Development of the cardiac blood vessels in staged human embryos. *Acta Anat*, 1983; 115: 220-30.
- Bogers AJC, Gittenberger-de Groot AC, Poelmann RE, Péault BM, Huysmans HA - Development of origin of the coronary arteries, a matter of ingrowth or outgrowth? *Anat Embryol*, 1989; 180:437-41.
- Mandarim-de-Lacerda CA - Development of the coronary arteries in staged human embryos. *An Acad Bras Sci*, 1990; 62: 79-84.
- Zak R - Cell proliferating during the cardiac growth. *Am J Cardiol*, 1973; 31: 21 1-19.
- Bishop SP - The myocardial cell: normal growth, cardiac hypertrophy and response to injury. *Toxicol Pathol*, 1990; 18: 438-53.
- Mattfeldt T, Mall G - Statistical methods for growth allometric studies. *Growth*, 1987; 51: 86-102.
- Cruz-Orive LM, Weibel ER - Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. *Am J Physiol*, 1 990; 258: L 148-L 156.
- Loud AV, Anversa P, Giacomelli F, Wiener J - Absolute morphometric study of myocardial hypertrophy in experimental hypertension. I. Determination of myocyte size. *Lab Invest*, 1978; 38: 586-96.
- Mandarim-de-Lacerda CA - Foot length growth related to crown-rump length, gestational age and weight in human staged fresh fetuses. An index for anatomical and medical use. *Surg Radiol Anat*, 1990; 12: 103-7.
- Weibel ER - Stereological Methods. *Practical Methods for Biological Morphometry*. New York: Academic Press. 1979: 116.
- Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L et al - Some new, simple and efficient stereological methods and their used in pathological research and diagnosis. *Acta Microb Imm Scand*, 1988; 96: 379-94.
- Aherne WA --Methods of counting discrete tissue components in microscopical sections. *J R Microsc Soc*, 1967; 87: 493-501.
- Weibel ER, Elias H - Introduction to stereologic principles. In: Weibel ER e Elias H, eds. *Quantitative Methods in Morphology*. Berlin: Spnnger-Verlag, 1967:97.
- Zar JH - *Biostatistical Analysis*, 2nd Ed. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1984:130.
- Weber KT - Cardiac interstitium: extracellular space of the myocardium. In: Fozzard W, ed. *The Heart and Cardiovascular System*. 2ª Ed. New York: Raven Press, 1992: 1465.
- Porter GA, Bankston PW - Myocardial capillaries in the fetal and the neonatal rat: a morphometric analysis of the maturing myocardial capillary bed. *Am J Anat*, 1987;179: 108-15.
- Alvarez L, Aranega A, Saucedo R, Contreras JA - The quantitative anatomy of the normal human heart in fetal and perinatal life. *Int J Cardiol*, 1987; 17: 57-72.
- Atkms DL, Rosenthal JK, Krumm PA, Marvin WJ - Application of stereological analysis of cell volume to isolated myocytes in culture with and without adrenergic innervation. *Anat Rec*, 1991; 231: 209-17.
- Gembruch U, Knople G, Chatterjee M, Bald B, Hansmann M - First-trimester diagnosis of fetal congenital heart disease by transvaginal two-dimensional and doppler echocardiography. *Obstet Gynecol*, 1990; 75: 496-8.
- Garden AS, Griffiths RD, Weindling AM, Martin PA - Fast scan magnetic resonance imaging in fetal visualization. *Am J Obstet Gynecol*, 1991; 164: 1 1 90-6.
- Van Der Wall EE, Roos A de, Van Voorthuisen E, Brusckke AVG - Magnetic resonance imaging: a new approach for evaluating coronary artery disease? *Am Heart J*, 1991;121: 1203-20.