

Miocárdio Fetal Humano. Proliferação do Miócito e Desenvolvimento do Interstício Cardíaco nos Dois Últimos Trimestres Gestacionais

Marcelo Barbosa dos Santos, Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda

Rio de Janeiro, RJ

Objetivo - Determinar as modificações quantitativas do miocárdio usando a estereologia.

Métodos - Foram estudados 26 fetos humanos (sendo 16 do 2º trimestre e 10 do 3º trimestre), tendo os corações dissecados, pesados, fixados em solução de bouin por 12h, processados tecnicamente, incluídos em paraplast®, seccionados e corados pela HE e tricrômico de Gomori. Dez campos microscópicos aleatórios foram analisados por coração com a determinação dos seguintes parâmetros estereológicos: $Vv[mio]$ e $Vv[int]$ (densidade de volume do miócito e do interstício cardíaco, respectivamente), e $Nv[mio]$ ($1/mm^3$) (densidade numérica dos miócitos), estimada pelo método do "disector". O número total de miócitos ($N[mio]$) e a média do volume do miócito ($V[mio]$) também foram determinados. As diferenças entre os fetos do 2º e do 3º trimestres gestacionais foram testadas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Resultados - O peso cardíaco aumentou de 1,95 para 9,10g, o $Vv[mio]$ diminuiu de 85,18 para 77,78%, $Vv[int]$ aumentou de 14,83 para 22,22%, enquanto o $Nv[mio]$ diminuiu de $68,86 \times 10^4$ para $57,40 \times 10^4/mm^3$. O $V[mio]$ aumentou de 1214,38 para $1412,31 \mu m^3$ e o $N[mio]$ aumentou de $1,36 \times 10^9$ para $5,06 \times 10^9$ miócitos. Estas diferenças foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Conclusão - Os resultados obtidos mostram o desenvolvimento miocárdico no final do período fetal humano sendo principalmente hipertrófico para o miócito e o interstício.

Palavras-chave: miócito, feto, estereologia

Fetal Human Myocardium. Proliferation of the Myocytes and Development of the Cardiac Interstitium in the Last Two Gestational Trimesters

Purpose - To determine prenatal myocardial quantitative changes by using stereology.

Methods - Twenty-six human fetuses were studied (16 in the 2nd trimester and 10 in the 3rd trimester). The hearts were dissected, weighted, fixed in the Bouin's solution for 12h, embedded in paraplast®, sectioned and stained by HE and trichrome of Gomori. Ten random microscopic fields were analyzed by heart. The following parameters were studied: $Vv[myocyte]$ and $Vv[interstitium]$ (%) (the volume densities of the cardiac myocyte and interstitium), and $Nv[myocyte]$ ($1/mm^3$) (the numerical density of the cardiac myocytes) by the disector method. The total number of myocytes ($N[myocyte]$) and the mean volume of the myocytes ($V[myocyte]$) were also determined. The differences were tested by the Mann-Whitney non-parametric test.

Results - The cardiac weight increased of 1.95 to 9.1g, the $Vv[myocyte]$ decreased from 85.18 to 77.78% and the $Vv[interstitium]$ increased from 14.83 to 22.22%. The $Nv[myocyte]$ decreased from 68.86×10^4 to $57.40 \times 10^4/mm^3$. The $V[myocyte]$ increased from 1214.38 to $1412.31 \mu m^3$ and the $N[myocyte]$ increased from 1.36×10^9 to 5.06×10^9 myocytes. These differences were statistically significant ($p < 0.05$).

Conclusion - These results suggest the development of the myocardium at the end of the fetal human period as being mainly hypertrophic to the myocyte and the cardiac interstitium.

Key-words: myocyte, fetus, stereology

Arq Bras Cardiol, volume 68 (nº2), 99-102, 1997

Centro Biomédico, Instituto de Biologia - UERJ - Rio de Janeiro
Correspondência: Marcelo Barbosa dos Santos - Lab. de Morfometria e Morfologia Cardiovascular, UERJ - (Prof. Dr. C. A. Mandarim-de-Lacerda) - Av. 28 de Setembro, 87 (fundos) - 20551-030 - Rio de Janeiro, RJ
Recebido para publicação em 17/8/96
Aceito em 30/10/96

A proliferação e a hipertrofia dos miócitos cardíacos no período perinatal ainda é um assunto controverso na literatura. Questões como: em que momento diminui a proliferação dos miócitos? Quando a hipertrofia celular passa a ser o principal fenômeno do crescimento cardíaco? Estudos

quantitativos, em especial aqueles que permitem identificar o grau de multiplicação celular no período de desenvolvimento fetal, têm relevância para o prognóstico de doenças cardíacas ainda na vida intra-uterina. 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 este período¹.

Apesar de recentemente ter sido demonstrado que alguma proliferação celular pode ocorrer no miocárdio ventricular, em associação com sobrecarga cardíaca prolongada e sustentada², acredita-se que nos mamíferos a proliferação de miócitos cardíacos cessa quase que imediatamente após o nascimento. Após esse período o crescimento fisiológico ou induzido do miocárdio ocorre primariamente por hipertrofia dos miócitos cardíacos³.

Durante o desenvolvimento pós-natal, o miócito cardíaco perde rapidamente a capacidade de proliferação e o subsequente desenvolvimento do coração é baseado no aumento dos miócitos preexistentes⁴.

Durante o período embrionário, a atividade da parede miocárdica é desigual, sendo mais ativo na camada periférica do que dentro da camada trabecular⁵. No período pós-somático precoce, o miocárdio humano tem poucos miócitos pequenos, enquanto no período pós-somático tardio o miocárdio é composto por numerosos e grandes miócitos. No final do período pós-somático observa-se pouco aumento no volume do miocárdio ventricular que, aparentemente, não está relacionado ao aumento da porção intersticial do miocárdio. Esses argumentos sugerem a existência tanto de aumento quanto de divisão de miócitos durante o período pós-somático do período embrionário humano⁶.

Métodos quantitativos em morfologia são capazes de avaliar o crescimento normal e hipertrófico do miocárdio avaliando as modificações de número e de tamanho dos miócitos e de outros componentes miocárdicos⁷. O esforço para estabelecer parâmetros quantitativos no desenvolvimento do coração é reconhecidamente de importância médica e biológica^{6,8-14}. O propósito deste trabalho é comparar as possíveis diferenças quantitativas na composição e na estrutura miocárdica entre fetos do 2º e do 3º trimestres de gestação.

Métodos

Foram estudados 36 fetos humanos com idades entre 11 e 36 semanas de gestação. As idades gestacionais estão discriminadas na tabela I. Os fetos foram obtidos de abortos espontâneos com morte devido a prematuridade ou por asfixia perinatal. Somente foram utilizados fetos que encontravam-se em perfeito estado de conservação (sem anomalia congênita aparente ou edema), provenientes do Hospital Universitário Pedro Ernesto (RJ), do Instituto Municipal da Mulher Fernando de Magalhães (RJ) e do Hôpital Cochin (Paris).

A idade dos fetos foi determinada através do estudo do comprimento do maior pé^{15,16}. Em seguida, procedeu-se a abertura do tórax e a retirada do coração, seccionando-se os

Tabela I - Distribuição da amostra de fetos por semanas de gestação.

Intervalo (semanas)	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
2º trimestre		
10,1-12	2	5,6
12,1-14	4	11,1
14,1-16	3	8,3
16,1-18	4	11,1
18,1-20	6	16,7
20,1-22	4	11,1
22,1-24	3	8,3
	Total = 26	
3º trimestre		
24,1-26	1	2,8
26,1-28	2	5,6
28,1-30	2	5,6
30,1-32	2	5,6
32,1-34	1	2,8
34,1-36	1	2,8
36,1-38	1	2,8
	Total = 10	

vasos da base próximos ao órgão. O peso do coração foi obtido com o órgão imerso em solução salina fisiológica, em um Becker, suspenso por um fio de modo que não tocasse as paredes do recipiente (método de Scherle, usado para conhecer o volume do órgão através da aferição do peso)¹⁷. Em seqüência, vários fragmentos de miocárdio foram retirados da porção profunda da parede livre do ventrículo esquerdo e do septo interventricular. Estes fragmentos foram obtidos segundo a técnica do *ortotrip*¹⁸, de modo a ter cortes aleatórios e uniformemente isotrópicos do miocárdio.

Os fragmentos foram fixados em líquido de Bouin por 12h à temperatura ambiente e depois foram desidratados, clarificados e incluídos em paraplast. Os blocos foram seccionados com 5µm de espessura e coradas pela hematoxilina-eosina e tricrômico de Gomori.

Foram estudadas a densidade de volume (Vv) e a densidade numérica (Nv). Com o Vv analisamos a ocupação relativa de estruturas miocárdicas na área teste (A_T). O Vv do componente contrátil do miocárdio (o volume relativo do miócito no miocárdio, Vv[mio]), foi considerado a célula cardíaca incluindo o núcleo. O Vv do componente não contrátil (o volume relativo do interstício cardíaco, Vv[int]) foi considerado como tecido conjuntivo incluindo vasos e nervos. Estudaram-se 10 campos microscópicos aleatórios do miocárdio de cada feto. O Vv foi determinado por contagem de pontos, considerando-se os pontos que tocavam os miócitos e o interstício cardíaco de acordo com a fórmula^{6,19,20};

$$Vv[\text{estrutura}] = \frac{P[\text{estrutura}]}{P_T}$$

onde Pp[estrutura]= pontos sobre a estrutura em estudo (miócito ou interstício) e P_T=42.

Estimou-se o Nv, número de miócitos por volume de miocárdio (Nv[mio]), de acordo com o método do "disector"^{21,22}, que exige que conheçamos a espessura da microtomia. Deve-se identificar dois campos microscópicos idênticos em cortes consecutivos, cada campo sendo consi-

derado como uma das faces do bloco de tecido. Identificou-se as estruturas que aparecem nas duas faces, mas contou-se aquelas que aparecem apenas numa das faces (a superior, por exemplo, Q), para evitar superestimação. Na prática, estimou-se o Nv observando-se, com objetiva de imersão (x100), os núcleos dos miócitos que apareciam apenas na face superior.

$$Nv = \frac{Q}{e \cdot A_T}$$

sendo e a espessura da microtomia, e A_T a área-teste aplicada sobre as imagens microscópicas. Então, o produto da espessura pela área-teste corresponde ao volume do "disector".

O número total de miócitos cardíacos (N[mio]) foi calculado pelo produto do Nv[mio] e o volume do coração (V[cor]). O volume[cor] foi considerado como o peso cardíaco (P[cor]), uma vez que a gravidade específica (g) da solução salina é aproximadamente 1.0048 e o P[cor] foi aferido usando-se o método de Scherle^{17,19,23}.

$$V[cor] = \frac{P[cor]}{g}; N[mio] = Nv[mio] \cdot V[mio]$$

As diferenças entre os resultados estereológicos, comparando fetos do 2º com fetos do 3º trimestres gestacionais, foram baseados numa análise não-paramétrica para amostras independentes (teste de Mann-Whitney) com nível de significância alfa de 0,05²⁴.

Resultados

Os resultados estão indicados a seguir e apresentados nas figuras 1 e 2. Analisando os resultados do 2º e do 3º trimestres, encontramos algumas diferenças que foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Referindo os valores de média \pm erro padrão da média, temos que: a) o peso cardíaco aumentou de 1,95 \pm 0,16 para 9,10 \pm 0,87g (+366,67%) do 2º para o 3º trimestre, respectivamente; b) o Vv[mio] diminuiu de 85,18 \pm 0,92 para 77,78 \pm 0,93% (-8,69%), respectivamente; c) o Vv[int] aumentou de 14,83 \pm 0,92 para 22,22 \pm 0,93% (+49,83%), respectivamente; d) o Nv[mio] diminuiu de 68,86 \pm 2,40 para 57,40 \pm 2,39 (10⁴)/mm³ (-16,64%); e) o V[mio] aumentou de 1214,38 \pm 134,23 para 1412,31 \pm 151,21 μ m³ (-16,39%); f) N[mio] aumentou de 1,36 \pm 0,18 x 10⁹ para 5,06 \pm 0,61 x 10⁹ miócitos (+272,06%).

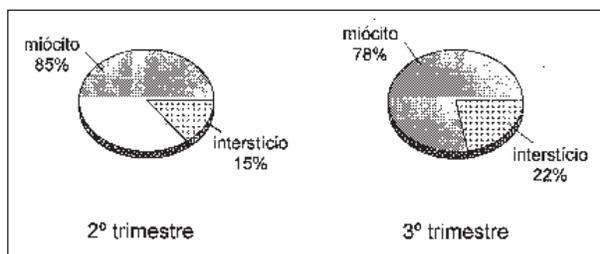


Fig. 1 - Gráficos em setores comparando os volumes parciais dos componentes do miocárdio nos dois últimos trimestres gestacionais: miócito e interstício. Observa-se que há diminuição do componente miócito e aumento do interstício nestes período, ambos significativos.

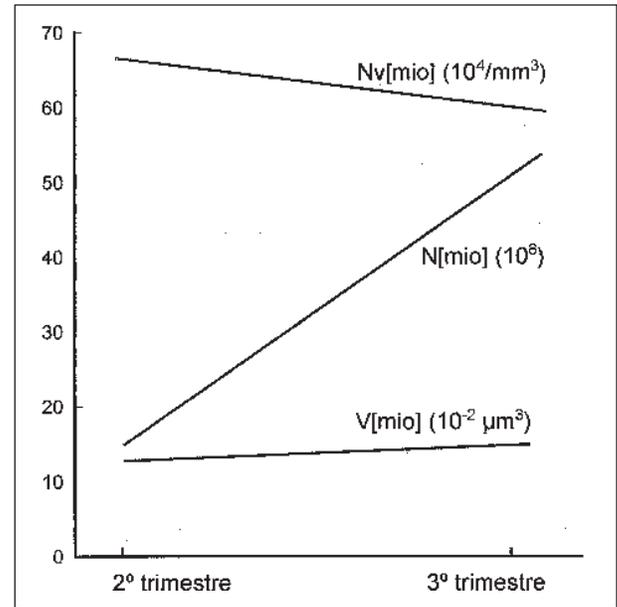


Fig. 2 - Gráfico das tendências quantitativas da densidade numérica de miócitos (Nv[mio]) do número total de miócitos (N[mio]) e do volume médio unitário dos miócitos (V[mio]) no miocárdio de fetos humanos dos dois últimos trimestres gestacionais. Observa-se que há diminuição de Nv[mio] e discreto aumento do V[mio]. O aumento é mais importante para o N[mio].

Discussão

O conhecimento detalhado do crescimento cardíaco no período fetal é importante para compreender melhor o processo patológico de hipertrofia miocárdica, quando há ação de genes fetais.

Em condições fisiológicas há equilíbrio entre a massa de músculo cardíaco e a carga de trabalho imposta ao coração. O aumento crônico da carga hemodinâmica resulta em hipertrofia cardíaca que se caracteriza pelo aumento, além do normal, do tamanho celular e, conseqüentemente, do conteúdo de proteína por célula. Este aumento da síntese protéica está associado com o aumento tanto do ARN mensageiro como do ribossomal. O aumento no ARN total está relacionado a um aumento na taxa de transcrição do ADN e na estabilidade do ARN. Entretanto, a hipertrofia cardíaca é diferente do crescimento cardíaco pós-natal, pois parece que miócitos cardíacos ventriculares reexpressam o fator natriurético atrial (característica que tinha sido perdida durante o desenvolvimento cardíaco pós-natal). Além disso, há a reexpressão de um grupo de proteínas fetais ou isoformas protéicas. Isto tudo configura um retorno a um programa de genes fetais²⁵.

Alguns miócitos cardíacos podem ser binucleados durante o desenvolvimento pré-natal¹⁰. A binucleação de miócitos cardíacos pode levar a uma inconsistência na determinação do Nv[mio] em razão da alta binucleação. Entretanto, o estudo da atividade mitótica em cultura de células musculares cardíacas demonstrou que somente 10 a 15% de células falham ao completar a citocinese e, assim, formam células binucleadas. O restante 85-90% das células cardíacas

cas mitóticas completam a citocinese e produzem duas células filhas²⁶.

O “disector” óptico é um método acurado para determinações do número de núcleos em miócitos cardíacos. Isso permite a definição dentro da secção de corte evitando a superestimação de células binucleadas²¹. O “disector” é livre do efeito de sobreposição e efeito de *lost caps*^{27,28}.

O desenvolvimento cardíaco em humanos, depois da 2ª semana de gestação, é primeiramente causado por aumento no tamanho do miócito ao invés de aumento do número^{9,29}.

No período pós-somático precoce o miocárdio humano tem um número relativamente reduzido de miócitos pequenos e no período pós-somático tardio o miocárdio é composto, principalmente, por miócitos cardíacos grandes. O pequeno aumento em volume do miocárdio ventricular observado no estágio 23 parece não estar ligado ao aumento da porção intersticial do miocárdio, o que sugere haver tanto aumento como divisão de miócitos cardíacos durante o período pós-somático⁶.

Mandarim-de-Lacerda e Pessanha³⁰, encontraram a maior diferença no Nv[mio] entre embriões e entre fetos e neonatos de rato, enquanto a maior diferença no Vv[mio] e Vv[int] foi observada entre neonatos, embriões e fetos. Por outro lado o aumento do N[mio] é maior do que o aumento do peso cardíaco, comparando fetos com neonatos, sugerindo

que existe uma grande proliferação celular neste período.

Mandarim-de-Lacerda¹¹ e Mandarim-de-Lacerda e Souza¹², estudaram o desenvolvimento do miocárdio em embriões humanos e de ratos. Observaram diferentes tendências de crescimento no volume do miocárdio com uma queda em torno do estágio 20 da *Carnegie Institution of Washington*. Depois desse estágio, que corresponde a embriões tardios, o desenvolvimento no volume do miocárdio é maior do que em embriões precoces.

Austin e col¹⁴ estimaram que a média do volume do miócito em neonatos variou entre 1,220.0 e 2,630.0µm³ o que demonstra semelhança com nossos resultados (1,412.31 ± 151.21µm³ em fetos do 3º trimestre).

Em conclusão, durante os dois últimos trimestres gestacionais o peso do coração fetal aumenta em média mais de quatro vezes e meia, enquanto que o volume parcial ocupado pelos miócitos diminui, e, simultaneamente, há aumento no volume parcial ocupado pelo interstício, ocorrendo também uma redução da ordem de 20% na densidade numérica de miócitos no miocárdio fetal humano.

Agradecimentos

Este trabalho foi parcialmente financiado pelo CNPq Proc nº 52.23.73/95.0 e Faperj Proc nº E-26/170.315/95.

Referências

1. Bishop SP - The myocardial cell: normal growth, cardiac hypertrophy and response to injury. *Toxicol Pathol* 1990; 18: 438-53.
2. Anversa P, Palackal T, Sonnenblick EH, Olivetti G, Capasso JM - Hypertensive cardiomyopathy: myocyte nuclei hyperplasia in the mammalian rat heart. *J Clin Invest* 1990; 85: 994-7.
3. Anversa P, Fitzpatrick D, Argani S, Capasso JM - Myocyte mitotic division in the aging mammalian rat heart. *Circ Res* 1991; 69: 1159-64.
4. Chien KR, Zhu H, Knowlton KU et al - Transcriptional regulation during cardiac growth and development. *Ann Rev Physiol* 1993; 55: 77-95.
5. Tokuyasu KT - Co-development of embryonic myocardium and myocardial circulation. In: Clark EB, Takao A, eds - *Developmental Cardiology: Morphogenesis and Function*. Mount Kisco: Futura, 1990: 205-7.
6. Mandarim-de-Lacerda CA, Santos MB, Pessanha MG - Quantitative study of the myocardium in human embryos. *Ann Anat* 1995; 117: 179-84.
7. 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.
8. Zak R - Cell proliferation during cardiac growth. *Am J Cardiol* 1973; 31: 211-19.
9. Zak R - Development and proliferative capacity of cardiac muscle cells. *Circ Res* 1974; 34-35(supl 2): 17-25.
10. Anversa P, Olivetti G, Loud AV - Morphometric study of early post natal development in the left and right ventricular myocardium of the rat. I. Hypertrophy, cellular proliferation and binucleation of myocytes. *Circ Res* 1980; 46: 495-502.
11. Mandarim-de-Lacerda CA - Growth allometry of the myocardium in human embryos (from stages 15 to 23) *Acta Anat* 1991; 141: 251-6.
12. Mandarim-de-Lacerda CA, Souza RMP - The growth of the embryonic rat myocardium (Carnegie stages 13 to 23). *Ital J Anat Embryol* 1994; 99: 43-55.
13. Knaapen MWM, Vrolijk BCM, Wenink ACG - Growth of the myocardial volumes of the individual cardiac segments in the rat embryo *Anat Rec* 1995; 243: 93-100.
14. Austim A, Fagan DG, Mayhew TM - A stereological method for estimating the total number of ventricular myocyte nuclei in fetal and postnatal hearts 1995; 187: 641-7.
15. Streeter GL - Weigh, sitting height, head size, foot length and menstrual age of the human embryo. *Contrib to Embryol Carnegie Inst Washington* 1920; 11: 163-70.
16. Mandarim-de-Lacerda CA - Foot length growth related to crown-rump length, gestational age weight in human staged fresh fetuses. An index for anatomical and medical use. *Surg Radiol Anat* 1990; 12: 103-7.
17. Scherle W - A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie* 1970; 26: 57-63.
18. Mattfeldt T, Møbius HJ, Mall G - Orthogonal triplet probes: an efficient method for unbiased estimation of length and surface of objects with unknown orientation in space. *J Microsc* 1985; 139: 279-89.
19. Weibel ER - *Stereological Methods. Practical Methods for Biological Morphometry*, vol. 1 London: Academic Press 1979: 415.
20. Gundersen HJG, Bagger P, Bendtsen TF et al - The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *Acta Microb Imm Scand* 1988-a; 96: 857-81.
21. Gundersen HJG - The total number of neurons in the human neocortex unbiased estimated using optical disectors. *J Microsc* 1988; 157: 219-27.
22. Cruz-Orive LM, Weibel EW - Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. *Am J Physiol* 1990; 258: 148-56.
23. Aherne WA, Dunnill MS - *Morphometry*. London: Arnold, 1982: 205.
24. Zar JH - *Biostatistical analysis*. Englewood Cliffs: Prentice-Hall 1984: 718.
25. Bilsen M, Chien KR - Growth and hypertrophy of the heart: towards an understanding of cardiac specific and inducible gene expression. *Cardiovasc Res* 1993; 27: 1140-9.
26. Chacko S - DNA synthesis, mitosis, and differentiation in cardiac myogenesis. *Develop Biol* 1973; 35: 1-18.
27. Braendgaard H, Evans SM, Howard CV, Gundersen HJG - The total number of neurons in the human neocortex unbiased estimated using disectors. *J Microsc* 1988; 157: 285-304.
28. Mayhew TM - The new stereological methods for interpreting functional morphology from slices of cells and organs. *Exp Physiol* 1991; 76: 639-65.
29. Bugaisky L, Zak R - Biological mechanisms of hypertrophy. In: Fozzard HJ, ed. *The Heart and Cardiovascular System*. Scientific Foundations. New York: Raven Press, 1986: 57-63.
30. Mandarim-de-Lacerda CA, Pessanha MG - Stereology of the myocardium in embryos, fetuses and neonates of rat. *Acta Anat* 1995; 154: 261-6.