

EDUARDO AMARO LEBRE JUNIOR

**Estudo quantitativo do coração e da inervação simpática no  
modelo experimental de infarto do miocárdio**

São Paulo

2020

EDUARDO AMARO LEBRE JUNIOR

**Estudo quantitativo do coração e da inervação simpática no modelo experimental de infarto do miocárdio**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

**Departamento:**  
Cirurgia

**Área de concentração:**  
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

**Orientador:**  
Prof.<sup>a</sup>. Dra. Tais Harumi de Castro Sasahara

De acordo:   
Orientador

São Paulo  
2020

**Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP**

## Ficha Catalográfica

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginia Buff D'Ápica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4006 FMVZ	Lebre Junior, Eduardo Amaro Estudo quantitativo do coração e da inervação simpática no modelo experimental de infarto do miocárdio / Eduardo Amaro Lebre Junior. – 2020. 49 f. : il.  Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2020.  Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres. Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres. Orientadora: Profa. Dra. Tais Harumi de Castro Sasahara.  1. Miocárdio. 2. Gânglio estrelado. 3. Isoprenalina. 4. Quantificação celular. I. Título.
-----------------	---

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Maria Aparecida Lest, CRB 5673-8, da FMVZ/USP.



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ESTUDO QUANTITATIVO DO CORAÇÃO E DA INERVAÇÃO SIMPÁTICA NO MODELO EXPERIMENTAL DE INFARTO DO MIOCÁRDIO.", protocolada sob o CEUA nº 7392150119 (ID 006263), sob a responsabilidade de **Tais Harumi de Castro Sasahara e equipe; Eduardo Amaro Lebre Junior** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 07/03/2019.

We certify that the proposal "QUANTITATIVE STUDY OF THE HEART AND SYMPATHETIC INERVATION IN THE EXPERIMENTAL MODEL OF MYOCARDIAL INFARCTION.", utilizing 30 Heterogenics rats (30 males), protocol number CEUA 7392150119 (ID 006263), under the responsibility of **Tais Harumi de Castro Sasahara and team; Eduardo Amaro Lebre Junior** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 03/07/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [03/2019](#) a [03/2021](#) Área: [Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres](#)

Origem: [Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da USP](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [8 a 10 semanas](#)

N: [30](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [300 a 450 g](#)

Local do experimento: Os animais serão mantidos em salas climatizadas. Sem ruído.

São Paulo, 15 de janeiro de 2020

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenador

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: JUNIOR, Eduardo Amaro Lebre

Título: **Estudo quantitativo do coração e da inervação simpática no modelo experimental de infarto do miocárdio.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

## **Dedicatória**

Aos meus pais, Eduardo e Meyre, por sempre acreditarem em mim e por terem sempre me resguardado como anjos, ter vocês como pais, é um orgulho e um exemplo a ser seguido por mim.

À minha avó Irma, que é uma avó ímpar, que está sempre fazendo de tudo para sua família, tirando de ti para agradar e cuidar de seus filhos e netos.

À minha namorada Carol, por todo amor, incentivo, apoio e compreensão. Nada disso teria sentido, se você não existisse em minha vida.

Dedico este trabalho a Deus e nossa Senhora Aparecida; sem eles eu não teria capacidade para desenvolver este trabalho.

Foi pensando nas pessoas que executei este projeto, por isso dedico este trabalho a todos aqueles a quem está pesquisa possa ajudar de alguma forma.

A conclusão deste trabalho resume-se em dedicação, dedicação que vi ao longo de dois anos em cada um dos professores deste curso de pós graduação, a quem dedico este trabalho.

Dedico este trabalho aos meus colegas de curso, que assim como eu encerram uma difícil etapa da vida acadêmica.

À minha orientadora, que sempre foi mais que presente, me ajudando em cada etapa, me aconselhando e orientando de forma ímpar. Sem ela não teria conseguido concluir esta difícil tarefa.

## **Agradecimentos**

A **Deus**, pela dádiva da vida e por me permitir realizar tantos sonhos nesta existência. Obrigado por me permitir errar, aprender e crescer, por Sua eterna compreensão e tolerância, por Seu infinito amor, pela Sua voz “invisível” que não me permitiu desistir e principalmente por ter me dado uma família tão especial, enfim, obrigado por tudo. Ainda não descobri o que eu fiz para merecer tanto.

À **Prof<sup>a</sup>. Dra. Tais H. de C. Sasahara**, pela orientação, competência, profissionalismo e dedicação tão importantes. Tantas vezes que nos reunimos e, embora em algumas eu chegasse desestimulado, bastavam alguns minutos de conversa e umas poucas palavras de incentivo e lá estava eu, com o mesmo ânimo do primeiro dia de Pós-Graduação. Obrigado por acreditar em mim e pelos tantos elogios e incentivos. Tenho certeza que não chegaria neste ponto sem o seu apoio. Você foi e está sendo muito mais que orientadora: para mim será sempre mestre e amiga, eu agradeço a realização e finalização deste projeto a você, uma super orientadora.

Aos Técnicos de laboratório que sempre fizeram o possível e o impossível para me ajudar no projeto. O Ronaldo, por ser um amigo que serei eternamente grato por todos os dias chegar mais cedo pra me ajudar com meus blocos e lâminas, serei eternamente grato. E o Diogo que me ajudou na parte de captura de imagens. Sem vocês meu mestrado seria muito mais difícil.

À **minha mãe e ao meu pai** deixo um agradecimento especial, por todas as lições de amor, companheirismo, amizade, caridade, dedicação, abnegação, compreensão e perdão que vocês me dão a cada novo dia. Sinto-me orgulhoso e privilegiado por ter pais tão especiais.

A minha Família, que sempre torceram e me incentivaram a alcançar um futuro brilhante, hoje agradeço a eles por sempre me guardarem em oração.

Agradeço meu Tio Edson e minha Vó Irma por estarem presentes na minha qualificação deste mesmo projeto, que me deram forças para fazer uma ótima apresentação, e por sempre estarem orando por mim, pedindo forças para alcançar um grande destino.

Ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, meu profundo agradecimento pois sem este apoio não seria possível a realização deste projeto.

## Epígrafe

“Se o dinheiro for a sua esperança de independência, você jamais a terá. A única segurança verdadeira consiste numa reserva de sabedoria, de experiência e de competência.” (Henry Ford)

## RESUMO

JUNIOR, E. A. L. **Estudo quantitativo do coração e da inervação simpática no modelo experimental de infarto do miocárdio** 2020. 49 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

O uso de modelos animais para a compreensão da fisiopatologia da doença cardiovascular é um quesito obrigatório. Desse modo, os estudos experimentais são as ferramentas preliminares para o desenvolvimento de novos medicamentos. Dos modelos experimentais em cardiomiopatia o de indução por agente químico é reportado como o mais vantajoso pois possui baixa taxa de morbidade e mortalidade. Dos modelos químicos, destaca-se a isoprenalina, um potente agonista  $\beta$ -adrenérgico. Assim, objetiva-se investigar em ratos, tratados com isoprenalina, a estrutura e a microestrutura do coração e de sua inervação extrínseca simpática, aplicando-se métodos quantitativos tridimensionais, baseados na Estereologia. Para tanto, foram utilizados 12 ratos machos, adultos divididos em dois grupos: grupo controle, sem a aplicação da isoprenalina e grupo tratado com isoprenalina, sendo duas aplicações com intervalo de 24 horas entre elas. Foram dosadas as concentrações séricas de creatina quinase total, creatina quinase isoenzima MB e troponina. Os animais foram eutanasiados e colhidos os corações e gânglios estrelados. As amostras foram processadas para microscopia de luz para estimativa dos volumes totais do ventrículo esquerdo; volume da parede e do lume ventricular; volume das fibras musculares cardíacas e do interstício cardíaco, além do volume total do gânglio estrelado e volume total de neurônios. A isoprenalina aumentou a concentração sérica da troponina. No tecido cardíaco observou-se infiltrado histiocitário e neutrofílico multifocal discreto e discreta congestão. No coração houve redução dos volumes do ventrículo esquerdo, do lume cardíaco e das fibras musculares cardíacas. Na inervação simpática cardíaca houve redução no volume total de neurônios. Conclui-se que a isoprenalina altera a estrutura e a microestrutura do coração e de sua inervação simpática sendo, portanto, um modelo efetivo do Infarto agudo do miocárdio (IAM) em ratos Wistar.

Palavras-chave: Miocárdio. Gânglio estrelado. Isoprenalina. Quantificação celular.

## ABSTRACT

JUNIOR, E. A. L. **Quantitative study of the heart and sympathetic innervation in the experimental model of myocardial infarction** 2020. 49 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

The use of animal models of cardiovascular disease is a mandatory in understanding the pathophysiology of the disease. Thus, they are preliminary tools for the development of new drugs. Among the experimental models, induction by chemical agent is reported to be more advantageous, because it requires a single parenteral dose, has a low rate of morbidity and mortality. Among the chemical models, Isoprenaline, a potent  $\beta$ -adrenergic agonist, stands out. Thus, the objective is to evaluate and quantify the cardiac structure and microstructure of the stellate ganglion after the administration of isoprenaline in Wistar rats. For this purpose, 12 adult male rats were used, divided into 2 groups: control group, without the application of isoprenaline and group treated with isoprenaline, two applications with an interval of 24 hours between them. Serum concentrations of CK-MB, CK and troponin were measured. Total left ventricular volumes were estimated; volume of the ventricular wall and lumen; volume of cardiac muscle fibers and cardiac interstitium, in addition, the total volume of the stellate ganglion and total volume of neurons were estimated. Isoprenaline increased the serum concentration of troponin. In the cardiac tissue, a discrete multifocal histiocytic and neutrophilic infiltrate and slight congestion were observed. In the heart, there was a reduction in left ventricular volumes, cardiac lumen and cardiac muscle fibers. In cardiac sympathetic innervation, there was a reduction in the total volume of neurons. It is concluded that isoprenaline alters the structure and microstructure of the heart and the sympathetic innervation of the heart, being an effective model of AMI in Wistar rats.

**Keywords:** Myocardium. Stellate ganglion. Isoprenaline. Cellular quantification.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Gânglio estrelado esquerdo de rato Wistar .....	10
Figura 2 – Amostragem do ventrículo esquerdo de rato Wistar .....	11
Figura 3 – Fatia do coração com sistema de pontos para estimativa do volume do ventrículo esquerdo.....	12
Figura 4 - Fórmula do Princípio de Cavalieri para volume da parede cardíaca .....	12
Figura 5 - Fórmula do Princípio de Cavalieri para volume do lume cardíaco.....	13
Figura 6 - Lâmina histológica de fragmento da parede do ventrículo esquerdo.....	14
Figura 7 - Fórmula para cálculo de densidade de volume das fibras musculares cardíacas.....	14
Figura 8 - Fórmula para cálculo de densidade de volume do interstício cardíaco ou fibrose.....	15
Figura 9 - Fórmula para cálculo do volume das fibras musculares cardíacas.....	15
Figura 10 - Fórmula para cálculo do volume total do interstício cardíaco ou fibrose .....	16
Figura 11 - Fórmula para cálculo do volume total do gânglio estrelado .....	16
Figura 12 - Fórmula para cálculo de densidade de volume de neurônio.....	17
Figura 13 - Fórmula para cálculo do volume de neurônio .....	17
Figura 14 – Coração do rato Wistar seccionado perpendicularmente para estimativa do volume do ventrículo esquerdo .....	19
Figura 15 – Secções do coração de ratos Wistar do grupo controle e do grupo tratado .....	20
Figura 16 – Esquema do volume do ventrículo esquerdo e sua composição .....	21

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Volume em porcentagem do ventrículo esquerdo e do lume do grupo controle e tratado .....	21
Gráfico 2 - Gráfico comparativo dos volumes total, parede e do lume do ventrículo esquerdo do grupo controle e tratado .....	22
Gráfico 3 - Volume em porcentagem das FMC e IC do grupo controle e tratado .....	23
Gráfico 4 - Gráfico comparativo do volume médio da parede, volume da FMC e do IC do ventrículo esquerdo do grupo controle e tratado .....	23
Gráfico 5 - Volume em mm <sup>3</sup> do gânglio estrelado do grupo controle e tratado .....	24

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 -	Resultados da análise bioquímica do grupo controle e tratado .....	18
------------	--	----

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1.</b>	<b>Estrutura do coração.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2.</b>	<b>Infarto agudo do miocárdio – IAM.....</b>	<b>17</b>
<b>2.3.</b>	<b>Estrutura do coração pós infarto agudo do miocárdio .....</b>	<b>18</b>
<b>2.4.</b>	<b>Inervação simpática do coração .....</b>	<b>19</b>
2.4.1.	Inervação simpática do coração antes do IAM .....	19
2.4.2.	Inervação simpática do coração após o IAM .....	19
<b>2.5.</b>	<b>Modelos animais de indução do IAM .....</b>	<b>20</b>
<b>3.</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>21</b>
3.1.1.	No Coração:.....	21
3.1.2.	No gânglio estrelado:.....	21
3.1.3.	Testes bioquímicos .....	21
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
<b>4.1.</b>	<b>Animais.....</b>	<b>22</b>
4.1.1.	Grupo I.....	22
4.1.2.	Grupo II.....	22
<b>4.2.</b>	<b>ColHEITA de Sangue .....</b>	<b>23</b>
4.2.1.	Técnicas para os testes bioquímicos.....	23
<b>4.3.</b>	<b>Eutanásia.....</b>	<b>24</b>
<b>4.4.</b>	<b>ColHEIta do coração e DO gânglio estrelado.....</b>	<b>24</b>
<b>4.5.</b>	<b>Análise estereológica .....</b>	<b>26</b>
4.5.1.	Estimativa do volume total do ventrículo esquerdo.....	26
4.5.2.	Amostragem do VE.....	28

4.5.3. Estimativa do volume total de FMC e do volume total de IC ou fibrose .	28
4.5.3.1.Densidade de volume das fibras musculares cardíacas e do interstício cardíaco (Vv) .....	28
4.5.4. Estimativa do volume total do gânglio estrelado.....	31
4.5.5. Estimativa do volume total de neurônios .....	32
4.5.6. ANALISE ESTATISTICA.....	33
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>33</b>
<b>5.1. Exames bioquímicos .....</b>	<b>33</b>
<b>5.2. Avaliação qualitativa do miocárdio .....</b>	<b>34</b>
<b>5.3. Avaliação quantitativa do ventrículo esquerdo e da inervação simpática cardíaca.....</b>	<b>35</b>
5.3.1. Estimativa do volume do ventrículo esquerdo (VE) .....	35
5.3.2. Estimativa do volume total de fibras musculares cardíacas e interstício cardíaco .....	37
5.3.3. Volume do gânglio estrelado (Vref) .....	39
5.3.4. Volume total de neurônios .....	39
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>40</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>42</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>43</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares, incluindo o infarto agudo do miocárdio (IAM), representam um importante problema de saúde pública no Brasil e no mundo, apresentando altas taxas de incidência e mortalidade (BAENA et al., 2012). Nas últimas décadas, foram implementadas a Política Nacional de Promoção à Saúde e o Programa de Prevenção e Controle da Hipertensão e do Diabetes (HIPERDIA) com finalidade de reduzir a morbimortalidade por doenças do sistema cardiovascular no Brasil. Contudo, as taxas de mortalidade por doenças cardiovasculares, entre elas o IAM, ainda permanecem altas quando comparadas às taxas de países desenvolvidos (MALTA et al., 2014; BARBERI; VAN DEN HONDEL, 2018; NASCIMENTO et al., 2019)

O uso de modelos animais de doença cardiovascular é um passo obrigatório para a compreensão da fisiopatologia da doença e para as abordagens terapêuticas. Assim, os modelos animais são as ferramentas preliminares para o desenvolvimento de novos medicamentos (EGIDO et al., 2011).

Os modelos experimentais para indução do IAM atualmente são subdivididos em duas classes, modelos *in vivo* e modelos *ex vivo*. Um modelo consagrado é o da Isoprenalina, uma catecolamina sintética, que resulta em alterações bioquímicas e estruturais, responsáveis por causar danos irreversíveis, além da sua efetividade, praticidade, reprodutibilidade e menor morbidade e mortalidade (THOMES et al., 2010; PRINCE; DHANASEKAR; RAJAKUMAR, 2011; UPAGANLAWAR; BALARAMAN, 2011).

Vários são os trabalhos que investigaram a estrutura do coração e a inervação simpática cardíaca em modelos de cardiomiopatias, no entanto, usam metodologias pouco acuradas, baseada na morfometria ou quantificação por área (WASSILEW et al., 2016; SCHIPKE et al., 2017; YOKOYAMA et al., 2017). Assim, objetiva-se avaliar e quantificar a estrutura e microestrutura cardíaca e do gânglio estrelado, principal componente simpático responsável pela inervação do coração.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. ESTRUTURA DO CORAÇÃO

O coração está localizado no mediastino médio, sendo comparável a um cone irregular. Possui quatro cavidades, dois átrios e dois ventrículos. O átrio direito recebe o sangue venoso do corpo enviando-o para os pulmões por meio do tronco pulmonar. O ventrículo esquerdo recebe o sangue oxigenado dos pulmões pelas veias pulmonares e o lança pela aorta para o corpo (KÖNIG; LIEBICH, 2004).

O coração é composto por três camadas; a camada média denominada de miocárdio, a mais externa, o pericárdio visceral (epicárdio) e a camada interna, o endocárdio, que se trata de uma fina camada de superfície lisa continua ao revestimento dos vasos sanguíneos (DYCE; WENSING; SACK, 2010).

O miocárdio é formado por células musculares conhecidas como miócitos cardíacos. Essas células possuem, por sua ocasião, cinco componentes: (1) a membrana celular (sarcolema) e túbulos T para condução do impulso, (2) retículo sarcoplasmático, que é um reservatório de cálcio usado para contração, (3) elementos contráteis, (4) mitocôndrias e (5) o núcleo (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2015).

### 2.2. INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO – IAM

O infarto agudo do miocárdio (IAM) mantém uma importância substancial na saúde global (WEINTRAUB et al., 2011) porque é uma das principais causas de morte no mundo e sua prevalência aproxima-se de três milhões de pessoas no mundo anualmente (BARBERI; VAN DEN HONDEL, 2018; NASCIMENTO et al., 2019).

O IAM pode ser definido como o dano irreversível da fibra muscular do miocárdio causado pela isquemia prolongada (THYGESEN; ALPERT; WHITE, 2007). Caracteriza-se pela diminuição do fluxo sanguíneo coronário, em que o suprimento de oxigênio disponível não consegue atender à demanda de

oxigênio, resultando em isquemia do miocárdio (MASSBERG; POLZIN, 2018; SCHEEN, 2018).

Os infartos do miocárdio são, na sua maioria, transmurais; quando a necrose isquêmica envolve toda ou quase toda a espessura da parede ventricular, com distribuição de uma única artéria coronariana (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

O IAM pode se manifestar em qualquer idade, porém há uma tendência em aumentar progressivamente junto com a idade e também na presença de fatores predisponentes como a aterosclerose, como tabagismo, hipertensão, diabetes mellitus, hipercolesterolemia genética e outras causas de hiperlipoproteinemia (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

### 2.3. ESTRUTURA DO CORAÇÃO PÓS INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO

O IAM ocorre quando há a redução prolongada do fluxo sanguíneo para uma região do coração que resulta em morte permanente dos miócitos. Nos dias e semanas subsequentes à morte dessas células, os miócitos mortos são gradualmente substituídos por uma cicatriz colagenosa. Essa progressão da cicatrização do miocárdio após o infarto é um processo dinâmico, geralmente, dividido em estágios: necrose, inflamação e fibrose, proliferação e remodelamento. E a longo prazo maturação (JUGDUTT, 2003; HOLMES; BORG; COVELL, 2005; DOBACZEWSKI; GONZALEZ-QUESADA; FRANGOGIANNIS, 2010).

Este processo de cicatrização do miocárdio ocorre após a morte das células cardíacas para assegurar a integridade do coração e é chamado de fibrose de reparação (TANAKA et al., 2016). Acredita-se que os miofibroblastos sejam o principal tipo celular responsável pela fibrogênese, que é iniciada e mantida por uma complexa rede de moléculas sinalizadoras (GABBIANI, 2003; LEASK, 2010). Uma resposta fibrótica exagerada pode causar disfunção sistólica e diastólica, bem como maior suscetibilidade a arritmias devido à alteração da sinalização intercelular, levando ao comprometimento da função cardíaca (JANICKI; BROWER, 2002; BURSTEIN; NATTEL, 2008; FRANCIS STUART et al., 2016).

## 2.4. INERVAÇÃO SIMPÁTICA DO CORAÇÃO

### 2.4.1. Inervação simpática do coração antes do IAM

Os neurônios pré-ganglionares simpáticos são responsáveis por quase 90.000 neurônios eferentes na medula espinal torácica de seres humanos (DEUCHARS; LALL, 2015) e estão confinados aos segmentos espinhais T1-T6 de onde seus axônios se projetam para o gânglio estrelado, o principal suprimento de nervo simpático pós-ganglionares eferentes para o coração (KAWASHIMA, 2005). O gânglio estrelado no rato consiste no gânglio cervical inferior com os dois ou três gânglios torácicos fundidos, está localizado ao nível das duas primeiras vértebras torácicas, sendo medial à artéria inominada (HEDGER; WEBBER, 1976).

As fibras pós-ganglionares formam os plexos cardíacos no mediastino cranial antes de se estenderem para a parede do coração. As fibras parassimpáticas ramificam-se a partir dos nervos vagos, diretamente ou após curta passagem pelos nervos laríngeos recorrentes. Eles terminam em células nervosas na parede do coração, especialmente dentro ou próximo aos nodos sinoatrial e atrioventricular. Muitas das fibras pós-ganglionares seguem para os nodos, mas outras atingem a periferia do coração, seguindo o fascículo atrioventricular e seus ramos (DYCE; WENSING; SACK, 2010).

### 2.4.2. Inervação simpática do coração após o IAM

A pluralidade das publicações que analisaram a função da atividade nervosa simpática depois do IAM utilizou técnicas indiretas, tais como níveis plasmáticos de catecolaminas, reflexo barorreceptor cardiovagal e variabilidade da frequência cardíaca. O IAM leva à excitação simpática, o que é o principal gatilho de arritmias cardíacas letais, porém, as consequências do infarto do miocárdio na estrutura do SNA simpática ainda são pouco exploradas. Esta excitação está relacionada ao reflexo aferente simpático aumentado (RASA) que se eleva durante a isquemia, insuficiência cardíaca e hipertensão (MCGOWAN et al., 2009; ZHOU et al., 2015; ZHU et al., 2019).

Um elemento essencial para melhorar nossa compreensão dos gatilhos neurais para arritmias cardíacas requer a identificação das mudanças moleculares nos componentes estruturais do SNA em resposta ao estresse no coração (GAO et al., 2017).

O infarto agudo do miocárdio pode levar a perda de inervação simpática eferente entre cinco a vinte minutos após a oclusão coronariana, com perda mais significativa ocorrendo nas três horas seguintes. A formação de cicatriz em consequência à lesão cardíaca pós IAM pode resultar em alteração da propagação elétrica miocárdica, levando a trajetos lentos e alterados (INOUE; ZIPES, 1988).

## 2.5. MODELOS ANIMAIS DE INDUÇÃO DO IAM

Existem vários modelos animais de IAM que requerem cirurgia invasiva. O método mais comumente utilizado para induzir o infarto agudo do miocárdio é a obstrução da artéria coronária. Isso envolve a exposição do coração com a realização de toracotomia, abertura do saco pericárdico e a oclusão da artéria coronária com sutura (JOHNS; OLSON, 1954; CAMILLERI et al., 1981).

Embora seja um método frequentemente usado, a cirurgia de tórax aberto, em pequenos roedores, resulta em alta mortalidade no período perioperatório, principalmente, por conta dos riscos anestésicos, do processo cicatricial das feridas cirúrgicas e das reações inflamatórias. Além disso, a reprodutibilidade da ligação da artéria coronária requer prática cirúrgica extensa e pode resultar em infartos de tamanho variável (VAN DEN BOS et al., 2005).

Dentre os métodos não invasivos, destaca-se a utilização da isoprenalina, um potente agonista  $\beta$ -adrenérgico empregado no tratamento de emergências alérgicas, estado de asma, asma brônquica, bradicardia ventricular, parada cardíaca e glaucoma (AMANO et al., 2007), que tem sido amplamente utilizado como um modelo bem padronizado para induzir infarto do miocárdio em ratos (HUANG et al., 2018). É um método vantajoso pois possui baixa taxa de morbidade e de mortalidade quando comparado aos outros modelos experimentais (SAEED; AHMED, 2006).

### **3. OBJETIVO**

Objetiva-se investigar em ratos, tratados com isoprenalina, a estrutura e a microestrutura do coração e sua inervação extrínseca simpática, aplicando-se métodos quantitativos tridimensionais, baseados na estereologia.

#### **3.1 OBJETIVO ESPECÍFICO**

##### **3.1.1. No Coração:**

- Volume do ventrículo esquerdo;
  - Volume total de fibras musculares cardíacas;
  - Volume total de interstício e/ou fibrose;

##### **3.1.2. No gânglio estrelado:**

- Volume total do gânglio
  - Volume total de neurônios:

##### **3.1.3. Testes bioquímicos**

- CK;
- CK-MB;
- Troponina;

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. ANIMAIS

Foram utilizados 12 ratos Wistar, machos, adultos com peso médio de 289,6 gramas, provenientes do biotério de produção de ratos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP ICB/USP. Os procedimentos experimentais e de eutanásia foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ-USP sob número: 7392150119. Os animais foram mantidos em sala climatizada, com temperatura entre 22-24°C, com ciclo claro-escuro de 12h e fornecida ração para roedor e água a vontade.

Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- **Grupo I:** controle (6 animais)
- **Grupo II:** tratado (6 animais)

#### 4.1.1. Grupo I

Grupo controle. Os animais não receberam a solução de cloridrato de isoprenalina (I5627, Sigma Aldrich). Os animais foram eutanasiados, seguindo o protocolo descrito a seguir.

#### 4.1.2. Grupo II

Nos ratos do grupo II foi administrado 150 mg/kg/animal do fármaco cloridrato de isoprenalina (I5627, Sigma Aldrich) em duas aplicações, via subcutânea (SC), com intervalos de 24 horas entre as aplicações. Para tanto, o fármaco foi diluído em 2 ml de solução salina 0,9% e conservado refrigerado. Após 24 horas da última aplicação, os animais foram eutanasiados, seguindo o protocolo descrito a seguir.

## 4.2. COLHEITA DE SANGUE

No grupo controle, após a eutanásia, o coração foi exposto por toracotomia e realizou-se a colheita de sangue diretamente do átrio direito por meio de agulha descartável, número 26 (26 gauge), acoplada a seringa descartável, colhendo volume total de três ml. Finalizada a colheita de sangue, iniciou-se a fixação do animal via ventrículo esquerdo. Os procedimentos de eutanásia e fixação serão descritos adiante.

No grupo tratado, após 24 horas da primeira aplicação do fármaco isoprenalina, foi realizada a colheita via veia caudal por meio de cateter acoplado a seringa de 3 ml. As caudas foram submersas em água a temperatura ao redor de 42°C por 40 a 50 segundos, seguida da assepsia com digluconato de clorexidina 0,5% (Riohex, indústria Farmacêutica Rioquímica LTDA), conforme procedimento descrito por (LEE; GOOSENS, 2015). A colheita, após 24 horas da segunda aplicação da isoprenalina, seguiu-se o mesmo procedimento do grupo controle.

As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por cinco minutos em centrífuga Centribio® 80 – 2B para a separação do soro o qual foi armazenado em eppendorf de 1 ml a temperatura de - 20°C até o envio para o laboratório de análises clínicas do Hospital Veterinário Santo Agostinho, Belo Horizonte, MG.

### 4.2.1. Técnicas para os testes bioquímicos

As amostras congeladas foram enviadas ao Hospital Veterinário Santo Agostinho pela empresa LogLife, especialista em transportes de materiais biológicos. As dosagens bioquímicas foram realizadas segundo os kits e equipamentos descritos abaixo para:

Analito: **Troponina**

Kit: Alere Triage® Teste de Troponina I

Método: Imunoensaio de fluorescência

Equipamento: Triage MeterPro (Biosite)

Analito: **CK**

Kit: CKI Dimension (Siemens)

Método: Cinética Bicromática taxa

Equipamento: Dimension EXL200 (Siemens)

Analito: **CKMB**

Kit: MBI Dimension (Siemens)

Método: Cinética Bicromática taxa

Equipamento: Dimension EXL200 (Siemens)

#### 4.3. EUTANÁSIA

Para eutanásia os animais foram anestesiados com a combinação de cloridrato de xilazina [(2,5 mg/kg) Anasedan® - CEVA, Paulínea, SP]; cloridrato de cetamina [(100 mg/kg) Dopalen® - CEVA, Paulínea, SP]; acepromazina [(2 mg/kg) Acepran® - Vetnil, Louveira, SP] e posteriormente alocados em câmara de CO<sub>2</sub> (RED – Indústria e Comércio) até o óbito.

#### 4.4. COLHEITA DO CORAÇÃO E DO GÂNGLIO ESTRELADO

Após o óbito, o animal foi posicionado em calha, em decúbito dorsal, e realizada toracotomia ampla para exposição das estruturas da cavidade torácica. Visibilizado o coração, foi feita a perfusão com tampão fosfato salino (PBS) via ventrículo esquerdo para a lavagem do sistema vascular. Em seguida, foi realizada a perfusão com solução de paraformaldeído 4% para fixação do animal.

Posteriormente à fixação, os lobos pulmonares direito e esquerdo foram removidos para facilitar a visualização dos vasos da base do coração para a colheita do mesmo. Os corações foram então removidos da cavidade torácica e armazenados em frascos com solução de paraformaldeído 4% e mantidos por 24 horas a 4°C.

Ato contínuo à colheita do coração, foram dissecados, com a ajuda de estereomicroscópio, os gânglios estrelados direito e esquerdo (Figura 1) que

estão dispostos paralelamente ao longo dos corpos vertebrais e na altura da segunda e terceira costelas. Os gânglios foram delicadamente removidos e seu comprimento mensurado por meio de paquímetro digital.

Após a colheita, os gânglios foram mantidos por 24 horas em solução de paraformaldeído 4% e posteriormente imersos em álcool 70% por 24h. Em seguida, os gânglios foram desidratados em ordem crescente de álcool, clarificados em xilol e incluídos em parafina. O gânglio foi seccionado exaustivamente em micrótomo, gerando secções histológicas de 5  $\mu$ m de espessura e toda 20<sup>a</sup> secção foi coletada em lâminas e coradas com hematoxilina eosina (HE). As imagens foram capturadas por meio de câmera digital (AxioCam HRc, Axio vision 4.8) acoplada ao microscópio de luz Olympus Bx 60.

Figura 1 – Gânglio estrelado esquerdo de rato Wistar



Fonte: AMARO, (2020).

Legenda: Em destaque imagem, em estereomicroscópio, do gânglio estrelado esquerdo (retângulo vermelho).

## 4.5. ANÁLISE ESTEREOLÓGICA

### 4.5.1. Estimativa do volume total do ventrículo esquerdo

Dos corações previamente fixados, foram individualizados os ventrículos esquerdos (VE). O volume total do VE foi estimado pelo método de Cavalieri (GUNDERSEN et al., 1999). O VE foi seccionado em fatias de aproximadamente 5 mm de espessura, perpendiculares ao eixo base-ápice (Figura 2). Sobre cada fatia foi sobreposto, aleatoriamente, um sistema de pontos. Foram contados os pontos que tocaram a parede do ventrículo esquerdo (P), bem como os pontos que tocaram o lume (L) (SASAHARA; MACHADO, 2019) (Figura 3).

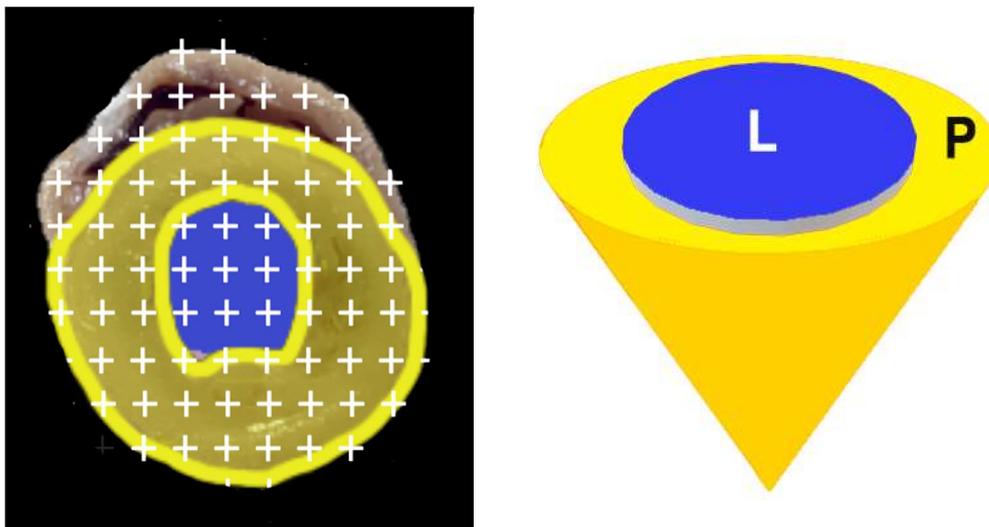
Figura 2 – Amostragem do ventrículo esquerdo de rato Wistar.



Fonte: AMARO, (2020).

Legenda: Etapas para amostragem do VE; o coração do rato Wistar foi seccionado em fatias de 5 mm para a estimativa do volume do ventrículo esquerdo; A partir das fatias foram gerados fragmentos de diferentes tamanhos e posteriormente amostradas. Barra de escala: 1cm.

Figura 3 – Fatia do coração com sistema de pontos para estimativa do volume do ventrículo esquerdo

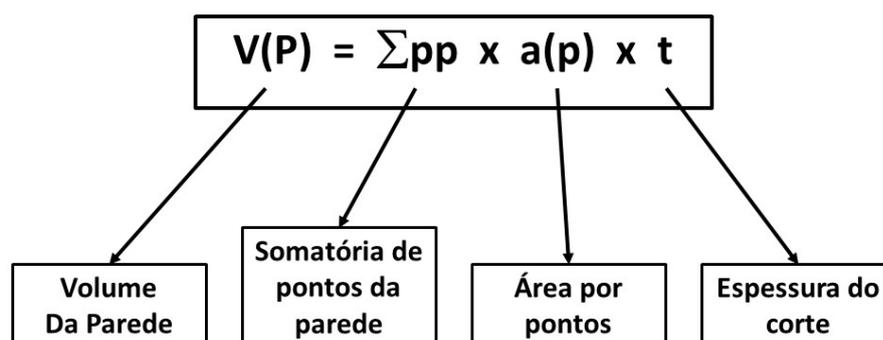


Fonte: AMARO, (2020).

Legenda: Fatia do coração perpendicular ao eixo base-ápice para a estimativa do volume do VE. Parede, em amarelo (P) e lume, em azul, (L).

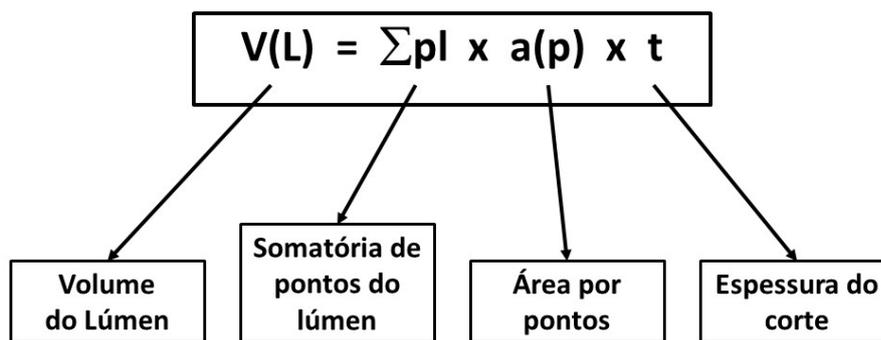
Para a estimativa do volume da parede do VE e do lume foi aplicada a seguinte fórmula (Figura 4 e 5).

Figura 4 – Fórmula do Princípio de Cavalieri para volume da parede cardíaca



Legenda: Fórmula para o cálculo do volume da parede cardíaca do ventrículo esquerdo.

Figura 5 – Fórmula do Princípio de Cavalieri para volume do lume cardíaco



Legenda: Fórmula para o cálculo do volume do interstício cardíaco do ventrículo esquerdo.

- O volume do VE foi calculado somando-se o  $V(P) + V(L)$ .

#### 4.5.2. Amostragem do VE

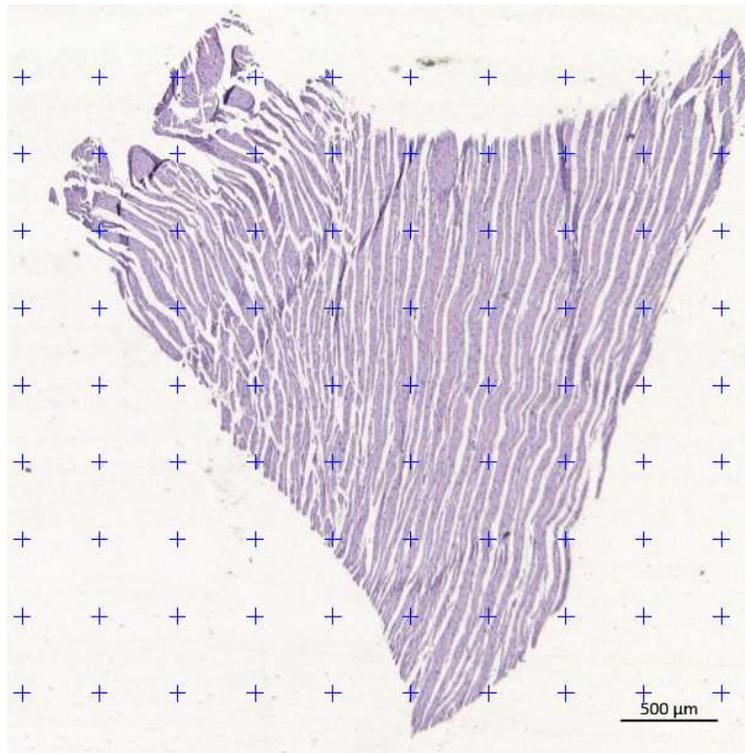
Depois de estimado o volume total do VE, as fatias foram seccionadas em fragmentos de diferentes tamanhos e organizadas em ordem crescente, de acordo com o Princípio do “Smooth Fractionator” (GUNDERSEN, 2002). Os fragmentos foram amostrados seguindo o padrão de amostragem, sistemática, uniforme e aleatória (SURS) (Figura 2). Do total de fragmentos, 1/5 foram amostrados para os procedimentos para a estimativa do volume total de fibras musculares e volume total do interstício. Os fragmentos não amostrados foram armazenados em PFA 4%.

#### 4.5.3. Estimativa do volume total de fibras musculares cardíacas (FMC) e do volume total de Interstício cardíaco ou fibrose

##### 4.5.3.1. Densidade de volume das fibras musculares cardíacas e do interstício cardíaco ( $V_v$ )

Para determinar o  $V_v$  (FMC) e  $V_v$  (IC) as secções foram selecionadas de acordo com o princípio de amostragem SURS. Diante das secções selecionadas, um sistema de pontos equidistantes, gerado pelo software ImageJ (versão 1.52a), foi sobreposto aleatoriamente à imagem das secções (Figura 6).

Figura 6 – Lâmina histológica de fragmento da parede do ventrículo esquerdo

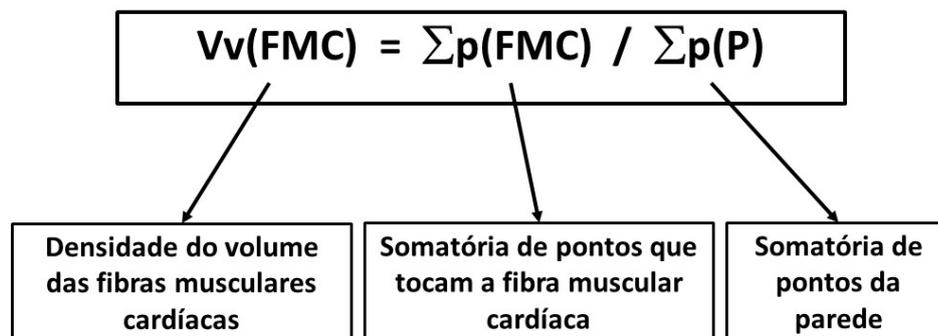


Fonte: AMARO, (2020)

Legenda: Lâmina histológica corada com Hematoxilina e Eosina, de fragmento obtido da parede do ventrículo esquerdo, com malha de pontos para estimativa do volume de fibras musculares cardíacas, e interstício cardíaco ou região de fibrose.

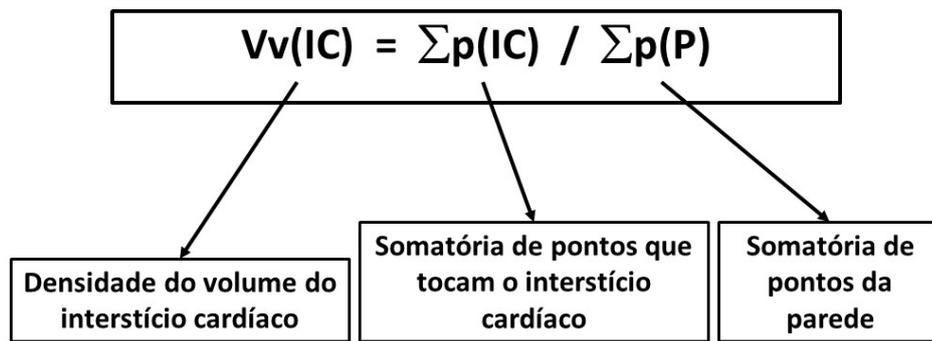
Os pontos que tocaram as fibras musculares cardíacas foram contatos bem como os pontos que tocaram o interstício cardíaco. As densidades de volume (FMC e IC) foram calculadas a partir das formulas abaixo (Figura 7 e 8).

Figura 7 – Fórmula para cálculo de densidade de volume das fibras musculares cardíacas



Legenda: Fórmula para o cálculo da densidade do volume das fibras musculares cardíacas.

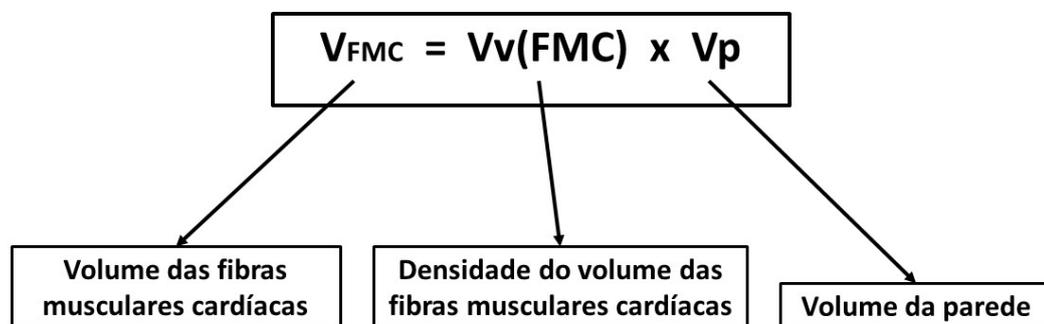
Figura 8 – Fórmula para cálculo de densidade de volume do interstício cardíaco ou fibrose



Legenda: Fórmula para o cálculo da densidade do volume do interstício cardíaco ou fibrose.

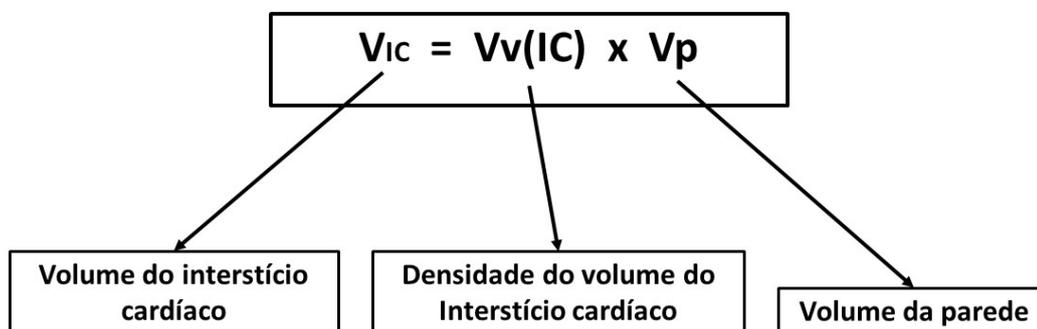
Após calcular a densidade do volume das fibras musculares cardíacas e do interstício cardíaco, estimou-se o volume total das fibras musculares e o volume total do interstício cardíaco pelas fórmulas indicadas nas (Figuras 9 e 10).

Figura 9 – Fórmula para cálculo do volume total das fibras musculares cardíacas.



Legenda: Fórmula para o cálculo do volume total das fibras musculares cardíacas da parede do ventrículo esquerdo.

Figura 10 – Fórmula para cálculo do volume total do interstício cardíaco ou fibrose



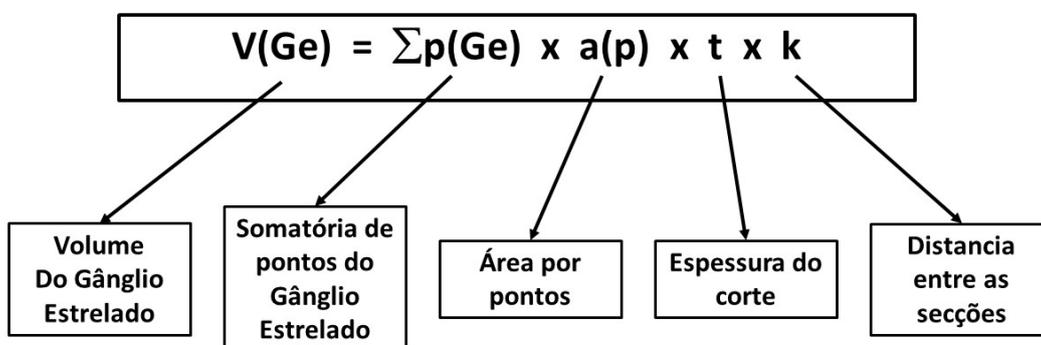
Legenda: Fórmula para o cálculo do volume total do interstício cardíaco da parede do ventrículo esquerdo.

#### 4.5.4. Estimativa do volume total do gânglio estrelado

O volume total do gânglio estrelado (GE) foi estimado pelo método de Cavalieri (GUNDERSEN et al., 1999). Para obter o  $V(GE)$ , um sistema de pontos equidistantes, gerado pelo software imageJ (versão 1.52a) foi sobreposto aleatoriamente às imagens das secções histológicas.

Os pontos que tocavam o gânglio estrelado foram contados. E a fórmula usada para o cálculo de volume total do gânglio estrelado foi (Figura 11):

Figura 11 – Fórmula para cálculo do volume total do gânglio estrelado



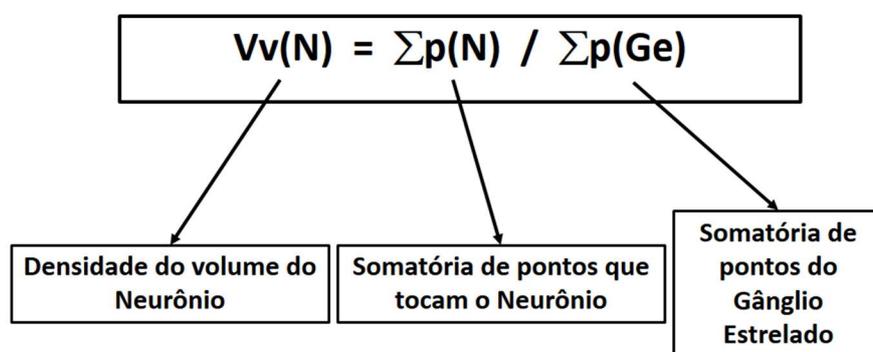
Legenda: Fórmula para o cálculo do volume total do gânglio estrelado.

#### 4.5.5. Estimativa do volume total de neurônios

Para estimar o volume total de neurônios um sistema de pontos equidistantes, gerado pelo software ImageJ (versão 1.52a) foi sobreposto aleatoriamente à imagem das secções.

Os pontos que tocavam os neurônios foram contatos. A fórmula usada para o cálculo da densidade de volume do neurônio está representada na (Figuras 12).

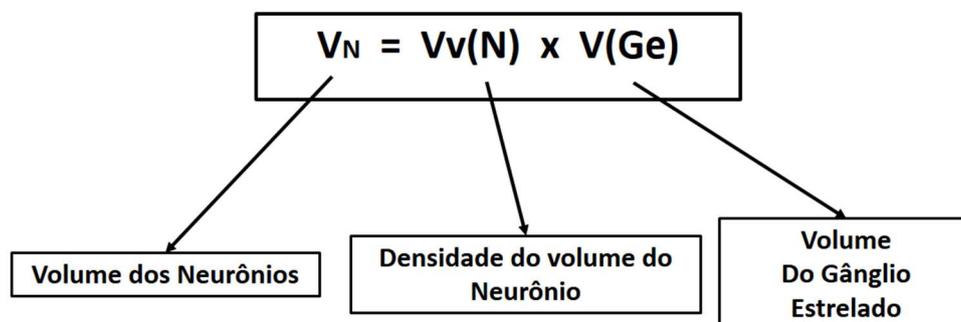
Figura 12 – Fórmula para cálculo da densidade do volume de neurônio



Legenda: Fórmula para o cálculo da densidade do volume de neurônios do gânglio estrelado.

Após calcular a densidade de volume dos neurônios, estimou-se o volume total de neurônios de acordo com a fórmula apresentada na (Figura 13).

Figura 13 – Fórmula para cálculo do volume de neurônio



Legenda: Fórmula para o cálculo do volume dos neurônios do gânglio estrelado.

#### 4.5.6. ANALISE ESTATISTICA

Os resultados foram expressos pelo valor médio seguido pelo coeficiente de variação (CV). Para a estimativa do volume a partir do princípio de Cavalieri foi calculado o coeficiente de erro (CE) (NYENGAARD, 1999). Para a análise estatística foi aplicado o teste de análise de variância (one-way- ANOVA). Detectada diferença entre os grupos ( $p < 0,05$ ) foi aplicado o teste de Tukey para múltiplas comparações. Utilizou-se o software estatístico Minitab® 19, versão 19.2.0.0.

### 5. RESULTADOS

#### 5.1. EXAMES BIOQUÍMICOS

Os valores das análises bioquímicas para o grupo controle e tratado estão descritos na tabela 1:

Quadro 1 – Resultados da análise bioquímica do grupo controle e tratado respectivamente.

	<b>TROPONINA</b>	<b>CK</b>	<b>CKMB</b>
Grupo Controle	0,055 mg/mL	143 U/L	249,6 U/L
Grupo Tratado 2° dia	2,6 mg/mL*	318 U/L	NR
Grupo Tratado 3° dia	4,77 mg/mL**	184 U/L	205 U/L

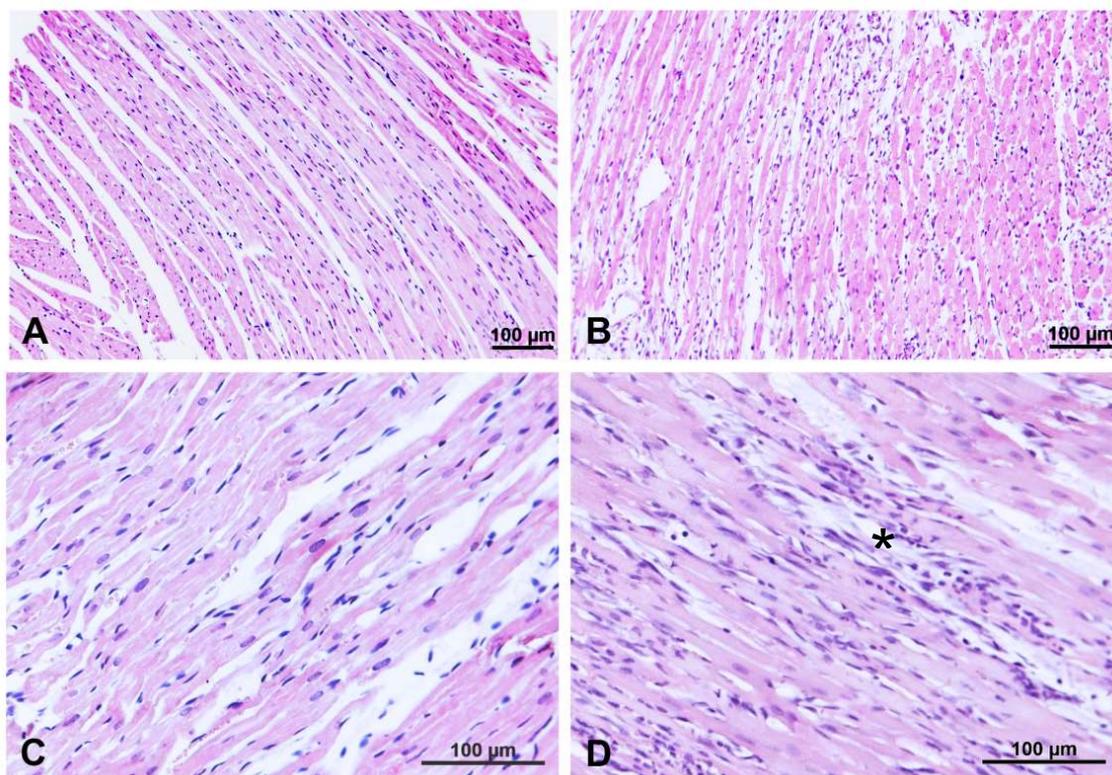
Fonte: AMARO, (2020).

Legenda: Observam-se os valores da análise bioquímica dos animais, valores médios entre os ratos do grupo controle e do grupo tratado, o grupo tratado houve duas coletas em dias subsequentes. \*  $P < 0,05$ . \*\*  $P < 0,01$ .

## 5.2. AVALIAÇÃO QUALITATIVA DO MIOCÁRDIO

No tocante à descrição histológica do miocárdio do ventrículo esquerdo, no grupo controle observou-se tecido muscular cardíaco preservado. Enquanto no grupo tratado, observou-se infiltrado histiocitário e neutrofílico multifocal discreto e discreta congestão no tecido muscular cardíaco (Figura 14).

Figura 14 – Coração do rato Wistar seccionado perpendicularmente para estimativa do volume do ventrículo esquerdo.



Fonte: AMARO, (2020).

Legenda: Fotomicrografia do miocárdio de ratos Wistar. Grupo controle; miocárdio com estrutura preservada (A-C). Grupo tratado; infiltrado histiocitário e neutrofílico multifocal discreto e discreta congestão (\*) (B-D). Coloração: Hematoxilina-eosina.

### 5.3. AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DO VENTRÍCULO ESQUERDO E DA INERVAÇÃO SIMPÁTICA CARDÍACA

#### 5.3.1. Estimativa do volume do ventrículo esquerdo (VE)

O volume médio do ventrículo esquerdo foi de: 1,36 cm<sup>3</sup> (0,14) (0,04), para o grupo controle, e para o grupo tratado, o volume médio do VE foi de: 0,95 cm<sup>3</sup> (0,29) (0,09) (p=0,017).

O volume médio da parede do ventrículo esquerdo, para o grupo controle, foi de: 1,03 cm<sup>3</sup> (0,18) (0,07) e para o grupo tratado foi de: 0,76 cm<sup>3</sup> (0,28) (0,11) (p=0,052). O volume médio do lume do ventrículo esquerdo foi de 0,33 cm<sup>3</sup> (0,12) (0,09) e 0,18 cm<sup>3</sup> (0,45) (0,20), respectivamente para o grupo controle e tratado (p=0,016) (Figura 15 e 16; gráfico 2). O valor percentual da parede do ventrículo esquerdo foi de 76% e de 80% para o grupo controle e tratado e o valor percentual do lume foi de 24% a 20% respectivamente para o grupo controle e tratado (Gráfico 1), a retração global do tecido cardíaco foi para os grupos controle e tratado de aproximadamente 13%.

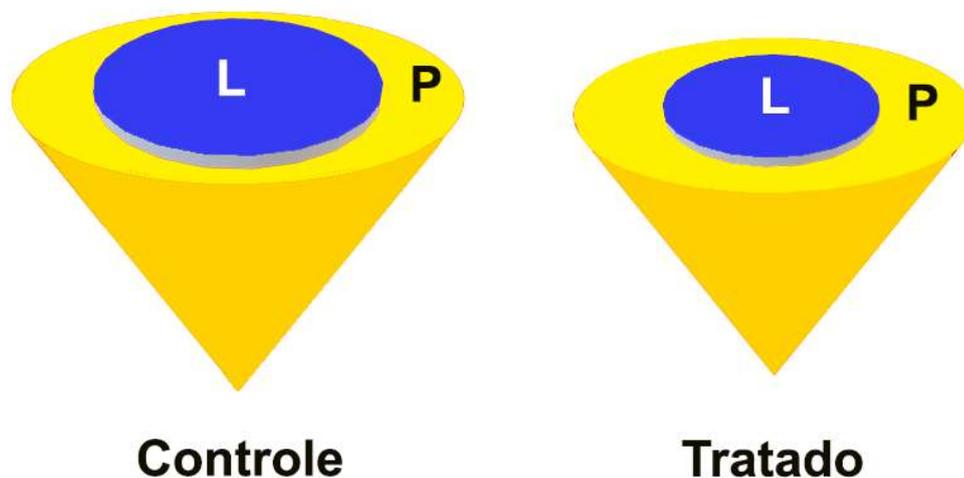
Figura 15 – Secções do coração de ratos Wistar do grupo controle e do grupo tratado



Fonte: AMARO, (2020).

Legenda: Secções perpendiculares ao eixo base-ápice do coração de rato Wistar para estimativa do volume do ventrículo esquerdo. Grupo controle (A). Grupo tratado (B). Escala de barra: 1cm.

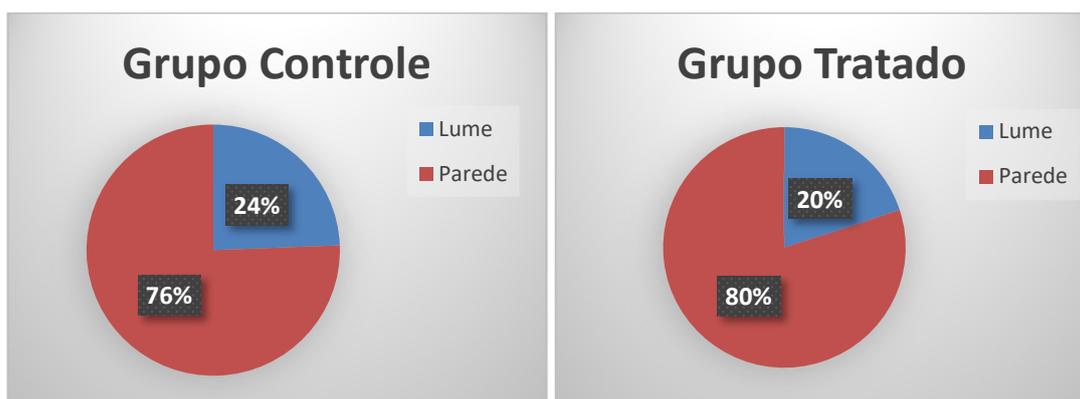
Figura 16 – Esquema do volume do ventrículo esquerdo e sua composição



Fonte: AMARO, (2020).

Legenda: Esquema para exemplificar a composição do ventrículo esquerdo, que é feita por Parede do ventrículo esquerdo (P) e Lume do ventrículo esquerdo (L) para o grupo controle e tratado.

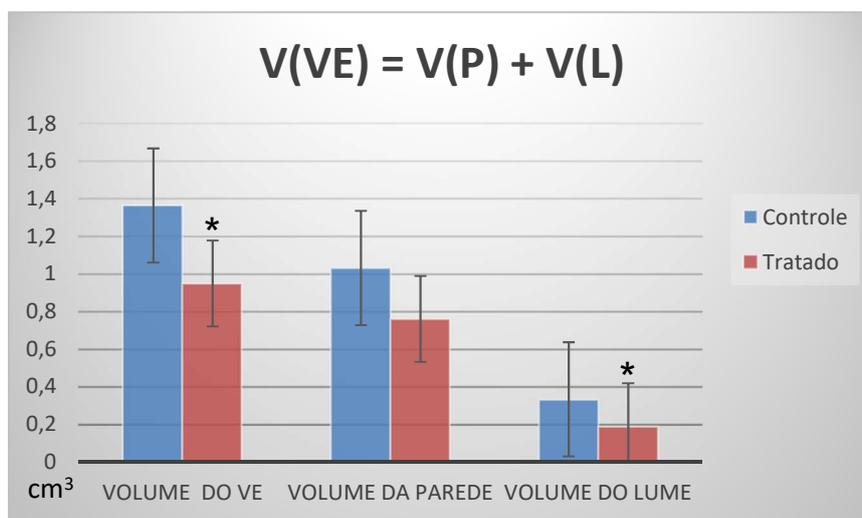
Gráfico 1 - Volume em porcentagem do ventrículo esquerdo e do lume do grupo controle e tratado



Fonte: AMARO, (2020).

Legenda: Observam-se os valores da porcentagem entre a parede do ventrículo esquerdo (VP) e o lume (VL) do grupo controle e tratado respectivamente.

Gráfico 2 – Gráfico comparativo dos volumes total, parede e do lume do ventrículo esquerdo do grupo controle e tratado.



Fonte: AMARO, (2020).

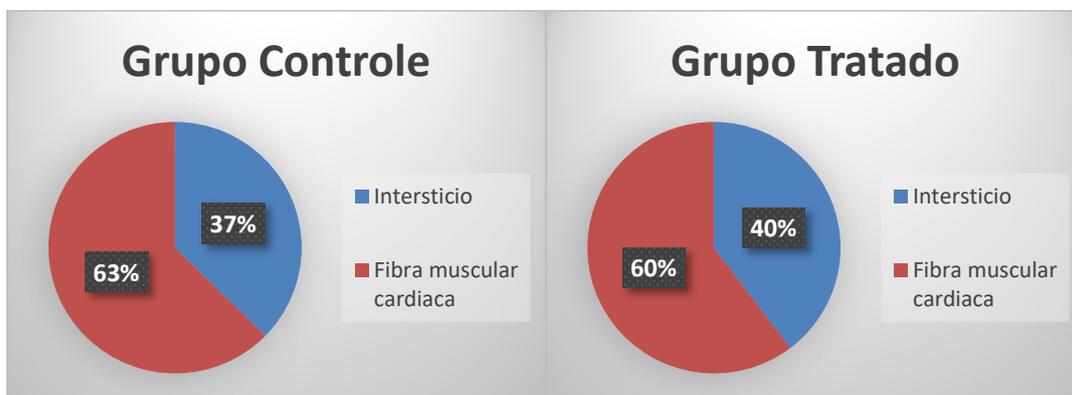
Legenda: valores médios do volume total do ventrículo esquerdo, volume total da parede e volume total do lume do ventrículo esquerdo para o grupo controle e tratado respectivamente.

\* P<0,05.

### 5.3.2. Estimativa do volume total de fibras musculares cardíacas e interstício cardíaco

O volume médio de fibras musculares cardíacas foi de 0,64 cm<sup>3</sup> (0,18) para o grupo controle e de 0,45 cm<sup>3</sup> (0,32) para o grupo tratado. O volume médio de interstício cardíaco foi de 0,38 cm<sup>3</sup> (0,17) para o grupo controle e de 0,30cm<sup>3</sup> (0,23) para o grupo tratado (Gráfico 4), que tem como representação as seguintes porcentagens (Gráfico 3).

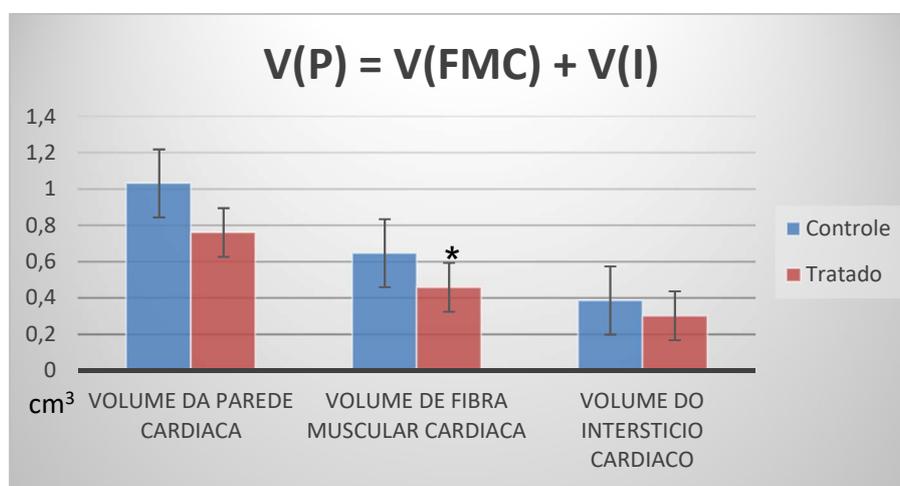
Gráfico 3 - Volume em porcentagem das FMC e IC do grupo controle e tratado.



Fonte: AMARO, (2020).

Legenda: Observam-se os valores da porcentagem do volume médio das fibras musculares cardíacas (FMC) e interstício cardíaco (IC) ou fibrose, dos ratos do grupo controle.

Gráfico 4 - Gráfico comparativo do volume médio da parede, volume da FMC e do IC do ventrículo esquerdo do grupo controle e tratado.



Fonte: AMARO, (2020).

Legenda: Observam-se os valores do volume médio da parede cardíaca, volume da FMC e volume do IC do ventrículo esquerdo, comparativo entre o grupo controle e tratado respectivamente. \*  $P < 0,05$ .

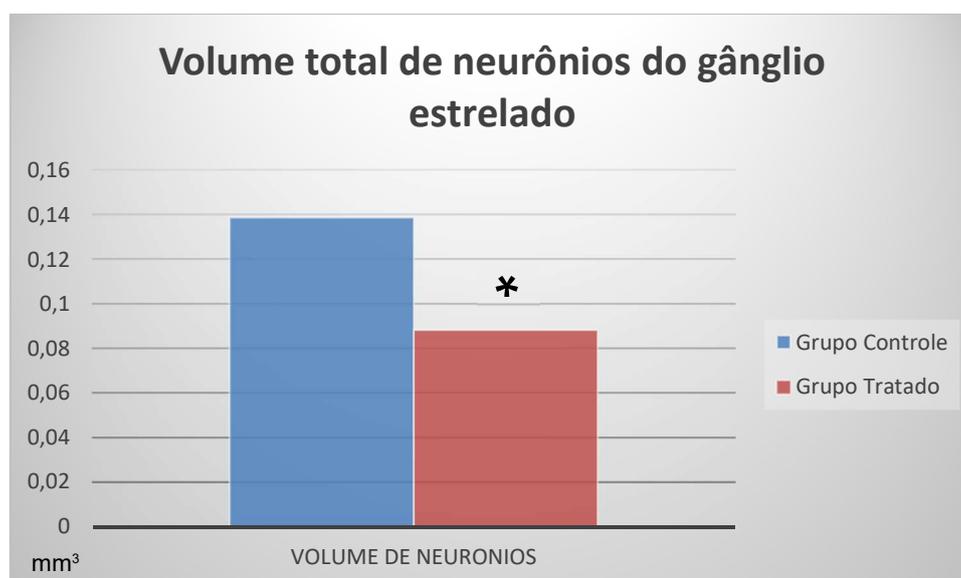
### 5.3.3. Volume do gânglio estrelado (Vref)

O volume médio do gânglio estrelado do grupo controle foi de:  $0,37\text{mm}^3$  (0,08) e coeficiente de erro de 0,03. O volume médio do gânglio estrelado do grupo tratado foi de:  $0,30\text{ mm}^3$  (0,29) e coeficiente de erro de 0,13 ( $p=0,124$ ) (Gráfico 5), a retração global do tecido nervoso foi de aproximadamente 8% para o grupo controle e 6% para o grupo tratado.

### 5.3.4. Volume total de neurônios

O volume dos neurônios do grupo controle foi de:  $0,13\text{ mm}^3$  (0,13) e coeficiente de erro de 0,06. E o volume dos neurônios grupo tratado foi de:  $0,08\text{ mm}^3$  (0,29) e coeficiente de erro de 0,13 ( $p=0,008$ ).

Gráfico 5 - Volume em  $\text{mm}^3$  do gânglio estrelado do grupo controle e tratado



Fonte: AMARO, (2020).

Legenda: valores do volume de neurônios do gânglio estrelado dos ratos do grupo controle e tratado respectivamente. \*  $P<0,05$ .

## 6. DISCUSSÃO

A isoprenalina é um fármaco que atua em receptores beta-adrenérgicos e tem seu uso indicado para pacientes com bradicardia grave não responsivos à atropina, nos tratamentos emergenciais de bloqueio cardíaco e nos estudos eletrofisiológicos para induzir taquicardias ventriculares e supraventriculares (KHWAJA; MAHMOOD; SIDDIQUI, 2016). Pelo fato de ser um simpatomimético, a isoprenalina também tem sido empregada como um indutor do infarto agudo do miocárdio em modelos experimentais (FILHO et al., 2011; ZHOU et al., 2015; KHWAJA; MAHMOOD; SIDDIQUI, 2016; ASAIKUMAR et al., 2019), com destaque aos animais de laboratório como os ratos e camundongos. Apesar de ser um modelo já consagrado na literatura, pouca atenção foi dada à avaliação da morfologia quantitativa do coração e de sua inervação extrínseca simpática.

Alterações na morfologia do coração são reportadas em várias cardiomiopatias, dentre elas o infarto agudo do miocárdio (IAM). O IAM é caracterizado por eventos sequenciais: inflamação, necrose, fibrose e remodelamento que culminam em modificação na estrutura e microestrutura cardíaca. Informações quantitativas são importantes para comprovar ou evidenciar essas alterações. A Estereologia, por empregar métodos quantitativos baseados na geometria e estatística, tem se destacado como uma ferramenta eficiente, precisa e acurada em estudos do coração e das cardiomiopatias (ANDERSEN et al., 2019; MÜHLFELD et al., 2019).

Em nosso estudo, a avaliação da morfologia quantitativa cardíaca foi feita a partir da estimativa do volume do ventrículo esquerdo (VE), formado por dois componentes; volume da parede ventricular (VP) e volume do lume ventricular (VL) (SASAHARA; MACHADO, 2019). Houve redução no volume do VE nos animais tratados com a isoprenalina. O volume da parede e do lume ventricular esquerdo reduziram 26,3% e 43% respectivamente, sendo a proporção parede/lume no grupo controle de 76% e 24%, enquanto no grupo tratado essa proporção foi de 80% e 20%. Em pacientes humanos submetidos à cintilografia do miocárdio, porém foi reportado aumento do volume do ventrículo esquerdo após quatro semanas do IAM (GAUDRON et al., 1993). O aumento do VE após IAM também foi observado no modelo de oclusão da artéria coronária em ratos (PFEFFER et al., 1991).

A parede ventricular ou miocárdio, por sua vez, é formada por dois componentes, as fibras musculares cardíacas (FMC), formada por cardiomiócitos e o interstício cardíaco (IC), que é o tecido de sustentação, formado basicamente por tecido conjuntivo. O volume de cada um desses componentes também foi estimado em nosso estudo.

A estimativa do volume da FMC e do IC se faz essencial na investigação do processo dinâmico das cardiomiopatias que resultam em alterações estruturais e funcionais. O desequilíbrio na proporção desses dois componentes, como por exemplo o aumento do volume do IC, pode revelar aumento no tecido conjuntivo indicando um possível remodelamento cardíaco. Este remodelamento estrutural da matriz colágena do coração geralmente progride para disfunção ventricular e falência congestiva cardíaca (WEBER et al., 1990; WILKE et al., 1996; MÜHLFELD et al., 2019), confirmando a estreita relação entre a morfologia e a função. O processo de remodelamento ocorre após a morte de cardiomiócitos para garantir a integridade do coração (fibrose reparativa). A fibrose reparativa, portanto, é a última etapa do evento sequencial do IAM (SCHIPKE et al., 2017; MÜHLFELD et al., 2019).

Em nosso trabalho, o volume das FMC reduziu 29% enquanto o volume de IC reduziu 21,7% no grupo tratado. A proporção FMC/IC foi de 63% e 37% para o grupo controle e 60% e 40% para o grupo tratado. Esta proporção manteve-se muito próxima, ao comparar os grupos, porque houve redução tanto de FMC quanto de IC no grupo tratado, sugerindo que em nosso modelo não houve remodelamento cardíaco, mas um processo inflamatório evoluindo para necrose, em que se observou fibra muscular cardíaca desorganizada e marcada por lesão celular, necrose coagulativa de cardiomiócitos com infiltração de neutrófilos, com discreta congestão e perda dos discos intercalares, compatível com os achados (HASHMI; AL-SALAM, 2015; HUANG et al., 2018).

Associada à estrutura do coração, as cardiomiopatias podem estar acompanhadas de alterações na inervação autônoma. O gânglio estrelado ou gânglio cervicotorácico constitui o componente principal do sistema nervoso simpático, responsável pela inervação extrínseca do coração. No grupo tratado houve decréscimo no volume total de neurônios do gânglio estrelado, evidenciando a plasticidade neuronal frente à injúria cardíaca.

Muitos trabalhos, no entanto, investigaram os nervos simpáticos distribuídos no coração (BOOGERS et al., 2010; NAKATA et al., 2013; YOKOYAMA et al., 2017). A remodelação do nervo simpático após infarto do miocárdio geralmente está associada à prognóstico desfavorável, porque contribui para a taquiarritmia ventricular. O IAM provoca então denervação simpática, seguida por hiperinervação anormal (BARBER et al., 1983; FALLAVOLLITA et al., 2014).

Em paralelo às alterações na estrutura, na microestrutura e na inervação simpática foram mensuradas as concentrações séricas de troponina I, CK-MB e CK. Os níveis plasmáticos desses marcadores são diretamente proporcionais ao grau de lesões necróticas no miocárdio e, portanto, são considerados marcadores de lesão miocárdica (ACIKEL et al., 2005). No nosso modelo, observou-se aumento na troponina I. Segundo VON JEINSEN; KELLER, (2016) um aumento abrupto nos níveis de concentração de troponina reflete um desequilíbrio isquêmico secundário resultando em necrose miocárdica e injúria cardíaca.

## **CONCLUSÕES**

Conclui-se que em nosso modelo de IAM, a isoprenalina não induziu remodelamento cardíaco, mas um processo inflamatório de evolução para necrose que resultou em diminuição do volume do ventrículo esquerdo, compatível com redução no volume das fibras musculares cardíacas. Além de decréscimo no volume total de neurônios do gânglio estrelado, evidenciando a plasticidade neuronal frente à injúria cardíaca.

## REFERÊNCIAS

- ACIKEL, M. et al. Protective effects of dantrolene against myocardial injury induced by isoproterenol in rats: Biochemical and histological findings. **International Journal of Cardiology**, v. 98, n. 3, p. 389–394, 28 fev. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15708169/>>. Acesso em: 26 nov. 2020.
- AMANO, S. et al. Inhibitory effect of NPY on isoprenaline-induced osteoclastogenesis in mouse bone marrow cells. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1770, n. 6, p. 966–973, 2007.
- ANDERSEN, S. et al. Pressure overload induced right ventricular remodeling is not attenuated by the anti-fibrotic agent pirfenidone. **Pulmonary Circulation**, v. 9, n. 2, 2019.
- ASAIKUMAR, L. et al. Preventive effect of nerolidol on isoproterenol induced myocardial damage in Wistar rats: Evidences from biochemical and histopathological studies. **Drug Development Research**, v. 80, n. 6, p. 814–823, 2019.
- BAENA, C. P. et al. Tendency of mortality in acute myocardial infarction in Curitiba (PR) in the period of 1998 to 2009. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 98, n. 3, p. 211–217, mar. 2012.
- BARBER, M. J. et al. Transmural myocardial infarction in the dog produces sympathectomy in noninfarcted myocardium. **Circulation**, v. 67, n. 4, p. 787–796, abr. 1983. Disponível em: <<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.CIR.67.4.787>>. Acesso em: 28 nov. 2020.
- BARBERI, C.; VAN DEN HONDEL, K. E. **The use of cardiac troponin T (cTnT) in the postmortem diagnosis of acute myocardial infarction and sudden cardiac death: A systematic review** *Forensic Science International* Elsevier Ireland Ltd, , 1 nov. 2018. .
- BOOGERS, M. J. et al. Cardiac Sympathetic Denervation Assessed With 123-Iodine Metaiodobenzylguanidine Imaging Predicts Ventricular Arrhythmias in Implantable Cardioverter-Defibrillator Patients. 2010.
- BURSTEIN, B.; NATTEL, S. **Atrial Fibrosis: Mechanisms and Clinical**

**Relevance in Atrial Fibrillation** *Journal of the American College of Cardiology* Elsevier USA, , 26 fev. 2008. .

CAMILLERI, J. P. et al. Experimental Myocardial Infarction in the Rat as a Quantitative Model for the Study of Anti-Ischemic Interventions. **Pathology Research and Practice**, v. 172, n. 1–2, p. 42–52, 1981.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6. ed. ed. [s.l: s.n.]

DEUCHARS, S. A.; LALL, V. K. Sympathetic preganglionic neurons: Properties and inputs. **Comprehensive Physiology**, v. 5, n. 2, p. 829–869, 1 abr. 2015.

DOBACZEWSKI, M.; GONZALEZ-QUESADA, C.; FRANGOIANNIS, N. G. **The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction** *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, mar. 2010. .

DYCE, K. M.; WENSING, C. J. G.; SACK, W. O. **Tratado de Anatomia Veterinaria**. 4. ed. [s.l: s.n.]

EGIDO, J. et al. **Animal models of cardiovascular diseases** *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011. .

FALLAVOLLITA, J. A. et al. Regional myocardial sympathetic denervation predicts the risk of sudden cardiac arrest in ischemic cardiomyopathy. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 63, n. 2, p. 141–149, 21 jan. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24076296/>>. Acesso em: 28 nov. 2020.

FILHO, H. G. L. et al. Modelo experimental de infarto do miocárdio induzido por isoproterenol em ratos. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 26, n. 3, p. 469–476, 2011.

FRANCIS STUART, S. D. et al. **The crossroads of inflammation, fibrosis, and arrhythmia following myocardial infarction** *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* Academic Press, , 1 fev. 2016. .

GABBIANI, G. **The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases** *Journal of Pathology*, 1 jul. 2003. .

GAO, C. et al. Inflammatory and apoptotic remodeling in autonomic nervous system following myocardial infarction. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, 1 maio 2017.

GAUDRON, P. et al. Progressive left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction: Potential mechanisms and early predictors. **Circulation**, v.

87, n. 3, p. 755–763, 1993. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8443896/>>. Acesso em: 28 nov. 2020.

GUNDERSEN, H. J. G. et al. The efficiency of systematic sampling in stereology - Reconsidered. **Journal of Microscopy**, v. 193, n. 3, p. 199–211, 1999. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10348656/>>. Acesso em: 26 nov. 2020.

GUNDERSEN, H. J. G. Stereological estimation of tubular length. **Journal of Microscopy**, v. 207, n. 2, p. 155–160, ago. 2002. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2818.2002.01047.x>>. Acesso em: 12 jan. 2020.

HASHMI, S.; AL-SALAM, S. Acute myocardial infarction and myocardial ischemia-reperfusion injury: A comparison. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 8, p. 8786–8796, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26464621/>>. Acesso em: 25 nov. 2020.

HEDGER, J. H.; WEBBER, R. H. Anatomical study of the cervical sympathetic trunk and ganglia in the albino rat (&lt;i&gt;Mus norvegicus albinus&lt;/i&gt;). **Cells Tissues Organs**, v. 96, n. 2, p. 206–217, 1976. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/FullText/144674>>. Acesso em: 24 nov. 2020.

HOLMES, J. W.; BORG, T. K.; COVELL, J. W. Structure and Mechanics of Healing Myocardial Infarcts. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 7, n. 1, p. 223–253, 15 ago. 2005.

HUANG, H. et al. Protective effect of scutellarin on myocardial infarction induced by isoprenaline in rats. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 21, n. 3, p. 267–276, 2018.

INOUE, H.; ZIPES, D. P. Time course of denervation of efferent sympathetic and vagal nerves after occlusion of the coronary artery in the canine heart. **Circulation Research**, v. 62, n. 6, p. 1111–1120, jun. 1988. Disponível em: <<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.RES.62.6.1111>>. Acesso em: 25 nov. 2020.

JANICKI, O. S.; BROWER, G. L. The role of myocardial fibrillar collagen in ventricular remodeling and function. In: *Journal of Cardiac Failure*, 6 SUPPL., **Anais...**Churchill Livingstone Inc., 2002.

JOHNS, T. N. P.; OLSON, B. J. Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. **Annals of surgery**, v. 140, n. 5, p. 675–

682, 1 nov. 1954.

JUGDUTT, B. I. **Remodeling of the myocardium and potential targets in the collagen degradation and synthesis pathways** *Current Drug Targets - Cardiovascular and Haematological Disorders* Bentham Science Publishers B.V., , 2003. .

KAWASHIMA, T. The autonomic nervous system of the human heart with special reference to its origin, course, and peripheral distribution. **Anatomy and Embryology**, v. 209, n. 6, p. 425–438, jun. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15887046/>>. Acesso em: 26 nov. 2020.

KHWAJA, S.; MAHMOOD, T.; SIDDIQUI, H. H. Effect of ethanolic extract of *Cyperus rotundus* L. against isoprenaline induced cardiotoxicity. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 54, n. 10, p. 670–675, 1 out. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30084568/>>. Acesso em: 28 nov. 2020.

KÖNIG, H.; LIEBICH, H. **Anatomia dos Animais Domésticos**. [s.l: s.n.]

KUMAR, V.; ABBAS, A.; ASTER, J. C. **Robbins and Cotran Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. [s.l: s.n.]

LEASK, A. **Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: TGF $\beta$ , angiotensin, endothelin, CCN2, and PDGF, partners in fibroblast activation** *Circulation Research*, 11 jun. 2010. .

LEE, G.; GOOSENS, K. A. Sampling blood from the lateral tail vein of the rat. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2015, n. 99, p. 52766, 18 maio 2015. Disponível em: <[www.jove.com?url=https://www.jove.com/video/52766](http://www.jove.com?url=https://www.jove.com/video/52766)>. Acesso em: 26 nov. 2020.

MALTA, D. C. et al. Mortalidade por doenças crônicas não transmissíveis no Brasil e suas regiões, 2000 a 2011. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 23, n. 4, p. 599–608, dez. 2014.

MASSBERG, S.; POLZIN, A. Update ESC-Guideline 2017: Dual Antiplatelet Therapy. **Deutsche Medizinische Wochenschrift**, v. 143, n. 15, p. 1090–1093, 1 ago. 2018.

MCGOWAN, C. L. et al. Discordance between microneurographic and heart-rate spectral indices of sympathetic activity in pulmonary arterial hypertension. **Heart**, v. 95, n. 9, p. 754–758, maio 2009.

MÜHLFELD, C. et al. A transmural gradient of myocardial remodeling in early-stage heart failure with preserved ejection fraction in the pig. **Journal of**

**Anatomy**, n. October, p. 1–9, 2019.

NAKATA, T. et al. A pooled analysis of multicenter cohort studies of 123I-mIBG imaging of sympathetic innervation for assessment of long-term prognosis in heart failure. **JACC: Cardiovascular Imaging**, v. 6, n. 7, p. 772–784, jul. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23845574/>>. Acesso em: 28 nov. 2020.

NASCIMENTO, B. R. et al. **Implementing myocardial infarction systems of care in low/middle-income countries**HeartBMJ Publishing Group, , 1 jan. 2019. .

PFEFFER, J. M. et al. Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 260, n. 5 29-5, 1991. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2035662/>>. Acesso em: 28 nov. 2020.

PRINCE, P. S. M.; DHANASEKAR, K.; RAJAKUMAR, S. Preventive effects of vanillic acid on lipids, bax, Bcl-2 and myocardial infarct size on isoproterenol-induced myocardial infarcted rats: A biochemical and in vitro study. **Cardiovascular Toxicology**, v. 11, n. 1, p. 58–66, mar. 2011.

SAEED, S. A.; AHMED, S. Anti-ischemic effects of nimesulide, a cyclooxygenase-2 inhibitor on the ischemic model of rabbit induced by isoproterenol. **Archives of Pharmacal Research**, v. 29, n. 11, p. 977–983, nov. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17146966>>. Acesso em: 12 jan. 2020.

SASAHARA, T. H. C.; MACHADO, M. R. F. The effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on mice myocardial morphology. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 39, n. 5, p. 364–370, 2019.

SCHEEN, A. J. From atherosclerosis to atherothrombosis: From a silent chronic pathology to an acute critical event. **Revue Medicale de Liege**, v. 73, n. 5–6, p. 224–228, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29926559>>. Acesso em: 12 jan. 2020.

SCHIPKE, J. et al. Assessment of cardiac fibrosis: A morphometric method comparison for collagen quantification. **Journal of Applied Physiology**, v. 122, n. 4, p. 1019–1030, 2017.

TANAKA, Y. et al. Diffuse fibrosis leads to a decrease in unipolar voltage: Validation in a swine model of premature ventricular contraction-induced

- cardiomyopathy. **Heart Rhythm**, v. 13, n. 2, p. 547–554, 1 fev. 2016.
- THOMES, P. et al. Cardioprotective activity of Cladosiphon okamuranus fucoidan against isoproterenol induced myocardial infarction in rats. **Phytomedicine**, v. 18, n. 1, p. 52–57, 15 dez. 2010.
- THYGESEN, K.; ALPERT, J. S.; WHITE, H. D. **Universal Definition of Myocardial Infarction** *Journal of the American College of Cardiology*, 27 nov. 2007. .
- UPAGANLAWAR, A.; BALARAMAN, R. Cardioprotective effects of Lagenaria siceraria fruit juice on isoproterenol-induced myocardial infarction in wistar rats: A biochemical and histoarchitecture study. **Journal of Young Pharmacists**, v. 3, n. 4, p. 297–303, 2011.
- VAN DEN BOS, E. J. et al. A novel model of cryoinjury-induced myocardial infarction in the mouse: A comparison with coronary artery ligation. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 289, n. 3 58-3, set. 2005.
- VON JEINSEN, B.; KELLER, T. Strategies to overcome misdiagnosis of type 1 myocardial infarction using high sensitive cardiac troponin assays. **Diagnosis (Berlin, Germany)**, v. 3, n. 4, p. 189–198, 1 dez. 2016. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/view/journals/dx/3/4/article-p189.xml>>. Acesso em: 26 nov. 2020.
- WASSILEW, K. et al. Ultrastructural morphometric findings of cardiomyocytes in patients with impaired ventricular function - A comparative clinicopathological study. **Cardiovascular Pathology**, v. 25, n. 1, p. 25–32, 1 jan. 2016.
- WEBER, K. T. et al. Karl T. Weber,. 1990.
- WEINTRAUB, W. S. et al. **Value of primordial and primary prevention for cardiovascular disease: A policy statement from the American Heart Association** *Circulation*, 2011. . Disponível em: <<http://circ.ahajournals.org>>. Acesso em: 12 jan. 2020.
- WILKE, A. et al. Effect of the renin-angiotensin-aldosterone system on the cardiac interstium in heart failure. **Basic Research in Cardiology, Supplement**, v. 91, n. 2, p. 79–84, 1996.
- YOKOYAMA, T. et al. Quantification of sympathetic hyperinnervation and denervation after myocardial infarction by three-dimensional assessment of the cardiac sympathetic network in cleared transparent murine hearts. **PLoS ONE**,

v. 12, n. 7, 1 jul. 2017.

ZHOU, W. et al. Acute Effects of Pacing at Different Ventricular Sites on Left Ventricular Rotational Mechanics in a Porcine Model. **Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia**, v. 29, n. 5, p. 1148–1154, 1 out. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25824449/>>. Acesso em: 26 nov. 2020.

ZHU, C. et al. Phloroglucinol averts isoprenaline hydrochloride induced myocardial infarction in rats. **Drug Development Research**, v. 80, n. 4, p. 453–460, 1 jun. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30889286/>>. Acesso em: 25 nov. 2020.