

MARCIA KIYOMI KOIKE

A queda da pressão de perfusão coronariana implica em dano subendocárdico da região do miocárdio remota ao infarto e em disfunção do ventrículo esquerdo

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Emergências Clínicas
Orientador: Prof. Dr. Clovis de Carvalho Frimm

São Paulo

2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Koike, Marcia Kiyomi

A queda da pressão de perfusão coronariana implica em dano subendocárdico da região do miocárdio remota ao infarto e em disfunção do ventrículo esquerdo / Marcia Kiyomi Koike. -- São Paulo, 2006.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Emergências Clínicas.

Orientador: Clovis de Carvalho Frimm.

Descritores: 1.Infarto do miocárdio 2.Endocárdio 3.Necrose 4.Inflamação
5.Glicosaminoglicanos 6.Remodelação ventricular 7.Fibrose

USP/FM/SBD-259/06

Aos meus amados pais

Emiy e Jiro Koike

O doutoramento foi uma fase de muito crescimento profissional e pessoal. Muitas pessoas participaram desse crescimento, de muitas formas, conscientes ou não dessa contribuição. Sou inteiramente grata a todos. Muito obrigada! Algumas pessoas foram fundamentais para o desenvolvimento do trabalho, meu obrigado:

Ao Prof. Dr. Irineu Tadeu Velasco, meu chefe e grande incentivador, por me disponibilizar os recursos do LIM-51 para que eu realizasse os experimentos.

Ao Prof. Dr. Clovis de Carvalho Frimm, por ter sido muito mais que apenas orientador, por ter sempre compartilhado comigo sua presença amiga, companheira, e inteligente. Por sua honestidade e retidão. Por ser um interlocutor disposto a oferecer estímulos e, principalmente, a percorrer novos caminhos, ouvir com interesse e ânimo todas as questões, dúvidas e problemas que surgiam durante o processo de reflexão. Por ser um interlocutor paciente e generoso e pela coragem de ousar trabalhar com novas idéias e conceitos, correndo os riscos inerentes a esta atitude. Por sua amizade, principalmente. Pela compreensão silenciosa dos momentos difíceis pelos quais passei, permitindo que meu tempo interno fluísse, respeitosamente. Pela alegria de trabalharmos juntos.

À Fátima Abatepaulo, por ter sido fundamental para a realização desse trabalho. Foi responsável, amiga, companheira, e muito se esforçou para que esse trabalho se finalizasse a contento.

A todos do LIM-51, à Angélica, Rose e Kátia, por me mostrar que podemos ser além de colegas de trabalho, me mostrando o significado da amizade.

Ao Prof. Dr. Luiz Matsubara, Prof. Dr. Francisco Laurindo e Prof. Dr. Francisco Garcia Soriano, professores participantes da Banca do exame de qualificação, que contribuíram com estímulos, sugestões e críticas fundamentais à reelaboração deste trabalho.

Outras foram fundamentais para o desenvolvimento pessoal; meu obrigado:

Ao Swami Arpana Rantu e todos do Instituto Aum, pelo apoio, respeito, companheirismo, amizade incondicional, que foram fundamentais para minha formação pessoal e científica.

Ao Sensei Alexandre Sallum Bull, que nestes quase dois anos de convivência, sempre esteve presente com amizade, presença inocente, carinhosa e atenta. Por compartilhar conosco, amigos do aikido AAAOC, momentos de alegria, de relaxamento e de Budô.

.....E a todos aqueles, que na sintonia, sentem o quanto me regozijo por estarem presentes em minha vida.

Com amor,

Domo Arigatô Gozaimashita!

Amruta (Marcia Koike)

Lista de abreviaturas e siglas

+dP/dt	Índice de função sistólica - Velocidade máxima de elevação da pressão ventricular durante a sístole
-dP/dt	Índice de função diastólica - Velocidade máxima de queda da pressão ventricular durante a diástole
1d	Seguimento de um dia – Fase aguda 1
3d	Seguimento de três dias – Fase aguda 2
7d	Seguimento de sete dias – Fase sub-aguda
28d	Seguimento de 28 dias – Fase crônica
ANOVA	Análise de variância
AT1	Receptor de angiotensina tipo 1
B2	Receptor da bradicinina tipo 2
Cappesq - HCFMUSP	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FG	Fração de glicosaminoglicanos
FVC	Fração de volume de colágeno
g	grama
i.v.	Intravenoso
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
IM	Animais submetidos ao infarto do miocárdio
kg	Kilograma
mg	Miligrama

mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mm ²	Milímetro quadrado
mmHg	Milímetro de mercúrio
mmHg/s	Milímetro de mercúrio por segundo
PAM	Pressão arterial média
PDF	Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo
PPC	Pressão de perfusão coronariana
PSVE	Pressão sistólica do ventrículo esquerdo
SH	Animais submetidos à cirurgia fictícia
TGF- β	Fator de crescimento tecidual tipo beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral tipo alfa
UI	Unidades
μ m	Micrometro

Lista de gráficos e figuras

Gráfico 1	Área percentual de lesão do subendocárdio remoto ao infarto	16
Gráfico 2	Relação entre a pressão de perfusão coronariana e o índice de expansão do ventrículo esquerdo	21
Gráfico 3	Relação entre a pressão de perfusão coronariana e a morfometria do subendocárdio remoto ao infarto	23
Figura 1	Fotomicrografia do subendocárdio remoto ao infarto de um dia ...	17
Figura 2	Fotomicrografias das lesões do subendocárdio remoto ao infarto..	19
Figura 3	Fotomicrografias ilustrando aumento de glicosaminoglicanos no interstício remoto ao infarto	20

Lista de tabelas

Tabela 1	Dados hemodinâmicos após o infarto, imediatos e ao final dos seguimentos	12
Tabela 2	Dados morfométricos do coração	13
Tabela 3	Dados morfométricos do miocárdio remoto	14
Tabela 4	Relações entre pressão de perfusão coronariana e morfometria do subendocárdio remoto ao infarto	22
Tabela 5	Relações entre pressão de perfusão coronariana e morfometria do interstício remoto ao infarto	24
Tabela 6	Relações entre morfometria do subendocárdio remoto ao infarto e função ventricular	26
Tabela 7	Relações entre morfometria do interstício remoto ao infarto e função ventricular	27

Koike MK. A queda da pressão de perfusão coronariana implica em dano subendocárdico da região do miocárdio remota ao infarto e em disfunção do ventrículo esquerdo [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006.

No infarto, o remodelamento da região ventricular remota tem sido pouco examinado. Previamente, observamos que a redução da pressão de perfusão coronariana (PPC) associa-se ao aparecimento de fibrose subendocárdica. O objetivo do presente estudo foi investigar o papel da PPC no remodelamento e na função ventricular esquerda após o infarto. Medidas hemodinâmicas foram determinadas em ratos Wistar imediatamente após o infarto (IM) ou cirurgia fictícia (SH) e ao final dos seguimentos de 1, 3, 7, e 28 dias. Cortes teciduais do coração foram submetidos a coloração com HE, *Sirius red*, e a imunohistoquímica para α -actina. Duas regiões distintas do ventrículo esquerdo remotas ao infarto foram examinadas: subendocárdio (SE) e interstício (INT). A necrose de miócitos, a infiltração leucocitária e de miofibroblastos, e a fração de volume do colágeno foram determinadas. Comparados com SH, os grupos IM apresentaram menor PPC e disfunção sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo. A necrose foi evidente em SE no dia 1. A inflamação e a fibroplasia ocorreram predominantemente em SE até o dia 7. A fibrose foi restrita a SE e evidente desde o dia 3. Em INT, a inflamação ocorreu predominantemente nos dias 1 e 3, mas em menor grau comparada a SE. A queda da PPC associou-se à dilatação progressiva do ventrículo esquerdo. Em SE, a PPC relacionou-se inversamente com a necrose ($r=-0,65$, $p=0,003$, no dia 1), com a inflamação ($r=-0,76$, $p < 0,001$, no dia 1), com a fibroplasia ($r=-0,47$, $p=0,04$, no dia 7) e com a fibrose ($r=-0,83$, $p < 0,001$, no dia 28). A necrose no dia 1, a inflamação nos dias 3 e 7 e a fibroplasia no dia 7 relacionaram-se inversamente com a

função do ventrículo esquerdo. A PPC é um fator determinante da integridade de SE e interfere com o remodelamento e a função do ventrículo esquerdo.

Descritores: 1. Infarto do miocárdio 2. Endocárdio 3. Necrose 4. Inflamação 5. Glicosaminoglicanos 6. Remodelação ventricular 7. Fibrose

Koike MK. Low coronary driving pressure early in the course of myocardial infarction determines subendocardial remodeling and left ventricular dysfunction [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2006.

Left ventricular (LV) subendocardial remodeling has been poorly investigated after myocardial infarction. Previously, we have demonstrated that low coronary driving pressure (CDP) early in the course of infarction was associated with the subsequent development of subendocardial fibrosis. The present study aimed at the investigation of the role of CDP in LV remodeling and function following infarction. Hemodynamics were determined in Wistar rats immediately after infarct surgery (MI group) or sham (SH group) and at days 1, 3, 7, and 28. Heart tissue sections were stained with HE, Sirius red and immunostained for α -actin. Two distinct LV regions remote to MI were examined: subendocardium (SE) and interstitium (INT). Myocyte necrosis, leukocyte and myofibroblast infiltration, and collagen volume fraction were determined. Compared with SH, MI groups showed lower CDP and LV systolic and diastolic dysfunction. Necrosis was evident in SE at day 1. Inflammation and fibroplasia occurred predominantly in SE as far as day 7. Fibrosis was restricted to SE and was evident beginning from day 3. Inflammation occurred predominantly at days 1 and 3 in INT, but at a lower extent than in SE. CDP fall was associated with progressive LV dilatation. In SE, CDP correlated inversely with necrosis ($r=-0.65$, $p=0.003$, at day 1), inflammation ($r=-0.76$, $p < 0.001$, at day 1), fibroplasia ($r=-0.47$, $p=0.04$, at day 7) and fibrosis ($r=-0.83$, $p < 0.001$, at day 28). Necrosis at day 1, inflammation at days 3 and 7, and fibroplasia at day 7 correlated inversely with LV function. CDP is a key factor to SE integrity following infarction and interferes with LV remodeling and function.

Descriptors: 1. Myocardial infarction 2. Endocardium 3. Necrosis 4.
Inflammation 5. Glycosaminoglycans 6. Ventricular remodeling 7. fibrosis

Lista de abreviaturas e siglas	
Lista de gráficos e figuras	
Lista de tabelas	
Resumo	
Summary	
Introdução	1
Objetivos	3
Materiais e Métodos	
<i>Modelo biológico</i>	4
<i>Avaliação hemodinâmica</i>	5
<i>Modelo experimental de infarto do miocárdio</i>	6
<i>Morfometria do coração</i>	7
<i>Morfometria do miocárdio remoto ao infarto</i>	8
<i>Análise estatística dos resultados</i>	10
Resultados	
<i>Hemodinâmica</i>	11
<i>Morfometria do coração</i>	11
<i>Morfometria do miocárdio remoto ao infarto</i>	11
<i>Relação entre a PPC e a morfometria do miocárdio remoto ao infarto</i>	
Expansão ventricular esquerda	18

Subendocárdio	18
Interstício	18
<i>Relação entre a morfometria do miocárdio remoto e a função ventricular esquerda</i>	
Subendocárdio	25
Interstício	25
Discussão	28
<i>Limitações</i>	31
<i>Implicações clínicas</i>	33
Conclusões	34
Referências Bibliográficas	35

Introdução

O remodelamento cardíaco é reconhecido pelo conjunto de alterações da expressão genômica, molecular e celular que se manifesta clinicamente por alterações do tamanho, forma e função do coração submetido a uma determinada injúria¹.

No infarto do miocárdio, o remodelamento é caracterizado pela formação da cicatriz de reparação tecidual e pela dilatação ventricular, com hipertrofia dos miócitos remanescentes e alterações da matriz extracelular². No interstício do miocárdio remoto ao infarto, há aumento de fibras colágenas, de proteoglicanos, de glicosaminoglicanos e de glicoproteínas adesivas³⁻⁶. O dano subendocárdico, apesar de conhecido, tem sido pouco examinado⁷⁻⁸.

A etiopatogenia do remodelamento da matriz começa a ser elucidada. Mediadores inflamatórios locais e as citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α ⁹⁻¹³ concorrem para a ativação de metaloproteinases¹⁴⁻¹⁵ e antagonismo de seus inibidores¹⁵, e, assim, promovem dilatação ventricular¹⁶⁻¹⁸. Entre as células inflamatórias, macrófagos e mastócitos podem tanto ativar as metaloproteinases, quanto promover a síntese de TGF- β ¹⁹⁻²⁰. De um lado, há quebra de proteínas da matriz; de outro, há aumento da síntese de fibras colágenas²¹⁻²². O TGF- β também foi associado à transformação fenotípica do fibroblasto cardíaco em miofibroblasto, célula responsável pela síntese das proteínas da matriz²². Neles, foi identificada a presença da enzima de conversão e de receptores AT1 envolvidos na síntese de colágeno²³⁻²⁶. Recentemente, observamos que o antagonismo do receptor B2 da bradicinina reduz a inflamação, a fibroplasia e a fibrose nas regiões remotas ao infarto²⁷.

Há evidências experimentais e clínicas que indicam que a prevenção ou o tratamento do remodelamento beneficiam a função ventricular^{3, 28-31}. De tal

forma, a interferência sobre o sistema renina angiotensina^{24, 32-33}, endotelinas³⁴, sistema adrenérgico³⁵ e mediadores inflamatórios³⁶⁻³⁹ resulta em remodelamento reverso, com menos fibrose intersticial e melhora da função. No entanto, estas interferências podem ser deletérias, dependendo da fase do infarto em que são introduzidas^{28, 36-38}. Visto que a mudança hemodinâmica que estes tratamentos promovem foi pouco estudada à luz do remodelamento, é possível conjecturar influências negativas se a perfusão do miocárdio for comprometida. De fato, em trabalho prévio, observamos que a diminuição da pressão de perfusão coronariana (PPC) imediatamente após o infarto associa-se a fibrose do subendocárdio remoto na fase crônica⁸. Assim, uma menor PPC pode potencialmente levar à disfunção ventricular³⁶. É possível que a melhora da função ventricular secundária ao tratamento com inibidores da enzima de conversão da angiotensina não seja necessariamente efeito direto da prevenção da fibrose intersticial, mas decorrer de um aumento da PPC, com melhora da perfusão subendocárdica. Neste sentido, a diminuição da fibrose intersticial poderia não ser causa, mas efeito secundário da prevenção do remodelamento.

Objetivos

Investigar o remodelamento da matriz extracelular quanto à presença e/ou desenvolvimento de necrose, de inflamação, de fibroplasia e de fibrose nas regiões miocárdicas do ventrículo esquerdo remotas ao infarto, considerando-se separadamente o subendocárdio e o interstício.

Investigar o papel da PPC sobre o remodelamento destas duas regiões e sobre a dilatação ventricular.

Investigar se há interferência do remodelamento subendocárdico sobre a função do ventrículo esquerdo.

Materiais e Métodos

Modelo Biológico

Este estudo foi realizado de acordo com as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e pelo *The Universities Federation for Animal Welfare* e o protocolo experimental foi aprovado pela Cappesq-HCFMUSP (n^o 723/02).

Ratos Wistar machos, pesando entre 300-350 g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo foram utilizados. Os animais foram submetidos a ligadura da artéria coronária esquerda e quatro grupos de infarto (IM) foram constituídos e comparados com seus respectivos controles *sham* (SH), conforme o tempo de seguimento:

- fase aguda 1: grupos IM1d (n=9) e SH1d (n=9), um dia de seguimento
- fase aguda 2: grupos IM3d (n=15) e SH3d (n=16), três dias de seguimento
- fase sub-aguda: grupos IM7d (n=9) e SH7d (n=10), sete dias de seguimento
- fase crônica: grupos IM28d (n=11) e SH28d (n=11), 28 dias de seguimento

A avaliação hemodinâmica foi realizada 30 minutos após o infarto e repetida ao final de cada seguimento.

Os corações foram estudados histomorfometricamente quanto a: tamanho do infarto, dilatação do ventrículo esquerdo, hipertrofia dos miócitos, necrose de miócitos, inflamação, glicosaminoglicanos, fibroplasia e fibrose. Duas regiões do miocárdio remoto ao infarto foram examinadas, separadamente: subendocárdio e interstício. Em todos os grupos, a área percentual de lesão do subendocárdio foi calculada.

Avaliação Hemodinâmica

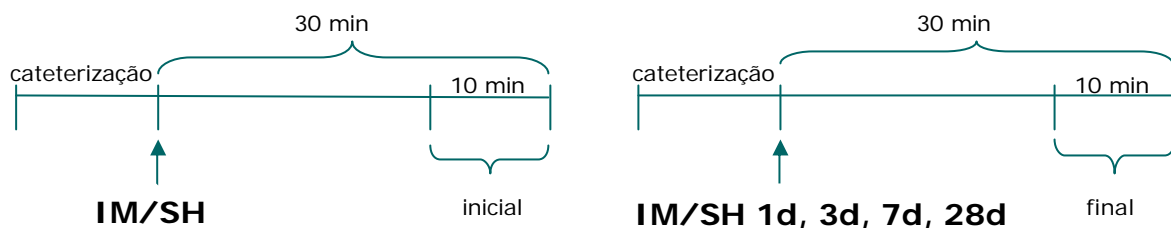
As medidas hemodinâmicas foram realizadas sob anestesia intraperitoneal com pentobarbital sódico (25 mg/kg) e cloridrato de cetamina (50 mg/kg). Para as medidas das pressões sistêmicas, foi realizada a canulação da artéria femoral esquerda com um catéter de policloreto de vinila (0,01 mm de diâmetro), preenchido com solução fisiológica heparinizada (0,1 ml, 100 UI, Roche), avançado até a aorta abdominal. O catéter foi acoplado a um transdutor de pressão para identificação da curva de pressão arterial sistêmica.

Para as medidas das pressões do ventrículo esquerdo, foi realizada a canulação da artéria carótida direita, logo após a bifurcação, ocluindo-se o outro ramo, temporariamente. Tal procedimento visou preservar a artéria carótida para a medida hemodinâmica do final do seguimento. Um catéter de policloreto de vinila (0,05 mm de diâmetro), também preenchido com solução fisiológica heparinizada, foi introduzido até o ventrículo esquerdo e acoplado ao transdutor de pressão para identificação e registro das curvas hemodinâmicas ventriculares.

Os transdutores de pressão, então, foram acoplados a um pré-amplificador calibrado (General Purpose Amplifier 4 – modelo 2, Stemtech Inc., Wiscowsin, EUA) e a um sistema computadorizado de aquisição (Windaq/Dataq, Dataq Instruments Inc., Akron, Ohio, EUA). As medidas hemodinâmicas sistêmicas e ventriculares foram registradas, simultaneamente, batimento a batimento.

A seguir, os animais foram entubados oro-traquealmente com Jelco 14G e submetidos a ventilação mecânica (Rodent Ventilator, modelo 683, Harvard, EUA) com frequência de 60 ciclos/min e volume corrente de 10 mL/kg.

Registros hemodinâmicos de 10 minutos de duração foram computados após a estabilização das curvas, 30 minutos após o infarto e ao final do seguimento, sob as mesmas condições, conforme o esquema a seguir:



Foram consideradas: a pressão arterial média (PAM, mmHg), a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDF, mmHg), a pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE, mmHg), a velocidade máxima de elevação da pressão ventricular durante a sístole ($+dP/dt$, mmHg/s) e a velocidade máxima de queda da pressão ventricular durante a diástole ($-dP/dt$, mmHg/s). A $+dP/dt$ foi utilizada como índice de função sistólica e a $-dP/dt$ como índice de função diastólica do ventrículo esquerdo.

A PPC (mmHg) foi calculada pela diferença entre a PAM e a PDF, batimento-a-batimento⁴¹⁻⁴² e utilizada para estimar o gradiente de pressão do fluxo arterial coronariano.

Modelo Experimental de Infarto do Miocárdio

A técnica de infarto em ratos utilizada foi uma modificação daquela descrita por Selye et al (1960)⁴³. Sob ventilação assistida, uma incisão transversal da pele foi realizada sobre o hemitórax esquerdo para exposição dos músculos peitorais, os quais foram delicadamente afastados. A seguir, a toracotomia esquerda foi realizada ao nível do terceiro espaço intercostal para visibilização da parede ântero-lateral do ventrículo esquerdo próxima à base do coração. Após pericardiotomia, a artéria coronária esquerda foi localizada na região entre o átrio esquerdo e a emergência da artéria pulmonar. A ligadura da artéria foi realizada com fio de *nylon* 6.0, um a dois mm após a origem. A isquemia resultante pôde ser verificada pelo descoramento muscular da parede livre do ventrículo esquerdo. A parede do tórax foi suturada com fio de algodão 3.0 e o

ar do espaço pleural drenado. Os músculos peitorais foram reposicionados. Quando necessário, os animais receberam xilocaína (2 mg/Kg, i.v.) para o tratamento de arritmias ventriculares.

Os grupos da cirurgia fictícia foram constituídos de animais submetidos aos mesmos procedimentos, porém sem a ligadura da artéria coronária.

Morfometria do coração

Após a avaliação hemodinâmica final, os animais foram sacrificados com cloreto de cádmio (3 ml, 100 mM, Sigma). A seguir, o coração foi perfundido com solução fisiológica 0,9% e fixado com solução tamponada de formol 10%, sob pressão de perfusão correspondente aos valores da pressão diastólica sistêmica.

Os ventrículos foram pesados em conjunto, e os átrios direito e esquerdo pesados separadamente, e os valores normalizados pelo peso corporal (mg/g). A porção equatorial dos ventrículos foi processada em parafina e cortes coronais de 5 μ m de espessura foram montados em lâminas de vidro.

As medidas histomorfométricas foram realizadas utilizando-se um sistema computadorizado de imagens (Leica Q500 iW e Leica DMLS, Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, UK). As áreas da cavidade e da parede do ventrículo esquerdo e do septo interventricular foram determinadas utilizando-se uma lente óptica tele-macro (28-70mm, Tamron, Japão) em cortes corados com hematoxilina-eosina.

O tamanho do infarto (%) foi estimado calculando-se a média dos tamanhos do infarto externo e interno⁴⁴. O infarto externo foi calculado pela razão percentual entre o comprimento da superfície epicárdica com infarto e o comprimento total da superfície epicárdica do ventrículo esquerdo. O infarto interno foi calculado pela razão percentual entre o comprimento da superfície

endocárdica com infarto e o comprimento total da superfície endocárdica do ventrículo esquerdo.

A dilatação do ventrículo esquerdo foi estimada pelo índice de expansão do ventrículo esquerdo, calculado pela razão entre a área da cavidade ventricular esquerda (ca_{VE}) e a área total do ventrículo esquerdo ($total_{VE}$) multiplicada pela razão entre a espessura do septo (L_{septo}) e a espessura da parede com infarto ($L_{infarto}$) ou da parede livre, nos grupos SH, conforme a fórmula abaixo:

$$\text{Índice de expansão} = (ca_{VE} / total_{VE}) \times (L_{septo} / L_{infarto})^{45}$$

Morfometria do miocárdio remoto ao infarto

A morfometria do miocárdio remoto foi realizada, separadamente, em duas regiões distintas: subendocárdio e interstício. O subendocárdio foi definido como o terço endocárdico da parede ventricular sem infarto e o interstício como os dois terços restantes.

A área de lesão do subendocárdio foi estimada pela razão percentual entre a área ocupada por lesão (infiltração celular e colágeno) e a área total da parede ventricular sem infarto, em cortes corados com hematoxilina-eosina.

Para avaliação da hipertrofia dos miócitos foram utilizados cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina, sob aumento de 1000x. A hipertrofia foi medida pelo diâmetro de miócitos em torno do núcleo (μm) em toda a parede ventricular sem infarto. Foram selecionados apenas miócitos em disposição longitudinal e com núcleos ovalados e centralizados.

Para as análises morfométricas seguintes, a região subendocárdica foi considerada na sua totalidade e a região intersticial examinada em 20 campos por corte histológico.

Para estimativa da necrose de miócitos foram utilizados cortes corados com hematoxilina-eosina sob aumento de 1000x. A necrose foi identificada pelo

aspecto do núcleo (picnose ou cariólise) e pelo aspecto do citoplasma (contração de bandas, vacuolização, hipereosinofilia). A necrose de miócitos foi estimada pela razão entre o número de células com alterações nucleares e/ou citoplasmáticas e a área do miocárdio (células/mm²)⁴⁶.

Para estimativa da inflamação, foi determinada a infiltração leucocitária em cortes corados com hematoxilina-eosina sob aumento de 1000x. As células foram identificadas morfológicamente pelo aspecto nuclear e citoplasmático. As células com aspecto morfológico de fibroblasto, de célula endotelial ou de miócito foram identificadas e excluídas da contagem⁴⁷. A infiltração de leucócitos foi estimada pela razão entre o número de leucócitos e a área do miocárdio (células/mm²).

Para a avaliação dos glicosaminoglicanos não-sulfatados foram utilizados cortes histológicos corados com *alcian blue* pH 2.5, sob aumento de 1000x. Esta coloração identifica basicamente o ácido hialurônico⁴⁸. A fração de glicosaminoglicanos (FG, %) foi calculada pela razão percentual entre a área do tecido miocárdico corado positivamente e a área total do miocárdio, campo a campo.

Para a estimativa da fibroplasia, os miofibroblastos foram marcados utilizando-se a técnica imunohistoquímica com anticorpo de camundongo anti- α -actina de células musculares lisas humanas (1:5000). A revelação foi realizada pelo método da diaminobenzidina-peroxidase, seguindo o protocolo descrito pelo fabricante (Sigma, EUA). Os cortes foram contracorados com hematoxilina. A fibroplasia foi estimada pela quantificação do número de células marcadas positivamente para α -actina por área de miocárdio (células/mm²). Apenas células com aspecto alongado, núcleo fracamente basófilo e sem a conformação vascular foram consideradas.

Para a avaliação da fibrose foram utilizados cortes histológicos corados com *Sirius red*⁴⁹, sob aumento de 580x. A fibrose foi estimada pela fração de volume

de colágeno (FVC, %), calculada pela razão percentual entre a área do tecido miocárdico corado positivamente e a área total do miocárdio.

Análise estatística dos resultados

Os resultados foram computados em planilhas do programa *Excel* (*Microsoft® Excel 2002*) e posteriormente analisados utilizando-se o programa *SAS* (*Statistical Analysis System*, versão 8). Os dados estão expressos em média \pm erro-padrão.

Os grupos foram comparados utilizando-se a análise de variância (ANOVA) e a ANOVA para medidas repetidas. A hipótese inicial foi a existência de interação entre os grupos SH e IM e entre os tempos de seguimento. A normalidade de distribuição foi testada para cada uma das variáveis e a transformação logarítmica realizada quando necessário. As comparações múltiplas foram realizadas pela estatística de Wald.

A análise de regressão linear simples foi utilizada para investigar as possíveis associações entre: 1) a PPC e a dilatação ventricular, 2) a PPC e as variáveis morfométricas, e 3) as variáveis morfométricas e a função ventricular.

Resultados

Hemodinâmica

Imediatamente após o infarto, os grupos IM apresentaram comparados aos grupos SH: menor PAM, menor PPC, menor PSVE, maior PDF e disfunção ventricular sistólica e diastólica (tabela 1). Das variáveis hemodinâmicas examinadas, observou-se aumento da $-dP/dt$ nos grupos IM1d, SH7d e IM28d. As demais variáveis não apresentaram modificação estatística em nenhum dos quatro intervalos de seguimento.

No final dos seguimentos, houve menor PAM, PPC, PSVE e $+dP/dt$ e $-dP/dt$ e maior PDF em todos os grupos IM, exceto para a $-dP/dt$ no grupo IM28d.

Morfometria do coração

Os resultados da morfometria do coração estão apresentados na tabela 2. O tamanho do infarto foi comparável entre os quatro grupos estudados. A expansão do ventrículo esquerdo já ocorreu após um dia de infarto e foi maior nas fases sub-aguda e crônica. O peso dos ventrículos foi comparável entre todos grupos SH e IM. A hipertrofia dos miócitos ocorreu em todos grupos IM a partir de um dia de infarto. O peso do átrio esquerdo foi maior em todos os grupos IM. O peso do átrio direito só foi maior no grupo IM28d.

Morfometria do miocárdio remoto ao infarto

Os dados do remodelamento do miocárdio da região remota ao infarto estão apresentados na tabela 3.

Tabela 1 – Dados hemodinâmicos 30 minutos após o infarto e ao final dos seguimentos de um dia, três dias, sete dias e 28 dias.

Grupos	SH1d	IM1d	SH3d	IM3d	SH7d	IM7d	SH28d	IM28d
n	9	9	16	15	10	9	11	11
PAM i	114±4	85±6*	107±3	95±6*	100±6	85±6*	108±3	93±5*
PAM f	111±5	86±6*	101±4	86±5*	101±4	79±8*	97±9	94±4*
PSVE i	132±5	104±6*	126±4	117±6*	123±5	103±6*	127±5	112±5*
PSVE f	133±7	107±6*	125±5	113±5*	128±4	105±8*	127±9	112±4*
PDF i	5,0±0,8	12,6±1,3*	5,4±0,5	11,2±1,3*	5,5±0,7	10,1±1,4*	5,5±0,4	10,2±1,2*
PDF f	5,3±0,8	10,6±1,0*	4,9±0,5	9,1±1,5*	6,0±0,8	13,7±3,4*	7,3±0,5	10,6±2,1*
PPC i	109±4	72±7*	102±4	83±7*	95±6	75±7*	102±3	83±6*
PPC f	106±4	75±5*	96±4	78±4*	95±4	65±9*	90±9	84±5*
+dP/dt i	8310±570	5728±336*	7757±411	6557±518*	7451±718	5374±376*	8045±448	6099±406*
+dP/dt f	7730±602	5907±382*	7432±384	6673±410*	7574±305	4973±639*	7002±665	6065±310*
-dP/dt i	6648±505	3248±300*	6269±405	4112±373*	5446±518	3316±289*	6113±364	3822±384*
-dP/dt f	6840±376	4858±303*†	6524±259	4775±264*	6750±665†	4045±555*	6057±818	5184±512†

SH, grupo sham; IM, grupo infarto; 1d, um dia; 3d, três dias; 7d, sete dias; 28d, 28 dias; i, inicial; f, final; PAM, pressão arterial média; PSVE, pressão sistólica do ventrículo esquerdo; PDF, pressão diastólica final do ventrículo esquerdo; PPC, pressão de perfusão coronariana; +dP/dt, índice de função sistólica do ventrículo esquerdo; -dP/dt, índice de função diastólica do ventrículo esquerdo; *, p <0,05 vs SH; †, p <0,05 inicial vs final.

Tabela 2 – Tamanho do infarto, índice de expansão do ventrículo esquerdo, peso dos ventrículos, diâmetro dos miócitos, peso corpóreo, peso dos átrios direito e esquerdo dos grupos com seguimentos de um dia, três dias, sete dias e 28 dias.

Grupos	SH1d	IM1d	SH3d	IM3d	SH7d	IM7d	SH28d	IM28d
n	9	9	16	15	10	9	11	11
TI (%)		40±4		37±3		37±5		39±5
IEVE	0,22±0,03	0,47±0,08*	0,25±0,03	0,66±0,06*	0,26±0,04	1,32±0,27* ‡	0,25±0,04	1,44±0,38*
PV (mg/g)	5,45±0,23	4,89±0,22	4,69±0,26	3,65±0,30	3,74±0,12	4,00±0,09	3,68±0,13	3,84±0,18
∅ miócitos (µm)	10,69±0,09	11,25±0,26*	9,70±0,30	10,28±0,37* ‡	9,88±0,19	11,67±0,48* ‡‡	9,56±0,21	11,02±0,41* ‡‡
PAE (mg/g)	0,11±0,00	0,15±0,01*	0,10±0,00	0,16±0,01*	0,10±0,01	0,21±0,04*	0,10±0,00	0,15±0,02*
PAD (mg/g)	0,11±0,01	0,13±0,01	0,10±0,00	0,12±0,01	0,10±0,01	0,12±0,01	0,08±0,00	0,15±0,03*
Pcorpo (g)	302±3	301±4	300±3	302±5	322±5	310±3	376±6	380±11

SH, grupo sham; IM, grupo infarto; 1d, um dia; 3d, três dias; 7d, sete dias; 28d, 28 dias; TI, tamanho do infarto; IEVE, índice de expansão do ventrículo esquerdo; PV, peso dos ventrículos; ∅ miócitos, diâmetro dos miócitos; Pcorpo, peso corpóreo ao final do seguimento; PAE, peso do átrio esquerdo; PAD, peso do átrio direito; *, p <0,05 vs SH; ‡, p <0,05 vs IM1d; ‡‡, p <0,05 vs IM3d.

Tabela 3 – Dados morfométricos do miocárdio remoto de um dia, três dias, sete dias e 28 dias após o infarto.

Grupos		SH1d	IM1d	SH3d	IM3d	SH7d	IM7d	SH28d	IM28d
n		9	9	16	15	10	9	11	11
Área percentual de lesão SE (%)		0,4±0,3	8,1±3,4*	0,2±0,2	7,0±2,7*	0,3±0,3	2,8±1,4* ‡‡	0,5±0,3	0,6±0,2* ‡‡‡
Necrose de miócitos (células/mm ²)	SE	575±31†	883±115†*	710±82†	639±67†‡	165±18	290±74†‡‡	128±36	132±22
	INT	290±43	304±68	285±65	319±66	93±31	95±24†‡	38±7	37±12
Leucócitos (células/mm ²)	SE	55±12†	1699±567*†	86±16†	709±163 *†	9±3†	51±13* ‡‡	13±4	42±10*†
	INT	43±9	128±34*	55±7	134±22*	14±3	22±4 ‡‡	9±2	16±3
FG (%)	SE	2,6±0,5	8,8±2,1*†	2,9±0,4†	6,0±1,6*†	1,5±0,1	13,5±5,9*†	1,4±0,1	7,5±1,5*†
	INT	1,7±0,3	2,1±0,3	1,7±0,2	1,3±0,1‡	1,1±0,2	1,9±0,3*	0,8±0,1	1,2±0,1*
Fibroplasia (células/mm ²)	SE	107±34	544±85*	119±25	382±57*‡	69±7	272±80*	144±21	303±59*
	INT								
FVC (%)	SE	0,7±0,1†	0,5±0,1	0,9±0,1†	2,5±0,6*†‡	1,5±0,1†	5,6±1,6*†‡‡	1,0±0,1	3,6±0,8*†
	INT	0,6±0,2	0,5±0,2*	0,7±0,1	1,0±0,1*‡	0,8±0,1	1,1±0,1	0,9±0,1	1,1±0,2

SH, grupo sham; IM, grupo infarto; 1d, um dia; 3d, três dias; 7d, sete dias; 28d, 28 dias; SE, subendocárdio remoto; INT, interstício remoto; FG, Fração de glicosaminoglicanos; FVC, fração de volume de colágeno; *, p<0,05 vs SH; †, p<0,05 vs INT; ‡, p<0,05 vs IM1d; ‡‡, p<0,05 vs IM3d; ‡‡‡, p<0,05 vs IM7d.

Conforme pode ser observado também no gráfico 1, a área percentual de lesão subendocárdica foi mais extensa no seguimento 1d, diminuindo progressivamente até 28d. Este fato correspondeu a um predomínio de infiltração celular ocupando uma área subendocárdica maior nos seguimentos mais precoces, em contraste com a fibrose ocupando uma área subendocárdica relativamente menor nas fases mais tardias.

Comparado ao grupo SH1d, houve necrose no subendocárdio em IM1d, cuja intensidade diminuiu nos demais grupos IM até o sétimo dia de seguimento. Comparados a SH, nos grupos IM não houve maior necrose no interstício. No subendocárdio, a necrose foi duas a três vezes maior do que no interstício até o sétimo dia de seguimento. Na figura 1, estão representados os sinais de picnose, cariólise, vacuolização citoplasmática e contração de bandas, que caracterizam a necrose de coagulação de miócitos⁴⁶.

A infiltração leucocitária foi maior na região subendocárdica dos grupos IM comparados aos SH nos seguimentos 1d, 3d, 7d e 28d. No interstício, a infiltração leucocitária foi menos evidente, porém ainda mais pronunciada nos grupos IM1d e IM3d comparados aos respectivos controles. Nos grupos IM, a infiltração leucocitária no subendocárdio foi máxima nos seguimentos 1d e 3d, diminuiu em 7d, e não mais se modificou. Do mesmo modo, a infiltração leucocitária no interstício foi máxima nos seguimentos 1d e 3d, diminuiu em 7d, e não mais se modificou.

O aumento da FG foi também predominante na região subendocárdica dos grupos IM comparados aos SH em todos os seguimentos. Este aumento não se modificou com o seguimento. No interstício, FG foi maior nos grupos IM7d e IM28d comparados aos seus respectivos controles.

Os miofibroblastos foram identificados quase que exclusivamente na região subendocárdica, onde o seu número foi de 3 a 5 vezes maior nos grupos IM comparados aos respectivos SH, independentemente do tempo de seguimento.

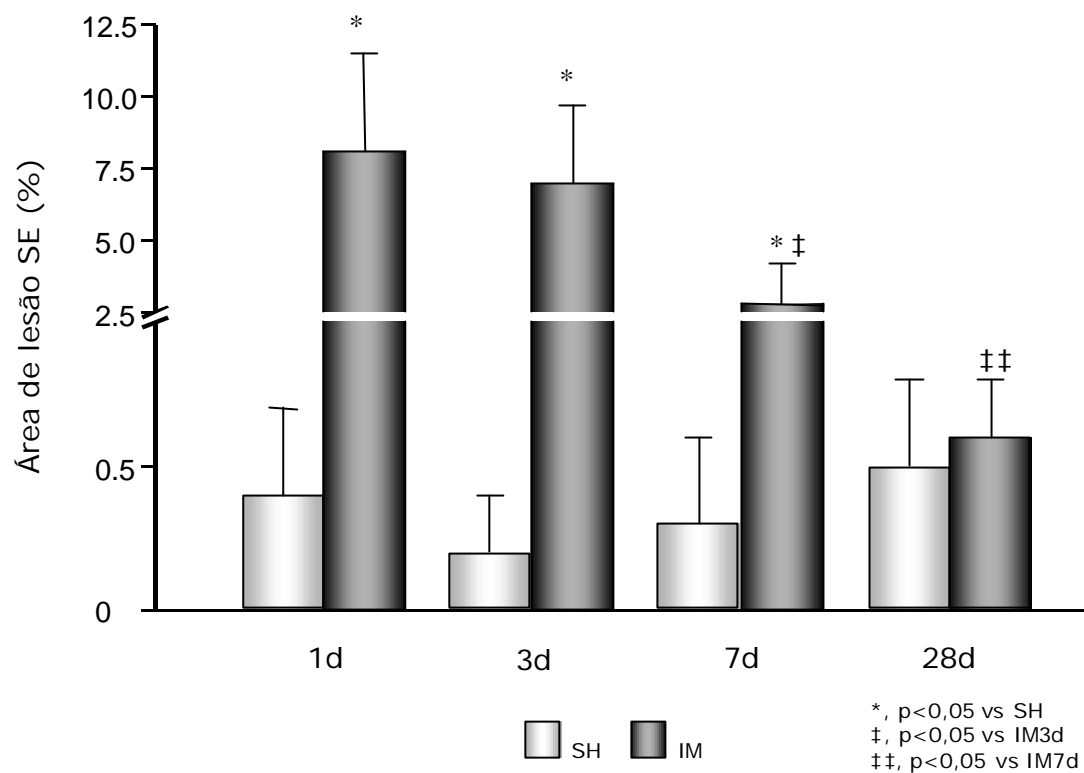


Gráfico 1 – Área percentual de lesão do subendocárdio (SE) remoto ao infarto nos grupos com infarto (IM) e sham (SH), nos seguimentos estudados de 1 dia (1d), 3 dias (3d), 7 dias (7d) e 28 dias (28d).

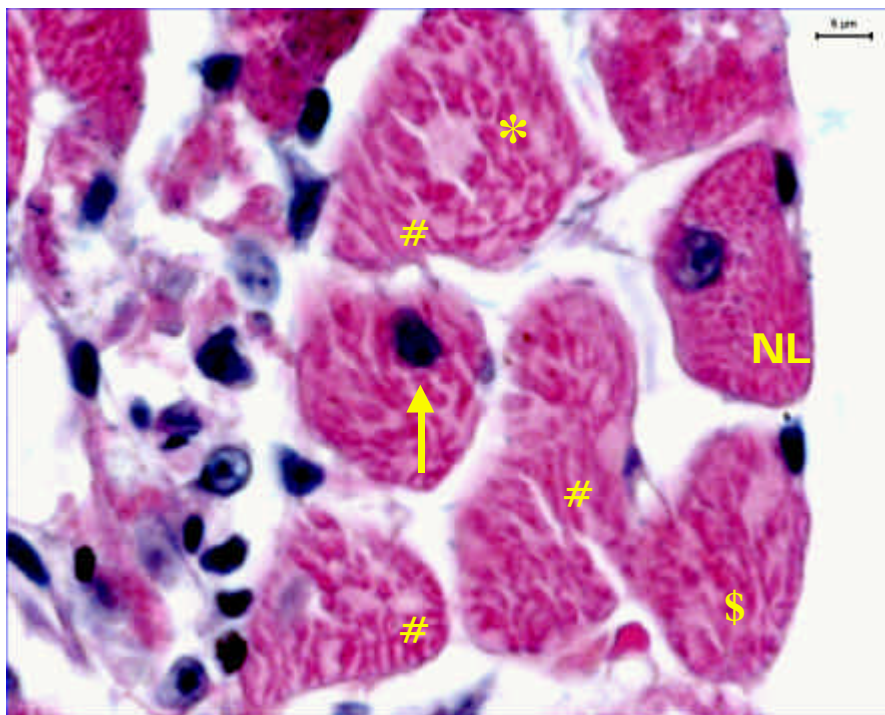


Figura 1 – Fotomicrografia da região subendocárdica do ventrículo esquerdo remota ao infarto de um dia (HE). Observam-se infiltração leucocitária, miócitos íntegros (NL) e miócitos com sinais de necrose, evidenciada pelas seguintes características: núcleo picnótico (seta), cariólise (*), vacuolização citoplasmática (\$) e contração de bandas (#).

Os maiores números foram observados no seguimento 1d, caíram 30% no seguimento 3d, e então estabilizaram-se.

O aumento da FVC observado nos grupos IM comparados a SH foi mais uma vez predominante na região subendocárdica e observado a partir do seguimento 3d. No interstício, a deposição de fibrose foi muito menos evidente e não diferiu entre os grupos IM e SH.

Na figura 2, estão representadas as alterações patológicas observadas no subendocárdio da região remota ao infarto. A figura 3 ilustra o aumento dos glicosaminoglicanos no interstício da região remota ao infarto.

Relação entre a PPC e a morfometria do miocárdio remoto ao infarto

Expansão ventricular esquerda

Houve relação inversa entre a PPC medida imediatamente após o infarto e a expansão ventricular nos seguimentos 1d, 3d, 7d, e 28d (gráfico 2).

Subendocárdio

Os coeficientes de correlação entre a PPC e a morfometria do subendocárdio remoto ao infarto estão apresentados na tabela 4.

A PPC medida imediatamente após o infarto apresentou correlação inversa com a necrose subendocárdica no seguimento 1d; com o infiltrado leucocitário nos seguimentos 1d, 3d, e 7d; com a FG nos seguimentos 1d e 28d; com a fibroplasia em todos os seguimentos; e, com a FVC nos seguimentos 7d e 28d (gráfico 3).

Interstício

Houve relação inversa da PPC medida imediatamente após o infarto com o infiltrado leucocitário intersticial nas fases agudas e da PPC medida imediatamente após o infarto tanto com a FG, quanto com a FVC, nas fases sub-aguda e crônica (tabela 5).

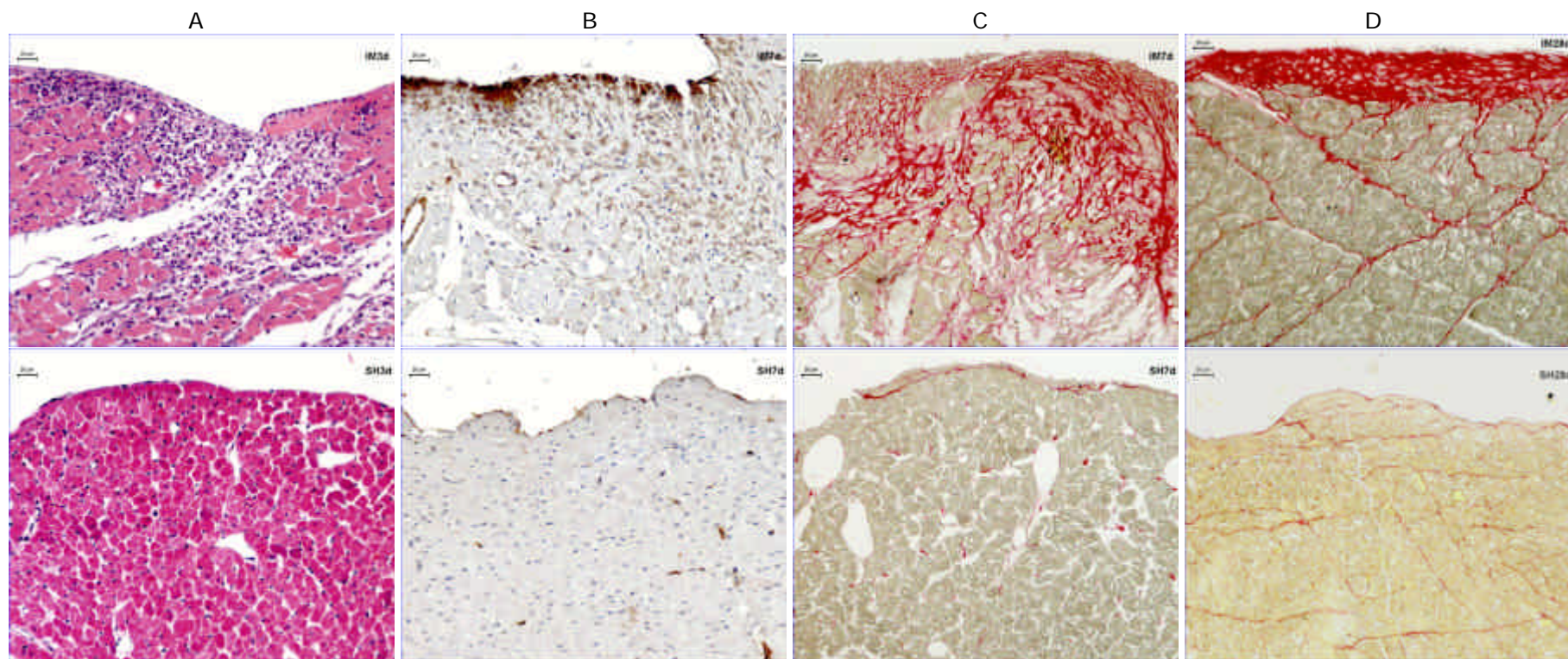


Figura 2 – Fotomicrografias da região subendocárdica do ventrículo esquerdo remota ao infarto. Estão representados nos painéis superiores os infartos de 3, 7 e 28 dias (IM3d, IM7d e IM28d, respectivamente). Nos painéis inferiores, estão representados os respectivos controles (SH3d, SH7d e SH28d). Notam-se em IM: na coluna A, infiltrado leucocitário (HE); na coluna B, fibroplasia com miofibroblastos corados em marrom (imunohistoquímica para α -actina); e na coluna C e D, fibrose (*Sirius red*).

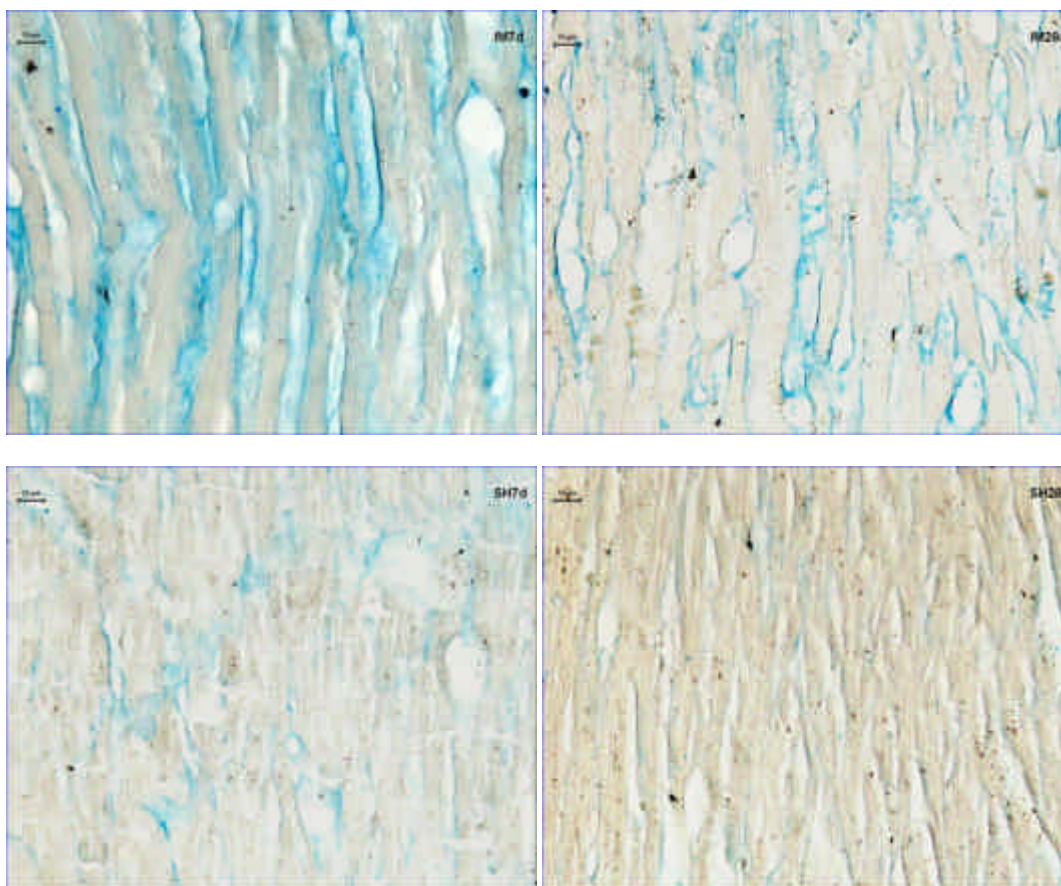


Figura 3 – Fotomicrografias da região intersticial do ventrículo esquerdo remota ao infarto. Estão representados nos painéis superiores infartos de 7 e 28 dias (IM7d e IM28d, respectivamente) e nos painéis inferiores, os respectivos controles (SH7d e SH28d). Nota-se em IM, aumento de glicosaminoglicanos entre os miócitos, representados pela coloração azul turquesa (*alcian blue*).

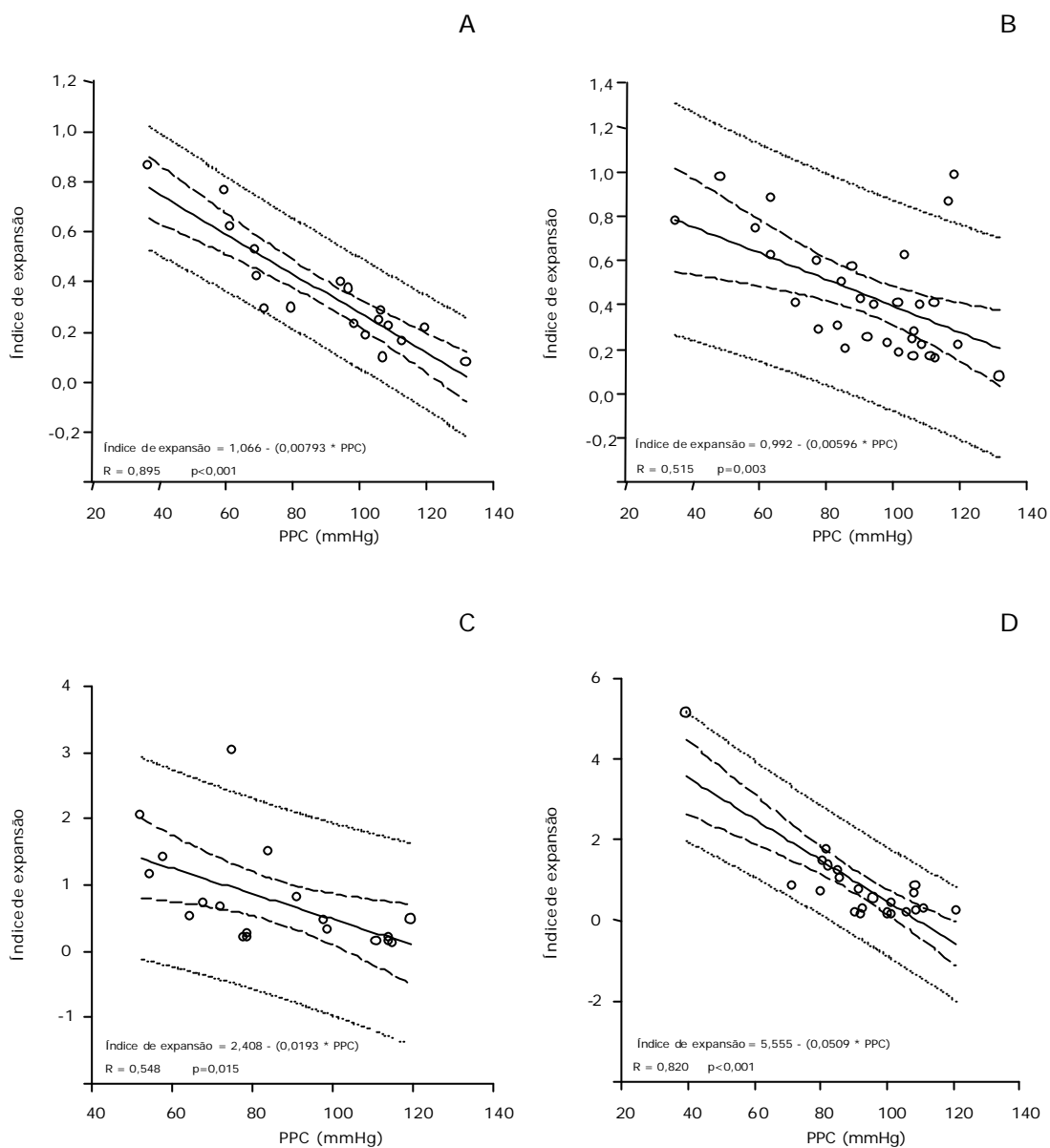


Gráfico 2 – Relação entre a pressão de perfusão coronária imediatamente após o infarto e o índice de expansão do ventrículo esquerdo. Em A, seguimento de um dia; B, seguimento de 3 dias; C, seguimento de sete dias; D, seguimento de 28 dias.

Tabela 4 – Coeficientes de correlação e valores de p obtidos na análise das relações entre a pressão de perfusão coronariana imediatamente após o infarto e a morfometria do subendocárdio remoto ao infarto nos seguimentos de um dia, três dias, sete dias e 28 dias.

Tempo de seguimento	Necrose (células/mm ²)		Infiltrado leucocitário (células/mm ²)		FG (%)		Fibroplasia (células/mm ²)		FVC (%)	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
1 dia	-0,65	0,003	-0,76	<0,001	-0,65	0,004	-0,67	0,002		ns
3 dias		ns	-0,44	0,01		ns	-0,38	0,04		ns
7 dias		ns	-0,53	0,02		ns	-0,47	0,04	-0,50	0,03
28 dias		ns		ns	-0,58	0,01	-0,46	0,04	-0,83	<0,001

FG, fração de glicosaminoglicanos; FVC, fração de volume de colágeno; ns, não significativa.

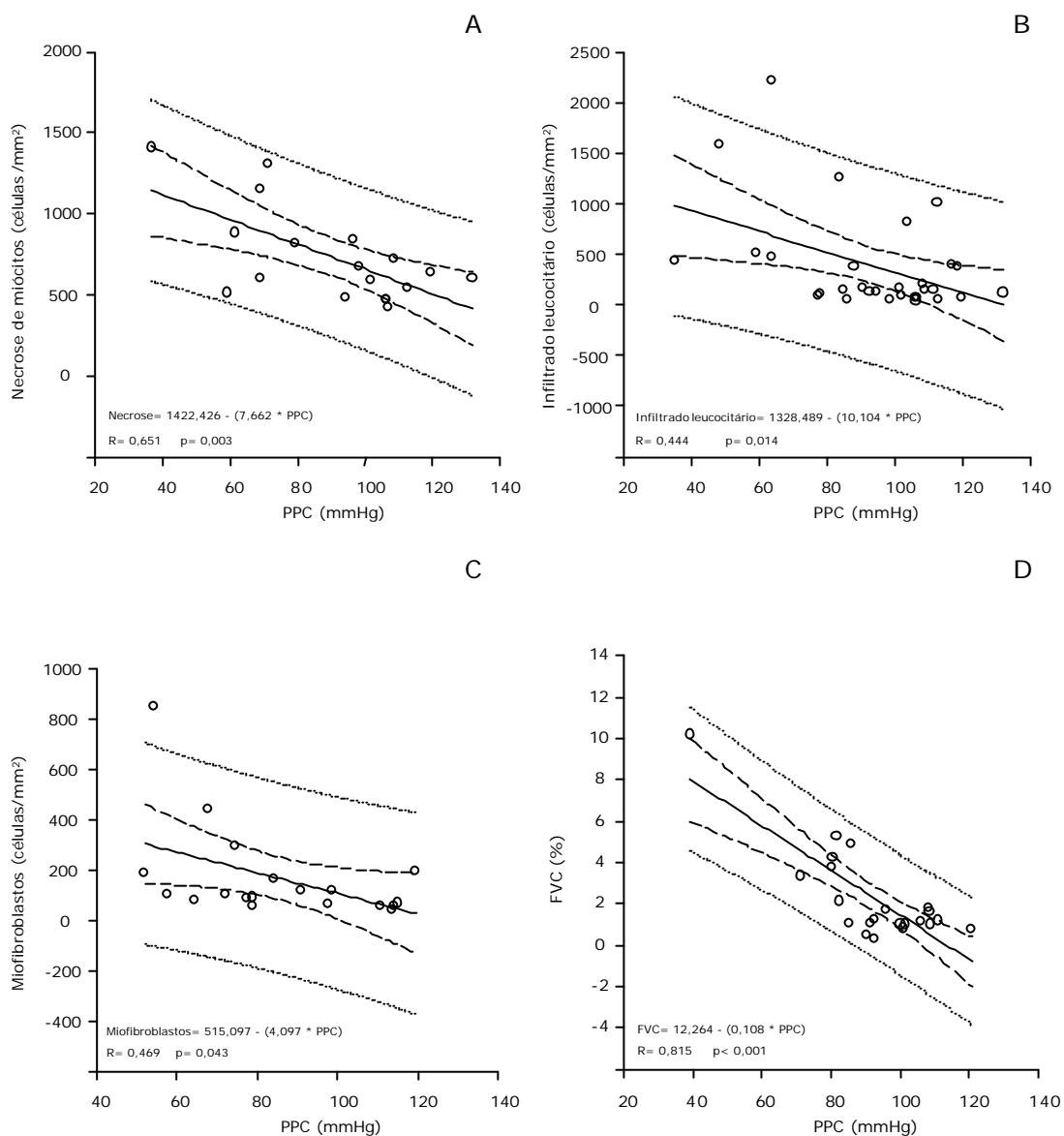


Gráfico 3 – Relação entre a pressão de perfusão coronariana imediatamente após o infarto (PPC i) e a morfometria do subendocárdio remoto ao infarto. Em A, necrose de miócitos, seguimento de 1 dia; B, infiltrado leucocitário, seguimento de três dias; C, Fibroplasia, seguimento de sete dias; D, fração de volume de colágeno (FVC), seguimento de 28 dias.

Tabela 5 – Coeficientes de correlação e valores de p obtidos na análise das relações entre a pressão de perfusão coronariana e a morfometria do interstício remoto ao infarto nos seguimentos de um dia, três dias, sete dias e 28 dias.

Tempo de seguimento	Necrose (células/mm ²)		Infiltrado leucocitário (células/mm ²)		FG (%)		FVC (%)	
	r	p	r	p	r	p	r	p
1 dia		ns		ns		ns		ns
3 dias		ns	-0,40	0,03		ns		ns
7 dias		ns		ns	-0,48	0,04	-0,59	0,01
28 dias		ns		ns	-0,51	0,02	-0,54	0,01

FG, fração de glicosaminoglicanos; FVC, fração de volume de colágeno; ns, não significativa.

Relação entre a morfometria do miocárdio remoto e a função ventricular esquerda

Subendocárdio

Os coeficientes de correlação entre a morfometria do subendocárdio remoto ao infarto e a função do ventrículo esquerdo estão apresentados na tabela 6.

Houve relação inversa da necrose de miócitos com a $-dP/dt$ no seguimento 1d. Houve relação inversa do infiltrado leucocitário nos seguimentos 3d e 7d com a $+dP/dt$ e com a $-dP/dt$. Houve relação inversa da fibroplasia com a $-dP/dt$ nas fases agudas e sub-agudas e com a $+dP/dt$ somente na fase sub-aguda. Houve relação inversa da FG com a $+dP/dt$ no seguimento 7d e com a $-dP/dt$ nos seguimentos 1d e 7d. Houve relação inversa da FVC com a $+dP/dt$ no seguimento 7d e com a $-dP/dt$ nos seguimentos 3d e 7d.

Interstício

Houve relação inversa do infiltrado leucocitário com a $+dP/dt$ no seguimento 7d e com a $-dP/dt$ nos seguimentos 1d, 3d, e 7d. Houve relação inversa da FG com a $+dP/dt$ nos seguimentos 7d e 28d e com a $-dP/dt$ no seguimento 7d (tabela 7).

Tabela 6 – Coeficientes de correlação e valores de p obtidos na análise das relações entre a morfometria do subendocárdio remoto ao infarto e a função ventricular nos seguimentos de um dia, três dias, sete dias e 28 dias.

	Tempo de seguimento	+dP/dt (mmHg/s)		-dP/dt (mmHg/s)	
		r	p	r	p
Necrose de miócitos (células/mm ²)	1 dia		ns	-0,53	0,02
	3 dias		ns		ns
	7 dias		ns		ns
	28 dias		ns		ns
Infiltrado leucocitário (células/mm ²)	1 dia		ns		ns
	3 dias	-0,51	0,004	-0,65	<0,001
	7 dias	-0,52	0,02	-0,46	0,02
	28 dias		ns		ns
Fibroplasia (células/mm ²)	1 dia		ns	-0,61	0,007
	3 dias		ns	-0,72	<0,001
	7 dias	-0,55	0,01	-0,55	0,01
	28 dias		ns		ns
FG (%)	1 dia		ns	-0,48	0,04
	3 dias		ns		ns
	7 dias	-0,63	0,004	-0,54	0,02
	28 dias		ns		ns
FVC (%)	1 dia		ns		ns
	3 dias		ns	-0,50	0,01
	7 dias	-0,55	0,02	-0,47	0,04
	28 dias		ns		ns

+dP/dt, índice de função sistólica do ventrículo esquerdo; -dP/dt, índice de função diastólica do ventrículo esquerdo; FG, fração de glicosaminoglicanos; FVC, fração de volume de colágeno; ns, não significante.

Tabela 7 – Coeficientes de correlação e valores de p obtidos na análise das relações entre a morfometria do interstício remoto ao infarto e a função ventricular nos seguimentos de um dia, três dias, sete dias e 28 dias.

	Tempo de seguimento	+dP/dt (mmHg/s)		-dP/dt (mmHg/s)	
		r	p	r	p
Necrose de miócitos (células/mm ²)	1 dia		ns		ns
	3 dias		ns		ns
	7 dias		ns		ns
	28 dias		ns		ns
Infiltrado leucocitário (células/mm ²)	1 dia		ns	-0,83	<0,001
	3 dias		ns	-0,42	0,02
	7 dias	-0,50	0,03	-0,46	0,05
	28 dias		ns		ns
FG (%)	1 dia		ns		ns
	3 dias		ns		ns
	7 dias	-0,47	0,04	-0,63	0,004
	28 dias	-0,51	0,03		ns
FVC (%)	1 dia		ns		ns
	3 dias		ns		ns
	7 dias		ns		ns
	28 dias		ns		ns

+dP/dt, índice de função sistólica do ventrículo esquerdo; -dP/dt, índice de função diastólica do ventrículo esquerdo; FG, fração de glicosaminoglicanos; FVC, fração de volume de colágeno; ns, não significativa.

Discussão

O presente estudo mostrou que há diminuição da PPC e disfunção ventricular imediatamente após o infarto, que persistem por pelo menos até quatro semanas. Nas regiões remotas ao infarto do ventrículo esquerdo observaram-se no subendocárdio: necrose de miócitos, infiltrado leucocitário, aumento de glicosaminoglicanos, fibroplasia e fibrose; no interstício: infiltrado leucocitário e aumento de glicosaminoglicanos.

A PPC relacionou-se inversamente com a expansão ventricular esquerda em todos seguimentos estudados.

No subendocárdio, a PPC relacionou-se inversamente com a necrose de miócitos, com o infiltrado leucocitário, com a fibroplasia, com a FG e com a FVC nos intervalos em que cada tipo específico de lesão foi, em geral, mais evidente. No interstício, a PPC relacionou-se inversamente com o infiltrado leucocitário nas fases agudas, e com a FG e com a FVC nas fases sub-aguda e crônica após o infarto.

As alterações do subendocárdio relacionaram-se inversamente com a função ventricular, particularmente com a $-dP/dt$ nas fases agudas e sub-aguda e com a $+dP/dt$ na fase sub-aguda. As alterações do interstício, representadas pela inflamação e pelo aumento de glicosaminoglicanos, também se relacionaram inversamente com a função ventricular. Na fase crônica, apenas o aumento de glicosaminoglicanos intersticiais relacionou-se à disfunção ventricular. Não houve correlação da FVC nem com a $-dP/dt$, nem com a $+dP/dt$ em nenhum dos intervalos estudados.

As alterações hemodinâmicas observadas, com aumento da PDF e queda da $+dP/dt$ e da $-dP/dt$, são características de infartos de grande magnitude, aos quais se associa o remodelamento ventricular⁵⁰⁻⁵¹. De fato, em todos os grupos

estudados o infarto correspondeu a um tamanho médio acima de 35%. O peso dos corações foi comparável aos animais SH em todos os grupos IM, o que aliado ao aumento do diâmetro dos miócitos indica hipertrofia do miocárdio remanescente. Assim, a queda da pressão sistêmica associada ao aumento da PDF concorreu para a diminuição da PPC. Os resultados indicam que esta queda precoce da PPC está ligada a alterações patológicas agudas e crônicas, principalmente do subendocárdio remoto ao infarto. Um ciclo vicioso de disfunção ventricular, queda da pressão de perfusão e remodelamento subendocárdico parece se instalar desde o início do infarto promovendo expansão ventricular progressiva.

O encontro de necrose de miócitos, seguido de inflamação, de fibroplasia e de fibrose, principalmente no subendocárdio, sugere a evolução de um processo de isquemia persistente com perda celular e ulterior reparação por fibrose. De fato, é o subendocárdio a região ventricular mais susceptível a dano por limitação da perfusão coronariana⁵²⁻⁵³. Nesta região, a inflamação, apesar de muito mais intensa nas fases precoces, pôde ser observada também na fase crônica, quando ainda se nota aumento do infiltrado leucocitário e da FG. É de se destacar que o *alcian blue* pH 2.5 identifica glicosaminoglicanos não sulfatados, cujo componente principal presente na matriz extracelular é o ácido hialurônico. Este participa do processo inflamatório tecidual promovendo edema e facilitando a migração e a proliferação de macrófagos e de leucócitos^{4, 54-55}. O aumento de ácido hialurônico já havia sido observado no endocárdio remoto, mas apenas nas fases agudas do infarto⁴.

No interstício, foi observado infiltrado leucocitário e aumento de glicosaminoglicanos, mas não fibroplasia, nem fibrose, o que contradiz vários estudos até então publicados^{32-34, 56-57}. É possível que boa parte destes estudos, não tendo examinado separadamente o remodelamento da matriz no subendocárdio e no interstício, tenham superestimado a fibrose do miocárdio

remoto. Por outra, é também possível que a fibrose intersticial suceda a subendocárdica e venha a manifestar-se em tempos mais tardios do que quatro semanas. É preciso considerar ainda que o achado negativo de fibrose intersticial em quatro semanas ocorra por seleção dos animais sobreviventes, com menor remodelamento. Neste grupo, entretanto, havia inflamação intersticial, a qual pode anteceder o desenvolvimento de fibrose em fases mais avançadas. Estes achados sugerem que o dano do subendocárdio, mais intenso agudamente, parece anteceder o remodelamento do interstício.

A correlação observada entre a queda da PPC e as lesões encontradas no subendocárdio, tanto agudas, quanto sub-agudas e crônicas, corroboram a participação de isquemia persistente como mecanismo etiopatogênico. No entanto, apenas as alterações patológicas agudas e sub-agudas do subendocárdio se relacionaram com a função ventricular. A fibrose subendocárdica observada em quatro semanas não se associou nem à disfunção sistólica, nem à disfunção diastólica. É possível que nas fases precoces a infiltração leucocitária, o aumento de glicosaminoglicanos e a fibroplasia sejam de magnitude tal que expressem com mais exatidão o dano subendocárdico. A área ocupada pela inflamação nas fases precoces é significativamente maior do que aquela ocupada por colágeno na fase crônica. Com a evolução, há afinamento da cicatriz subendocárdica e expansão ventricular. De fato, observa-se que a área de colágeno subendocárdica em uma semana é maior que aquela observada em quatro semanas. De qualquer forma, estes resultados parecem apontar para um papel relevante da isquemia subendocárdica na fisiopatologia da disfunção ventricular nas fases agudas.

No interstício, observou-se relação da queda da PPC com a inflamação e com a fibrose. Ao contrário do subendocárdio, no interstício não foram observadas diferenças entre os grupos quanto à perda de núcleos, à degeneração e ao desarranjo de miofibrilas ou à fibroplasia. As relações da PPC

foram sempre maiores com as alterações patológicas observadas no subendocárdio do que aquelas observadas no interstício. A fibrose intersticial é tida como conseqüente, entre outros fatores, da ativação local do sistema renina-angiotensina^{7, 28} e aumento da produção de colágeno por miofibroblastos^{23, 58}. Há ativação de metaloproteinases, dilatação ventricular e fibrose⁵⁷. Como as alterações da matriz observadas no subendocárdio parecem anteceder aquelas do interstício, especulamos que a fibrose intersticial possa ser decorrente do dano subendocárdico inicial, manifestando-se em fases mais tardias. A queda da PPC imediatamente após o infarto levaria a dano subendocárdico com elevação da pressão de enchimento do ventrículo esquerdo, aumento do estresse diastólico e dilatação ventricular. A disfunção sistólica associada à queda da pressão sistêmica concorre para manter diminuída a PPC. O índice de expansão ventricular aumentou progressivamente até quatro semanas. O aumento das dimensões do ventrículo esquerdo concorre para aumento do estresse sistólico e elevação do consumo de oxigênio miocárdico⁵⁹⁻⁶⁰. Nesta situação, a queda da PPC torna-se crítica, mais ainda levando-se em conta que a reserva de fluxo coronariano também se encontra diminuída após o infarto⁶¹. O dano subendocárdico, embora persistente, é mais intenso nas fases agudas. Daí deve advir a boa correlação observada entre a PPC e as alterações inflamatórias, e destas com a disfunção ventricular. Mais tardiamente, no grupo de 28 dias, a inflamação do interstício com aumento dos glicosaminoglicanos, explica melhor a disfunção. Este achado sugere que nesta fase, o interstício passa a ser responsável pela manutenção e, eventualmente, pela progressão da disfunção iniciada desde o início do infarto.

Limitações

As alterações patológicas observadas no subendocárdio remoto ao infarto indicam um processo de reparação à necrose miocárdica. A necrose de miócitos

foi identificada por alterações morfológicas representadas por picnose e cariólise, contração de bandas, vacuolização do citoplasma e hipereosinofilia⁴⁶. A picnose associada à hipereosinofilia aparece tanto na necrose de coagulação quanto no processo de morte celular programada⁶². Esta diferenciação não pôde ser realizada com base histológica apenas. Assim, a possível participação da apoptose no dano subendocárdico não pôde ser estimada.

Este estudo objetivou a identificação de glicosaminoglicanos não sulfatados, particularmente o ácido hialurônico, por meio da coloração *alcian blue*. Os glicosaminoglicanos sulfatados não foram examinados. Assim, a participação de proteoglicanos na inflamação e na fibrose nas diferentes regiões do miocárdio remoto não pôde ser investigada^{5, 63-64}.

O tempo de seguimento mais tardio examinado foi quatro semanas. Até então, havia ainda evidências de processo inflamatório em curso no interstício do miocárdio remoto. É possível que mais tardiamente este processo inflamatório seja substituído por fibrose. Isto terá que ser investigado.

Nos animais do grupo SH foi observada redução da PPC, embora de menor magnitude, resultante do efeito anestésico, da toracotomia e da pressão ventilatória positiva, provavelmente. Neste grupo também foram observadas lesões subendocárdicas. Em animais experimentais não submetidos a toracotomia ou a monitorização hemodinâmica prolongada não são observadas estas lesões.

Para uma avaliação mais compreensiva do papel da pressão de perfusão sobre o remodelamento do subendocárdio remoto há que se investigar a queda da pressão de perfusão diante do grau de diminuição da reserva coronária que se verifica após o infarto^{8, 61, 65}. Pode-se conjecturar que, mesmo diante de um impedimento da reserva coronária, a manutenção de uma PPC adequada limite o dano subendocárdico e favoreça a função ventricular. O uso de microesferas

marcadas pode demonstrar diferenças regionais de perfusão miocárdica e indicar o limite da pressão de perfusão em que o impedimento da reserva coronária passa a prejudicar o fluxo miocárdico.

Implicações clínicas

No infarto, o uso de vasodilatadores pode limitar a perfusão miocárdica por diminuir a pressão de perfusão e, deste modo, comprometer a função ventricular. Em casos de aumento de PDF, a PPC pode ser útil como parâmetro de tratamento, por indicar um limite para a redução da pressão de enchimento ventricular.

Na insuficiência cardíaca, as situações de piora do quadro clínico após o uso de vasodilatadores ocorrem particularmente em casos de pressão sistêmica reduzida. Isto pode ser explicado por uma redução da PPC. Também na insuficiência cardíaca, a PPC pode ser um parâmetro útil para se estabelecer decisões terapêuticas.

Conclusões

O remodelamento do ventrículo esquerdo após o infarto é caracterizado pela ocorrência de alterações patológicas distintas no subendocárdio e no interstício do miocárdio remoto ao infarto, com predominância daquelas sobre estas.

Os resultados indicam que a queda da PPC, que ocorre imediatamente após o infarto, pode ser determinante para a disfunção ventricular, por contribuir para o remodelamento do subendocárdio da região remota ao infarto e por determinar dilatação ventricular.

Referências Bibliográficas

1. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling - concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 569-82.
2. Sutton MG, Sharpe N. Left Ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circulation* 2000; 101: 2981-8.
3. Volders PG, Willems IE, Cleutjens JP, Arends JW, Havenith MG, Daemen MJ. Interstitial collagen is increased in the non-infarcted human myocardium after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 1993; 25: 1317-23.
4. Waldenstrom A, Martinussen HJ, Gerdin B, Hallgren R. Accumulation of hyaluronan and tissue edema in experimental myocardial infarction. *J Clin Invest* 1991; 88: 1622-8.
5. Zimmerman SD, Thomas DP, Velleman SG, Li X, Hansen TR, McCormick RJ. Time course of collagen and decorin changes in rat cardiac and skeletal muscle post-MI. *Am J Physiol* 2001; 281: H1816-22.
6. Casscells W, Kimura JA, Sanchez ZX, Ferrans VJ. Immunohistochemical study of fibronectin in experimental myocardial infarction. *Am J Pathol* 1990; 137: 801-10.
7. Michel JB, Lattion AL, Salzmann JL, Cerol ML, Philippe M, Camilleri JP, Corvol P. Hormonal and cardiac effects of converting enzyme inhibition in rat myocardial infarction. *Circ Res* 1988; 62: 641-50.

8. de Carvalho Frimm C, Koike MK, Cúri M. Subendocardial fibrosis in remote myocardium results from reduction of coronary driving pressure during acute infarction in rats. *Arq Bras Cardiol* 2003; 80: 515-20.
9. Ono K, Matsumori A, Shioi T, Furukawa Y, Sasayama S. Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: possible implication in left ventricular remodeling. *Circulation* 1998; 98: 149–56.
10. Irwin MW, Mak S, Mann DL, Qu R, Penninger JM, Yan A, *et al.* Tissue expression and immunolocalization of tumor necrosis factor- α in postinfarction dysfunctional myocardium. *Circulation* 1999; 99: 1492–8.
11. Deten A, Volz HC, Briest W, Zimmer HG. Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. Experimental studies in rats. *Cardiovasc Res* 2002; 55: 329-40.
12. Deten A, Volz HC, Briest W, Zimmer HG. Differential cytokine expression in myocytes and non-myocytes after myocardial infarction in rats. *Mol Cell Biochem* 2003; 242: 47-55.
13. Gurantz D, Cowling RT, Varki N, Frikovsky E, Moore CD, Greenberg BH. IL-1 β and TNF- α upregulate angiotensin II type 1 (AT1) receptors on cardiac fibroblasts and are associated with increased AT1 density in the post-MI heart. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 38: 505–15.
14. Siwik DA, Chang DL, Colucci ES. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinases activity in cardiac fibroblast in vitro. *Circ Res* 2000; 86: 1259-65.
15. Johnatty RN, Taub DD, Reeder SP, Turcovski-Corrales SM, Cottam DW, Stephenson TJ, *et al.* Cytokine and chemokine regulation of proMMP-9 and TIMP-1 production by human peripheral blood lymphocytes. *J Immunol* 1997; 158: 2327-33.

16. Rohde LE, Ducharme A, Arroyo LH, Aikawa M, Sukhova GH, Lopez-Anaya A, *et al.* Matrix metalloproteinase inhibition attenuates early left ventricular enlargement after myocardial infarction in mice. *Circulation* 1999; 99: 3063-70.
17. Peterson JT, Li H, Dillon L, Bryant JW. Evolution of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor expression during heart failure progression in the infarcted rat. *Cardiovasc Res* 2000; 46: 307-15.
18. Mukherjee R, Brinsa TA, Dowly KB, Scott AA, Baskin JM, Deschamps AM, *et al.* *Circulation* 2003; 107: 618-25.
19. Hebda PA, Collins MA, Tharp MD. Mast cell and myofibroblast in wound healing. *Dermatol Clin* 1993; 11: 685-96.
20. Gailit J, Marchese MJ, Kew RR, Gruber BL. The differentiation and function of myofibroblast is regulated by mast cell mediators. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 1113-9.
21. Ikeuchi M, Tsutsui H, Shiomi T, Matsusaka H, Matsushima S, Wen J, *et al.* Inhibition of TGF- β signaling exacerbates early cardiac dysfunction but prevents late remodeling after infarction. *Cardiovasc Res* 2004; 64: 526-35.
22. Petrov VV, Fagard RH, Lijnen PJ. Stimulation of collagen production by transforming growth factor-beta1 during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts. *Hypertension* 2002; 39: 258-63.
23. Sun Y, Weber KT. Angiotensin converting enzyme and myofibroblasts during tissue repair in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28: 851-8.
24. de Carvalho Frimm C, Sun Y, Weber KT. Angiotensin II receptor blockade and myocardial fibrosis of the infarcted rat heart. *J Lab Clin Med* 1997; 129: 439-46.

25. Gurantz D, Cowling RT, Villarreal FJ, Greenberg BH. Tumor necrosis factor-alpha upregulates angiotensin II type 1 receptors on cardiac fibroblasts. *Circ Res* 1999; 85: 272–9.
26. Peng J, Gurantz D, Tran V, Cowling RT, Greenberg BH. Tumor necrosis factor-alpha-induced AT1 receptor upregulation enhances angiotensin II-mediated cardiac fibroblast responses that favor fibrosis. *Circ Res* 2002; 91: 1119–26.
27. Koike MK, de Carvalho Frimm C, Higuchi ML. Bradykinin B2 receptor antagonism attenuates inflammation, mast cell infiltration and fibrosis deposition in the remote myocardium after infarction in rats. *Clin Exp Physiol Pharmacol* 2005; 32: 1131-6.
28. Schoemaker RG, Debets JMJ, Struyker-Boudier HAJ, Smits JFM. Delayed but not immediate captopril therapy improves cardiac function in conscious rats, following myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1991; 23: 187-97.
29. Pfeffer MA, Braunwald E, Moye LA, Basta L, Brown Jr. EJ, Cuddy TE, *et al.* Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med* 1992; 327: 669–77.
30. Nauman D, Greenberg B. Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *Am J Geriatr Cardiol* 1993; 2 (1): 28-36.
31. Ambrosioni E, Borghi C, Magnani B. The effect of the angiotensin converting- enzyme inhibitor zofenopril on mortality and morbidity after anterior myocardial infarction. The Survival of Myocardial Infarction Long-Term Evaluation (SMILE) Study Investigators. *N Engl J Med* 1995; 332: 80–5.

32. Taylor K, Patten RD, Smith JJ, Aronovitz MJ, Wight J, Salomon RN, *et al.* Divergent effects of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II-receptor antagonism on myocardial cellular proliferation and collagen deposition after myocardial infarction in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 31: 654–60.
33. Yu CM, Tipoe GL, Wing-Hon LK, Lau CP. Effects of combination of angiotensin-converting enzyme inhibitor and angiotensin receptor antagonist on inflammatory cellular infiltration and myocardial interstitial fibrosis after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38: 1207–15.
34. Ammarguella F, Larouche I, Schiffrin EL. Myocardial fibrosis in DOCA-salt hypertensive rats effect of endothelin ETa receptor antagonism. *Circulation* 2001; 103: 319-24.
35. Wei S, Chow LTC, Sanderson JE. Effect of carvedilol in comparison with metoprolol on myocardial collagen postinfarction. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 276-81.
36. Hammerman H, Kloner Ra, Schoen FJ, Brown EJ Jr, Hale S, Braunwald E. Indomethacin-induced scar thinning after experimental myocardial infarction. *Circulation* 1983; 67: 1290-5.
37. Brown EJ Jr, Kloner RA, Schoen FJ, Hammerman H, Hale S, Braunwald E. Scar thinning due to ibuprofen administration after experimental myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1983; 51: 877-83.
38. Hammerman H, Schoen FJ, Braunwald E, Kloner RA. Drug-induced expansion of infarct: morphologic and functional correlations. *Circulation* 1984; 69: 611-7.

39. de Carvalho Frimm C, Sun Y, Weber KT. Wound healing following myocardial infarction in the rat: role for bradykinin and prostaglandins. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28: 1279-85.
40. Tucci PJF, Spadaro J, Cicogna AC, Bregagnollo EA. Coronary perfusion pressure as a determinant of ventricular performance. *Experientia* 1980; 36: 974-5.
41. Cross C, Riechen P, Salisbury P. Coronary driving pressure and vasomotor tonus as determinants of coronary blood flow. *Circ Res* 1961; 9: 589-600.
42. Buckberg GD. Left ventricular subendocardial necrosis. *Ann Thorac Surg* 1977; 24: 379-93.
43. Selye H, Bajusj E, Grasso S, Mendell P. Simple techniques for the surgical occlusion of coronary vessels in the rat. *Angiology* 1960; 11: 398-407.
44. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the heart. *Circ Res* 1985; 57: 84-95.
45. Whittaker P, Boughner DR, Kloner RA. Role of collagen in acute myocardial infarct expansion. *Circulation* 1991; 84: 2123-34.
46. Robbins and Cotran's Pathologic Basis of Disease. 7ª edição, Elsevier Health Sciences, Filadélfia, EUA, 2004, págs 19-26.
47. Junqueira LC & Carneiro J. Histologia básica, 10ª edição, Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, 2004, págs 92-9.
48. Baldwin HS, Lloyd TR, Solursh M. Hyaluronate degradation affects ventricular function of the early postlooped embryonic rat heart in situ. *Circ Res* 1994; 74: 244-52.

49. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 1979; 11(4): 447-55.
50. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fletcher PJ, Braunwald E. Ventricular performance in rats with myocardial infarction and failure. *Am J Med* 1984; 76 (5b): 99-103.
51. Solomon SD, Greaves SC, Rayan M, Finn P, Pfeffer MA, Pfeffer JM. Temporal dissociation of left ventricular function and remodeling following experimental myocardial infarction in rats. *J Cardiac Failure* 1999; 5: 213-23.
52. Buckberg GD, Fixler DE, Archie JP, Hoffman JIE. Experimental subendocardial ischemia in dogs with normal coronary arteries. *Circ Res* 1972; 30: 67-81.
53. Aldea GS, Mori H, Hussein WK, Austin RE, Hoffman JIE. Effects of increase pressure inside or outside ventricles on total and regional myocardial blood flow. *Am J Physiol* 2000; 279: H2927-38.
54. Savani RC, Hou G, Liu P, Wang C, Simons E, Grim PC, *et al.* A role of hyaluronan in macrophage accumulation and collagen deposition after bleomycin-induced lung injury. *Am J Resp Cell Mol Biol* 2000; 23: 475-84.
55. Day AJ, de la Motte CA, Hyaluronan cross-linking: a protective mechanism in inflammation? *Trends Immunol* 2005; 26: 637-43
56. Sun Y, Zhang JQ, Zhang J, Lamparter S. Cardiac remodeling by fibrous tissue after infarction in rats. *J Lab Clin Med* 2000; 135: 316-23.

57. Deten A, Holz A, Leicht M, Barth W, Zimmer HG. Changes in extracellular matrix and in transforming growth factor beta isoforms after coronary artery ligation in rats. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 1191-207.
58. Sun Y, Zhang J, Lu L, Bedigian MP, Robinson AD, Weber KT. Tissue angiotensin II in the regulation of inflammatory and fibrogenic components of repair in the rat heart. *J Lab Clin Med* 2004; 143: 41-51.
59. Omerovic E, Bollano E, Basetti M, Kujacic V, Waagstein L, Hjalmarson A, *et al.* Bioenergetic, functional and morphological consequences of postinfarct cardiac remodeling in the rat. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: 1685-95.
60. Remondino A, Rosenblatt-Velin N, Montessuit C, Tardy I, Papageorgiou I, Dorsaz PA, *et al.* Altered expression of proteins of metabolic regulation during remodeling of the left ventricle after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32: 2025-34.
61. Karam R, Healy BP, Wicker P. Coronary reserve is depressed in postmyocardial infarction reactive cardiac hypertrophy. *Circulation* 1990; 81: 238-46.
63. Endo C, Kusachi S, Ninomiya Y, Yamamoto K, Murakami M, Murakami T, *et al.* Time-dependent increases in syndecan-1 and fibroglycan messenger RNA expression in the infarct zone after experimentally induced myocardial infarction in rats. *Coron Artery Dis* 1997; 8: 155-61.
64. Doi M, Kusachi S, Murakami T, Ninomiya Y, Murakami M, Nakahama M, *et al.* Time-dependent changes of decorin in the infarct zone after experimentally induced myocardial infarction in rats: comparison with biglycan. *Pathol Res Pract* 2000; 196: 23-33.
65. Kalkman EA, Bilgin YM, van Haren P, van Suylen RJ, Saxena PR,

Schoemaker RG. Determinants of coronary reserve in rats subjected to coronary artery ligation or aortic banding. *Cardiovasc Res* 1996; 32:1088-95.

