

**MARIA CRISTINA DONADIO ABDUCH**

**Avaliação dos mecanismos adaptativos do miocárdio  
durante sobrecarga de pressão induzida  
com o uso de bandagem do tronco pulmonar:  
participação da proliferação celular**

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

Área de concentração: Cardiologia

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Vera Demarchi Aiello

**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

Abduch, Maria Cristina Donadio

Avaliação dos mecanismos adaptativos do miocárdio durante sobrecarga de pressão induzida com o uso de bandagem do tronco pulmonar : participação da proliferação celular / Maria Cristina Donadio Abduch. -- São Paulo, 2006.

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

Departamento de Cardio-Pneumologia.

Área de concentração: Cardiologia.

Orientadora: Vera Demarchi Aiello.

Descritores: 1.Transposição dos grandes vasos 2.Cardiopatias congênitas  
3.Cirurgia torácica 4.Proliferação de células 5.Antígeno KI-67 6.Hipertrofia  
ventricular direita

USP/FM/SBD-293/06

*“Não basta saber, é preciso também aplicar;  
não basta querer, é preciso também agir”.*

*Goethe*

## **Agradecimentos Especiais**

---

Àquelas pessoas que foram imprescindíveis para a realização desta tese e que ocupam um lugar muito especial em meu coração.

À caríssima Dra. Vera Demarchi Aiello, por seu apoio e dedicação incondicionais desde muito antes do início desta tese. Agradeço por ter participado ativamente de todas as etapas deste estudo, começando pela idéia brilhante do tema, e seguindo com toda a orientação séria e cuidadosa, sempre preocupada com minha formação como cientista. Seu exemplo não foi apenas profissional, e sinto-me realmente privilegiada em todos os aspectos de minha vida por tê-la como mentora e modelo a ser seguido. Espero que meu maior reconhecimento seja o de honrar, para sempre, a riqueza recebida com seu convívio, procurando guiar-me pelos seus ensinamentos. E, ousado ainda desejar ser merecedora de perpetuar nossos laços para além deste trabalho.

Ao caríssimo Prof. Dr. Renato Samy Assad, incansável incentivador e entusiasta da Ciência, por ter-me motivado nesta linha de pesquisa, a qual iniciou há mais de uma década. Agradeço pela valiosíssima colaboração neste estudo, pelo reconhecimento de meu trabalho e pela felicidade sincera dos frutos colhidos. Seu exemplo, dedicação e persistência, quaisquer que sejam as adversidades, serão lembrados em todos os momentos, principalmente naqueles mais difíceis, como um incentivo para seguir sempre em frente.

À amantíssima Miriam Abduch, que, para mim, sempre significou muito mais do que uma irmã: minha melhor amiga, conselheira, porto seguro nos momentos mais difíceis de minha vida, a pessoa que sempre se preocupou para que eu tivesse sólida formação moral e intelectual. Minha grande incentivadora, que tantas vezes abriu mão de seus próprios interesses para que eu tivesse as melhores oportunidades. Agradeço pelo amor verdadeiro, dedicação e por compartilhar comigo todos os momentos importantes de minha vida.

## **Agradecimentos**

---

Aos meus pais, Iussef Hana Abduch e Biasina Donadio Abduch, por todos os esforços despendidos em minha formação.

À minha querida irmã Maria Angela Abduch, pelo otimismo e apoio constantes, por me deixar alegre nos momentos tristes e por se orgulhar imensamente de todas as minhas conquistas.

À minha querida irmã Maria da Penha Donadio Abduch Lifschitz e ao meu querido sobrinho Lucas Abduch Lifschitz, pelo apoio e incentivos recebidos.

Ao meu querido primo, Dr. Álvaro Abduchi (*in memoriam*), por ter despertado em mim a vontade de ser médica veterinária, por seu exemplo de amor e respeito aos animais e pela sua contribuição à Cardiologia Veterinária.

Ao Dr. Álvaro Villela de Moraes e ao Dr. Caio Medeiros, por terem aberto as portas do Laboratório de Ecocardiografia do InCor, onde realizei grande parte de meu aprendizado e iniciei minha incursão pela Ciência.

Ao Dr. Miguel Quintana Rodriguez e ao Dr. Acrísio Valente pela coleta dos dados hemodinâmicos, pela amizade e incentivo no transcorrer deste estudo.

Ao Prof. Dr. José Lázaro de Andrade pelo apoio e interesse, viabilizando a realização do estudo ecocardiográfico.

À equipe da Divisão de Experimentação do Instituto do Coração, representada pelo Sr. Nelson Correa Jr., por todo auxílio recebido para a realização dos exames ecocardiográficos.

À equipe do Laboratório de Patologia do Instituto do Coração, especialmente à Dra. Nadia Vieira Sambiasi, Ms. Suely Aparecida Pinheiro Palomino, Dra. Márcia Martins Reis, Sra. Julia Lucia La Chioma Silvestre e Sr. Antonio José Vicente Guedes, pelo precioso auxílio no preparo do material para análise imuno-histoquímica.

À Srta. Solange Consorte, do Laboratório de Patologia do Instituto do Coração, pelo processamento do material para análise morfológica.

Ao Sr. Gerson Lilá Ramos, do Laboratório de Patologia do Instituto do Coração, pelo pronto auxílio prestado em tantos momentos deste trabalho.

À Sra. Creuza Maria Dal Bó, pela colaboração estatística.

À equipe da pós-graduação, Sra. Neusa Rodrigues Dini, Srta. Juliana Lattari Sobrinho e Srta. Eva Malheiros Guiss de Oliveira, por serem sempre tão prestativas, esclarecendo dúvidas e tornando nossas tarefas burocráticas mais simples de serem realizadas.

À FAPESP pelo apoio financeiro a este projeto, através dos processos número 2002/11721-6 e 2004/08825-0.

Ao Instituto do Coração – HC-FMUSP, por me proporcionar as condições necessárias para a realização deste estudo.

À querida amiga, Dra. Lea Maria Macruz Demarchi, pelo apoio e sugestões durante a realização desta tese.

À querida Dra. Maria Angélica Binotto, por ter compartilhado com tanto entusiasmo um momento muito importante deste trabalho.

Aos queridos amigos que fiz durante estes anos, Raquel Fagundes, Alessandra Roggerio e Luciano Borges, por todos os momentos que passamos juntos e por tudo que me ensinaram, com o sincero desejo de que nossa amizade continue além desse convívio.

Aos amigos do Instituto Veterinário de Imagem, representados pelo Prof. Dr. Benedicto Wladimir De Martin, agradeço pelo incentivo recebido, permitindo-me concluir este trabalho.

Aos animais que fizeram parte deste estudo, meu profundo respeito e agradecimento, na certeza de que, sem eles, este trabalho não teria se concretizado e na esperança de que esta pesquisa possa servir de algum modo à Medicina Veterinária.

Aos meus amantíssimos irmãos em Deus, meus cães e meu gato, com quem venho tendo o privilégio da convivência desde o meu nascimento, sou grata por tudo o que me têm ensinado. Agradeço por me amarem incondicionalmente, serem meus grandes amigos das horas de estudo e de lazer, secarem minhas lágrimas com uma graça singela, trazerem calor ao meu coração com um simples olhar e serem o grande motivo de minha escolha profissional. A todos, os que estão presentes e àqueles que fazem parte de minha lembrança, meu agradecimento, respeito e amor eternos.

A Deus, pela grande oportunidade recebida e por poder conviver com pessoas que me ensinam tantas coisas, com tanto empenho.

## Sumário

---

Lista de abreviaturas e siglas	
Lista de símbolos	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Resumo	
Summary	
<b>1. Introdução</b> .....	1
1.1 Fisiologia da circulação fetal .....	2
1.2 Circulação pós-natal na TGA .....	7
1.3 Correção cirúrgica na TGA .....	8
1.4 Considerações sobre o preparo ventricular .....	13
<b>2. Objetivos</b> .....	23
<b>3. Métodos</b> .....	25
3.1 Anestesia .....	26
3.2 Dispositivo de bandagem ajustável do tronco pulmonar .....	27
3.3 Procedimento cirúrgico .....	28
3.4 Protocolo de insuflação do dispositivo de bandagem ajustável .....	29
3.5 Estudo ecocardiográfico .....	31
3.6 Exame morfológico dos corações .....	33
3.6.1 Estudo histológico e morfométrico .....	34
3.6.1.1 Diâmetro das fibras miocárdicas e dos núcleos ..	34
3.6.1.2 Estudo da fração de área de colágeno .....	36
3.6.1.3 Estudo imuno-histoquímico .....	36
3.7 Análise estatística .....	40
<b>4. Resultados</b> .....	42
4.1 Análise hemodinâmica .....	44
4.1.1 Grupo de estimulação intermitente .....	44
4.1.2 Grupo de estimulação contínua .....	45
4.2 Massa estimada do ventrículo direito .....	46
4.3 Aspecto histológico geral .....	48
4.4 Fração de área de colágeno dos ventrículos direito e esquerdo .....	48
4.5 Diâmetro médio dos miocardiócitos e de seus respectivos núcleos .....	50
4.5.1 Miocardiócitos .....	50
4.5.1.1 Comparação entre os grupos .....	51
4.5.1.2 Comparação dentro de cada grupo .....	52
4.5.2 Núcleos .....	53
4.5.2.1 Comparação entre os grupos .....	54
4.5.2.2 Comparação dentro de cada grupo .....	55

4.6 Número de miocardiócitos e células do interstício e vasos positivos para Ki-67 .....	56
4.6.1 Análise do índice de miocardiócitos Ki-67+ .....	56
4.6.1.1 Comparação entre os grupos .....	58
4.6.1.2 Comparação dentro de cada grupo .....	59
4.6.2 Análise do índice de células do interstício e vasos Ki-67+ .....	60
4.6.2.1 Comparação entre os grupos .....	61
4.6.2.2 Comparação dentro de cada grupo .....	62
4.7 Proporção entre índices de miocardiócitos e células do interstício/vasos marcadas com Ki-67 .....	64
<b>5. Discussão .....</b>	<b>65</b>
5.1 Aspectos gerais sobre o preparo ventricular .....	66
5.2 A hipertrofia miocárdica .....	73
5.3 Marcadores da proliferação celular .....	75
5.4 Estudo da proliferação celular .....	81
5.4.1 Miocardiócitos .....	81
5.4.2 Células do interstício e vasos .....	83
5.4.3 Considerações gerais sobre proliferação celular .....	84
5.5 Limitações do estudo .....	89
5.6 Perspectivas futuras .....	90
<b>6. Conclusões .....</b>	<b>92</b>
<b>7. Anexos .....</b>	<b>94</b>
<b>8. Referências .....</b>	<b>97</b>

**Listas**

---

## Lista de Abreviaturas e Siglas

AD	Átrio direito
AE	Átrio esquerdo
Ag	Antígeno
ATP	Adenosina tri-fosfato
Bcl-2	Oncogene envolvido na apoptose celular
BrdU	Bromodeoxiuridina
BSA	Soro albumina bovina
C	Controle
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Dp	Derrame pericárdico
e	Espessura
EC	Estimulação contínua
EI	Estimulação intermitente
EP	Erro padrão
G	<i>Gap</i>
H	Hipótese
HE	Hematoxilina-Eosina
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
ICC	Insuficiência Cardíaca Congestiva
IgG	Imunoglobulina
InCor-HC FMUSP	Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Ki-67	Antígeno de proliferação celular
M	Massa
MIB	<i>Molecular Immunology Borstel</i>
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PCNA	<i>Proliferation cell nuclear antigen</i>
RNAr	Ácido ribonucléico ribossômico
S	Septo interventricular
SHR	<i>Spontaneous hypertensive rat</i>
SD	Metade direita do septo interventricular

SE	Metade esquerda do septo interventricular
TGA	Transposição das grandes Artérias
TP	Tronco pulmonar
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
VAo	Valva aórtica
VD	Ventrículo direito
VE	Ventrículo esquerdo

## Lista de Símbolos

A	Área
°C	Graus Celsius
cm	Centímetro
cm <sup>2</sup>	Centímetro quadrado
g	Gramas
h	Altura
kg	Kilograma
M	Mol
mg	Miligramas
mm Hg	Milímetros de mercúrio
ml	Militros
MHz	Megahertz
mm	Milímetros
μm	Micrômetros
mM	miliMol
pH	Potencial de hidrogênio iônico
U	Unidade

## Lista de Figuras

Figura 1 -	Dispositivo de bandagem do tronco pulmonar .....	28
Figura 2 -	Projeções ecocardiográficas para o cálculo da massa do ventrículo direito .....	32
Figura 3 -	Gradientes de pressão entre o VD e tronco pulmonar nos grupos estimulados .....	45
Figura 4 -	Ecocardiograma basal e após treinamento através de bandagem do tronco pulmonar .....	46
Figura 5 -	Massa estimada do VD ao longo dos dias de treinamento .....	47
Figura 6 -	Porcentagem de área de colágeno, segundo grupo de estudo e segmento cardíaco .....	49
Figura 7 -	Diâmetro transversal dos miocardiócitos, segundo grupo de estudo e segmento cardíaco .....	52
Figura 8 -	Diâmetro transversal dos núcleos de miocardiócitos, segundo grupo de estudo e segmento cardíaco .....	56
Figura 9 -	Núcleos de miocardiócitos marcados com Ag Ki-67 .....	57
Figura 10 -	Índice de miocardiócitos marcados com Ag Ki-67, segundo grupo de estudo e segmento cardíaco .....	59
Figura 11 -	Núcleos de células do interstício e vasos do VD marcados com Ag Ki-67 .....	60
Figura 12 -	Índice de células do interstício e vasos marcados com Ag Ki-67, segundo grupo de estudo e segmento cardíaco .....	63
Figura 13 -	Ciclo proliferativo celular .....	76

## Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Gradientes de pressão desenvolvidos pelo VD nos grupos estimulados .....	44
Tabela 2 -	Massa estimada do VD, segundo grupo de estudo e dias de observação .....	47
Tabela 3 -	Porcentagem de área de colágeno, segundo grupo de estudo e segmento cardíaco .....	49
Tabela 4 -	Diâmetro dos miocardiócitos, segundo grupo de estudo e segmento do septo interventricular .....	50
Tabela 5 -	Diâmetro dos miocardiócitos, segundo grupo de estudo e segmento cardíaco .....	51
Tabela 6 -	Diâmetro dos núcleos de miocardiócitos, segundo grupo de estudo e segmento do septo interventricular .....	53
Tabela 7 -	Diâmetro dos núcleos de miocardiócitos, segundo grupo de estudo e segmento cardíaco .....	54
Tabela 8 -	Índice de miocardiócitos marcados com o Ag Ki-67, segundo grupo de estudo e segmento do septo interventricular .....	57
Tabela 9 -	Índice de miocardiócitos marcados com o Ag Ki-67, segundo grupo de estudo e segmento cardíaco .....	58
Tabela 10 -	Índice de células do interstício e vasos marcados com Ag Ki-67, segundo grupo de estudo e segmento do septo interventricular .....	61
Tabela 11 -	Índice de células do interstício e vasos marcados com Ag Ki-67, segundo grupo de estudo e segmento cardíaco .....	62
Tabela 12 -	Proporção entre índices de miocardiócitos e células do interstício e vasos marcadas com o Ag Ki-67 .....	64

**Resumo**

---

Abduch MCD. *Avaliação dos mecanismos adaptativos do miocárdio durante sobrecarga de pressão induzida com o uso de bandagem do tronco pulmonar: participação da proliferação celular* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006. 119p.

**INTRODUÇÃO:** Para os pacientes portadores de transposição das grandes artérias que perderam a chance da cirurgia de Jatene nas primeiras semanas de vida, indica-se realizar o preparo ventricular através da bandagem do tronco pulmonar (BTP), objetivando causar aumento na massa miocárdica. Entretanto, com o tempo, a câmara hipertrofiada pode apresentar disfunção contrátil; portanto, é importante conhecer a qualidade do tecido preparado, uma vez que já se sabe que tanto os miocardiócitos (MCD) quanto as células do interstício e vasos (I/V) são capazes de proliferar após o período neonatal. Baseando-se no condicionamento físico de atletas e considerando-se que os músculos cardíaco e esquelético são ambos estriados, postula-se a hipótese de que o tipo de preparo ventricular possa influenciar nas características do miocárdio treinado. **OBJETIVOS:** Identificar o tipo de mecanismo adaptativo (hipertrofia/hiperplasia) envolvido no preparo rápido do ventrículo pulmonar submetido à sobrecarga de pressão por meio de BTP, através da análise dos MCD e células do I/V, verificando se existem diferenças em relação ao tipo de treinamento (contínuo x intermitente) em comparação com os controles. **MÉTODOS:** Foram estudados experimentalmente 21 cabritos após o período neonatal, divididos em três grupos (C= grupo controle, n= 7, sem procedimento cirúrgico; EC= grupo de estimulação contínua, n= 7, com bandagem progressiva e permanente do tronco pulmonar durante 96 horas; EI= grupo de estimulação intermitente, n= 7, com bandagem progressiva, 12 horas ao dia, totalizando 48 horas). Todos foram submetidos a estudo ecocardiográfico basal e aqueles dos grupos EC e EI a ecocardiogramas diários para verificar a aquisição de massa muscular do ventrículo direito (VD). Após o estudo, os animais foram sacrificados, os corações retirados e cortes histológicos do VD, ventrículo esquerdo (VE) e septo interventricular (S) fixados em formalina e processados para análise. Foram estudados a porcentagem de área de colágeno através do Picro-sirius, o diâmetro dos MCD e seus respectivos núcleos e o número de MCD e células do I/V marcadas com Ki-67. As células marcadas foram avaliadas por campo microscópico e por índice (número de células Ki-67+/2000 células). O nível de significância considerado foi de 0,05. **RESULTADOS:** Ambos os grupos estimulados apresentaram ganho significativo de massa muscular do VD ( $p < 0,05$ ). Não houve aumento na porcentagem de colágeno do VD nos grupos treinados ( $p = 0,403$ ). Considerando-se o VD, os grupos EC e EI apresentaram diâmetro dos MCD maior que o grupo controle ( $p < 0,001$ ), ocorrendo o mesmo com os respectivos núcleos (EI x C:  $p < 0,001$  e EC x C:  $p = 0,005$ ). O número de MCD marcados com Ki-67 foi maior no VD dos grupos estimulados comparado com o VE ( $p = 0,009$ , índice de proliferação;  $p = 0,001$ , contagem por campo), bem como para as células do I/V ( $p < 0,001$ , contagem por campo e índice). **CONCLUSÕES:** Tanto hipertrofia quanto hiperplasia celular estão envolvidas na adaptação do ventrículo pulmonar submetido à sobrecarga sistólica através da BTP. Ambos os tipos de condicionamento (contínuo e intermitente) provocaram hipertrofia e hiperplasia dos MCD, induziram também à mitose das células do I/V, sem deposição de colágeno intersticial ao final do experimento.

**Descritores:** 1.Transposição dos grandes vasos, 2.Cardiopatias congênitas, 3.Cirurgia torácica, 4.Proliferação de células, 5.Antígeno Ki-67, 6.Hipertrofia ventricular direita.

## ***Summary***

---

Abduch MCD. *Assessment of myocardial adaptive mechanisms during pressure overload induced by pulmonary artery banding: contribution of cell proliferation* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2006. 119p.

**INTRODUCTION:** Rapid ventricular conditioning induced by pulmonary artery banding (PAB) has been indicated to those patients with transposition of the great arteries (TGA) who have lost the chance for arterial switch operation – Jatene's procedure – aiming at induce myocardial mass increase. However, with time, hypertrophied chamber may exhibit contractile dysfunction, so that, it is important to assess quality of the prepared tissue, once it is of knowledge that both cardiomyocytes (CMC) and interstitial/vessel (I/V) cells are capable of proliferating after neonatal period. Based on fitness of athletes and considering that cardiac and skeletal muscles are both striated, there is the hypothesis that the type of ventricular prepare may influence the characteristics of the training myocardium. **OBJECTIVES:** Through CMC and I/V cells analysis, identifies the type of adaptive mechanism (hypertrophy/ hyperplasia) involved in rapid prepare of subpulmonary ventricle submitted to pressure overload by PAB, and verifies if there are differences in relation to the kind of training (continuous x intermittent), comparing them to the controls. **METHODS:** Twenty-one goats, beyond neonatal period, were experimentally studied. They were divided in three groups: C (control group, n= 7, with no surgical procedure); CS (continuous stimulation group, n= 7, with progressive and permanent PAB, during 96 hours); IS (intermittent stimulation group, n= 7, with progressive PAB, 12 hours/day, totalizing 48 hours). All the animals were submitted to basal echocardiograms and those from CS and IS groups to diary echocardiograms to verify right ventricular (RV) muscular mass acquisition. After the study, goats were killed, hearts excised and histological sections from RV, left ventricle (LV) and ventricular septum (VS) were formalin fixed and histologically processed. Collagen area fraction (through Picro-sirius red staining), CMC and respective nuclei diameter, and number of CMC and I/V cells Ki-67 positive were studied. Marked cells were analysed per high-power fields and by index (Ki-67 positive cells/2000 cells). The statistical significant level was set at 5%. **RESULTS:** Both stimulated groups presented significant RV muscular mass increase ( $p < 0.05$ ). There were no augmentation in RV collagen area fraction in training groups ( $p = 0.403$ ). Considering the RV, CS and IS groups showed an increase in CMC diameter compared to the control group ( $p < 0.01$ ), occurring the same to respective nuclei (EI x C:  $p < 0.001$  e EC x C:  $p = 0.005$ ). Number of CMC marked with Ki-67 was greater in RV from stimulated groups in relation to LV ( $p = 0.009$ , proliferation index;  $p = 0.001$ , number/high-power fields); the same occurred to I/V cells (proliferation index and number/high-power fields:  $p < 0.001$ ). **CONCLUSIONS:** Both cell hypertrophy and hyperplasia are involved in adaptation of the pulmonary ventricle submitted to pressure overload through PAB. Both types of conditioning (continuous and intermittent) caused CMC hypertrophy and hyperplasia, besides induced I/V cells mitosis, without interstitial collagen deposition at the end of experiment.

**Descriptors:** 1. Transposition of great vessels, 2. Congenital heart defects, 3. Thoracic surgery, 4. Cell proliferation, 5. Ki-67 antigen, 6. Right ventricular hypertrophy.

# 1. Introdução

---

A transposição das grandes artérias (TGA) é uma malformação cardíaca congênita em que há conexão atrioventricular concordante e conexão ventrículo-arterial discordante, de modo que a aorta emerge do ventrículo morfológicamente direito (VD) e o tronco pulmonar conecta-se ao ventrículo morfológicamente esquerdo (VE)<sup>1-3</sup>.

Durante a vida intra-uterina, essa situação não oferece risco ao paciente, devido às características da circulação fetal. Entretanto, após o nascimento, as alterações circulatórias que ocorrem no neonato fazem com que a criança portadora dessa doença sofra uma série de complicações<sup>4-8</sup>.

## **1.1 Fisiologia da circulação fetal**

A maior parte do conhecimento sobre fisiologia da circulação fetal normal foi obtida por meio de estudos realizados em ovelhas<sup>9-11</sup>, mamíferos classificados como pequenos ruminantes. As observações feitas em fetos humanos indicam que o padrão de fluxo sanguíneo é semelhante em ambas as espécies<sup>9</sup>.

Após o nascimento, as trocas gasosas são realizadas pelos pulmões. O sangue venoso que chega ao átrio direito passa através da valva tricúspide para o ventrículo direito e daí para o tronco pulmonar, atingindo os pulmões onde, então, é saturado com oxigênio. As veias pulmonares levam o sangue saturado ao átrio esquerdo, que passa pelo ventrículo esquerdo e

daí para a aorta, de onde atinge todos os órgãos do corpo. Dessa forma, a circulação se dá em série, sendo que o débito cardíaco direito é representado pelo fluxo pulmonar e o débito cardíaco esquerdo, pelo fluxo aórtico. Ambos os débitos são semelhantes <sup>11-12</sup>.

Durante a vida intra-uterina, o feto recebe os nutrientes e sangue oxigenado da placenta materna. Saindo da placenta, as veias umbilicais direita e esquerda confluem para a veia umbilical comum que chega ao fígado do feto pela veia porta hepática. Cerca de 55% desse sangue é direcionado ao duto venoso e os 45% restantes vão para os lobos direito e esquerdo do fígado. O duto venoso funciona como uma ponte entre a veia umbilical e o feto, levando sangue oxigenado para a veia cava inferior e daí para o átrio direito <sup>12</sup>. Na seqüência, a maior parte desse sangue é direcionada para o átrio esquerdo através do forame oval, passando, em seguida, para o ventrículo esquerdo e para a aorta ascendente, indo irrigar a cabeça e os membros superiores. Apenas uma pequena parte do sangue que chega à veia cava inferior passa para o ventrículo direito através da valva tricúspide <sup>1,10,12</sup>.

A veia cava superior é responsável por aproximadamente 20% do retorno venoso do coração fetal e praticamente todo o sangue contido em seu interior passa do átrio direito para o ventrículo direito pela valva tricúspide <sup>12</sup>. Quando chega ao tronco pulmonar, esse sangue é distribuído para os pulmões e para a aorta descendente através do canal arterial. Da aorta descendente, segue para o abdome e membros inferiores do feto, voltando então à placenta para ser oxigenado <sup>1,12</sup>.

O fígado do feto representa um importante regulador do retorno venoso para o coração, uma vez que tem grande parte de seu volume constituído por sangue e é um órgão altamente complacente. Cerca de 25% do retorno venoso do coração fetal são provenientes do fígado. A veia cava inferior recebe, em sua porção mais distal, sangue proveniente da veia hepática direita; esse fluxo dirige-se quase que totalmente para o ventrículo direito através da valva tricúspide. O sangue contido na veia hepática esquerda se junta ao da veia cava inferior que passa pelo forame oval e dirige-se para o átrio esquerdo <sup>10,12</sup>.

Portanto, a veia cava inferior contém uma mistura de sangue (oxigenado da placenta e venoso do sistema cava), enquanto que a veia cava superior contém apenas sangue venoso. Desse modo, a saturação de oxigênio no átrio e ventrículo esquerdos é maior que aquela no átrio e ventrículo direitos. Isso é comprovado por estudos experimentais em fetos de ovelha, os quais apresentam maior concentração de oxigênio na carótida do que na artéria femoral, uma vez que o sangue do ventrículo esquerdo dirige-se para a aorta ascendente e o sangue do ventrículo direito vai para a aorta descendente <sup>12</sup>.

No feto, a existência dos *shunts* (representados pelo duto venoso, forame oval e canal arterial) faz com que haja mistura de sangue oxigenado e venoso e com que certas partes do corpo sejam supridas por ambos os ventrículos, caracterizando o débito cardíaco combinado e a chamada circulação em paralelo. O ventrículo direito ejeta cerca de 60 a 65% de seu volume; desses, cerca de 7% vão para os pulmões (apenas para

suprimento, pois os mesmos não exercem ainda as trocas gasosas) e os 55% restantes passam pelo canal arterial e, daí, para a aorta descendente. O ventrículo esquerdo ejeta cerca de 34 a 40% de sangue do débito total: 3% para o miocárdio, 20% para a cabeça, pescoço, parte superior do corpo e membros anteriores e de 10 a 15% para a aorta descendente <sup>12</sup>.

Devido à presença do forame oval, as pressões nos átrios direito e esquerdo são semelhantes, como também o são as pressões de enchimento dos ventrículos. O fato de as pressões serem equalizadas na vida intra-uterina faz com que ambos os ventrículos tenham espessuras de paredes iguais e as pressões na aorta e no tronco pulmonar sejam equivalentes <sup>12-14</sup>.

Os pulmões do feto funcionam como um circuito de alta resistência, pois recebem sangue apenas para seu desenvolvimento, dado que as trocas gasosas são realizadas pela placenta <sup>1,13,15</sup>. Essa última representa, então, um circuito de baixa resistência, pois recebe cerca de 50% do débito cardíaco dos dois ventrículos <sup>10</sup>. Após o nascimento, o cordão umbilical é cortado, o fluxo para a placenta é interrompido e os pulmões passam a atuar como o órgão responsável pela oxigenação dos tecidos. A queda da resistência vascular pulmonar após o nascimento, determinada pela entrada de oxigênio nos pulmões, ocasiona aumento considerável do volume de sangue que passa pela circulação pulmonar, queda na pressão do tronco pulmonar e aumento do retorno venoso para o átrio esquerdo. Conseqüentemente, as pressões no ventrículo esquerdo e na aorta se elevam <sup>10</sup>. Tais diferenças de pressão levam ao fechamento do forame oval. Paralelamente, dá-se o fechamento do canal arterial em decorrência do

aumento da saturação de oxigênio sanguíneo após o nascimento e da ausência de prostaglandinas vasoativas produzidas pela placenta. Dessa forma, estabelecem-se duas circulações que passam a funcionar em série: a circulação pulmonar e a circulação sistêmica, com débitos cardíacos semelhantes <sup>1,9,11,13,16-20</sup>.

A espessura das paredes ventriculares também é afetada pela diferença de sobrecarga de pressão entre os dois ventrículos. Ao trabalhar com as pressões sistêmicas da aorta (portanto mais altas), a massa ventricular esquerda aumenta em relação à do ventrículo direito, submetido às pressões pulmonares (mais baixas). Após o nascimento, o ventrículo direito sofre hipotrofia e perde cerca de 20% de sua massa muscular <sup>4,21</sup>.

O processo de transição varia entre as diferentes espécies de mamíferos, mas, de modo geral, completa-se por volta de quatro a cinco semanas <sup>9</sup>.

Enquanto no feto a presença dos *shunts* intra e extracardíacos – representados pelo forame oval, pelo canal arterial e pelo ducto venoso – é essencial para que as trocas gasosas sejam viabilizadas, após o nascimento os mesmos não são mais necessários porque os pulmões realizam essas trocas. Entretanto, algumas doenças cardíacas congênitas fazem com que a patência desses *shunts* seja determinante para a manutenção da vida após o nascimento <sup>13,22,23</sup>.

## 1.2 Circulação pós-natal na TGA

Na TGA, os ventrículos não estão conectados em série e, portanto, é imperioso que haja mistura de sangue, o que se faz por meio dos *shunts* existentes desde a vida intra-uterina (canal arterial e/ ou forame oval) ou de defeitos nos septos atrial e/ ou ventricular<sup>13,22,23</sup>. Assim, o débito cardíaco de cada ventrículo pode ser determinado individualmente por suas pressões de enchimento, complacência e resistência dos respectivos leitos vasculares. Como o ventrículo esquerdo encontra-se conectado ao tronco pulmonar, há queda progressiva na massa muscular e aumento da complacência em relação ao ventrículo sistêmico (VD)<sup>24</sup>. Baño-Rodrigo *et al.*<sup>25</sup>, estudando 104 espécimes com TGA e comparando-os com 63 corações infantis normais, concluíram que, ao nascimento, a espessura das paredes do VE é semelhante em ambos os casos. Os corações com TGA e septo interventricular íntegro apresentaram diminuição da espessura a partir dos oito meses de vida; naqueles com defeito de septo interventricular significativo (ou seja, com sobrecarga de pressão e de volume), a espessura foi menor a partir dos 13 meses de idade. Os corações com TGA e septo interventricular íntegro estudados por Huhta *et al.*<sup>26</sup> possuíam espessura das paredes do VE bastante reduzida já com dois a quatro meses de vida. Na verdade, não se sabe ao certo em que momento o VE deixa de ser apto para suportar as pressões sistêmicas<sup>26</sup>, visto que a espessura de suas paredes, entre outros fatores, é um dos determinantes dessa capacidade<sup>27</sup>. Um ventrículo com espessura maior terá também maior massa muscular, o

que o torna habilitado a trabalhar sob regime de pressões maiores, executando mais trabalho com menor consumo de energia.

### **1.3 Correção cirúrgica da TGA**

A primeira preocupação frente a uma criança com transposição das grandes artérias é possibilitar que o sangue venoso pulmonar (oxigenado) alcance a circulação sistêmica e que o sangue venoso sistêmico (com baixa saturação de oxigênio) atinja a circulação pulmonar <sup>28</sup>. Assim, as primeiras abordagens cirúrgicas corretivas realizadas nesses pacientes foram as cirurgias de Senning e de Mustard, conhecidas como forma de correção no plano atrial, em que o sangue proveniente das veias pulmonares é redirecionado para o átrio e ventrículo direitos, atingindo a aorta, e o sangue proveniente das veias cavas é desviado para o átrio e ventrículo esquerdos, alcançando o tronco pulmonar; desse modo, o VD passa a atuar como ventrículo sistêmico <sup>28,29</sup>. Entretanto, o ventrículo direito não é adaptado para trabalhar com pressões elevadas e, com o tempo, passa a sofrer disfunção contrátil, conforme mostram vários relatos de casos de pacientes submetidos a essas cirurgias e de pacientes com transposição corrigida das grandes artérias (em que o ventrículo direito apresenta contração normal na infância, mas, com a idade, os índices de função sistólica vão diminuindo progressivamente) <sup>30-34</sup>. Em termos gerais, cerca de 10% ou mais dos pacientes submetidos à correção no plano atrial apresentam disfunção do VD dentro de dez anos <sup>30</sup>. Graham <sup>31</sup> observou incidência de 50 a 75% de disfunção ventricular direita em seguimento de um mês a dez anos após

reparo através das cirurgias de Mustard e Senning para correção da TGA; Graham *et al.* <sup>32</sup> encontraram fração de ejeção do VD abaixo da normalidade em 67% dos pacientes com TGA no período de seis a 29 meses após a cirurgia de Mustard; no estudo de Okuda *et al.* <sup>33</sup>, todas as 15 crianças com TGA e cirurgia de Senning apresentavam fração de ejeção do VD reduzida em relação ao normal. No Instituto do Coração do Hospital das Clínicas - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em seguimento tardio (média= 15,3 anos) de 44 pacientes submetidos à cirurgia de Senning, observou-se que 93% apresentavam insuficiência cardíaca congestiva (ICC) classe funcional I e 7% ICC classe funcional II (New York Heart Association) <sup>35</sup>.

Sabe-se que existem diferenças entre os ventrículos direito e esquerdo quanto à capacidade de suportar determinadas pressões <sup>6,7</sup>. O VE apresenta o formato cilíndrico, a via de entrada e saída lado a lado e um padrão de contração concêntrico, o que favorece o trabalho de bomba de pressão, enquanto o VD, com uma grande superfície e uma via de entrada mais afastada da via de saída, parece ser mais apropriado para regime de menor pressão. Além disso, o VE apresenta duas artérias coronárias (interventricular anterior e circunflexa), ao passo que o VD apresenta apenas uma artéria (coronária direita). Portanto, existem motivos anatômicos e fisiológicos que favorecem a disfunção tardia do VD, quando submetido cronicamente a pressões maiores. Além disso, outras complicações podem advir em decorrência desse tipo de procedimento, como arritmias atriais e

anormalidades na condução, obstrução no sistema venoso sistêmico e pulmonar e alterações nos retalhos intra-atriais<sup>29,36,37</sup>.

A queda na contratilidade do VD nos portadores de TGA é outro motivo de preocupação no suporte a esses pacientes. Em 1975, Jatene *et al.* realizaram com sucesso, no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, em São Paulo, a correção no plano arterial em uma criança com quarenta dias de vida e diagnóstico de TGA com defeito de septo interventricular amplo<sup>38</sup>. Por promover a correção anatômica, essa cirurgia devolve ao VE sua condição fisiológica de ventrículo sistêmico, sendo o procedimento de escolha no tratamento da referida cardiopatia em crianças com até dez semanas de vida<sup>39-46</sup>.

Colan *et al.*<sup>47</sup> estudaram 53 crianças com TGA e septo interventricular intacto ou com defeito de septo interventricular insignificante. Os pacientes foram divididos em dois grupos: TGA 1 (21 crianças estudadas entre cinco a dez dias após a cirurgia) e TGA 2 (32 pacientes mais velhos, estudados no pós-operatório tardio, entre cinco e cinquenta meses); no momento da cirurgia os pacientes possuíam idade média de quatro dias. Quatro anos após a cirurgia de Jatene, não foram encontradas evidências de disfunção sistólica ou diastólica com relação aos controles; provavelmente, isso se deva ao fato de a correção ter sido feita precocemente.

A correção anatômica deve ser realizada quando a criança é encaminhada logo após o nascimento ou, após o período neonatal, naqueles casos de TGA associada a defeitos que mantenham alta a pressão no ventrículo pulmonar (defeito de septo interventricular amplo, canal arterial

patente ou estenose subpulmonar) <sup>40,48</sup>. Entretanto, quando o paciente é encaminhado após o período neonatal ou quando existem complicações que impeçam a realização da cirurgia de Jatene precocemente (enterocolite necrotizante, insuficiência renal, insuficiência hepática, baixo peso, anatomia desfavorável das artérias coronárias, outros problemas cardíacos maiores associados, bebês prematuros ou distantes dos centros de referência), a queda na resistência vascular pulmonar faz com que diminua a massa muscular do VE, colocando em risco o sucesso da cirurgia <sup>44,49-52</sup>.

Em 1977, Yacoub *et al.* <sup>53</sup> introduziram o conceito de preparo do ventrículo pulmonar, tornando-o capaz de trabalhar com pressões maiores para, posteriormente, realizar a correção anatômica. A primeira criança em que foi aplicado esse conceito possuía TGA e septo interventricular íntegro, sendo operada pela primeira vez com quatro semanas de idade; o grupo realizou a bandagem do tronco pulmonar com a finalidade de aumentar o pico sistólico sobre o ventrículo e, conseqüentemente, sua massa muscular. A bandagem permaneceu até os seis meses de idade, quando foi feita a correção total.

A bandagem do tronco pulmonar como procedimento isolado foi realizada pela primeira vez por Muller e Dammann, em 1952 <sup>54</sup>, para prevenir a sobrecarga do circuito pulmonar e evitar doença vascular obstrutiva pulmonar. Nos portadores de transposição das grandes artérias, a utilização inicial da bandagem tinha a finalidade de preservar o ventrículo de hipertensão pulmonar, nos casos com alta pressão no VE (defeitos de septo interventricular grandes associados ou após atrioseptostomia). O uso dessa

técnica para capacitar o VE a sustentar a circulação sistêmica abriu novas perspectivas para a correção total da TGA <sup>55</sup>.

Os primeiros estudos com a cirurgia de Jatene em duas etapas preconizavam o uso de bandagem fixa do tronco pulmonar, por períodos de tempo que variavam de um a 36 meses até ser realizada a segunda fase, ou seja, a correção total. Porém, isso se mostrou problemático em alguns aspectos: a bandagem fixa não permitia eventuais ajustes necessários sem que fosse realizada nova toracotomia no paciente, o aumento súbito na pós-carga do VE causava comprometimento de sua função contrátil, o período prolongado de bandagem podia acarretar estenose no local, dilatação e insuficiência da neo-aorta <sup>27,50,56,57</sup>.

Estudos experimentais em ratos com bandagem do arco aórtico <sup>58</sup> e estudos clínicos em pacientes com estenose aórtica <sup>59</sup> mostram que a sobrecarga de pressão imposta ao ventrículo esquerdo leva à diminuição de sua contratilidade. Ilbawi *et al.* <sup>27</sup> encontraram disfunção miocárdica aguda em pacientes com TGA e septo interventricular íntegro submetidos à bandagem do tronco pulmonar, devido à sobrecarga aguda de pressão a que foi submetido o VE. Hon *et al.* <sup>60</sup>, estudando experimentalmente ovelhas antes e trinta minutos após constrição do tronco pulmonar, observaram que a sobrecarga aguda na pós-carga do ventrículo direito produziu aumento no volume diastólico final e no volume sistólico dessa câmara, com aumento da contratilidade; entretanto, tais resultados não podem ser extrapolados para sobrecarga crônica.

## 1.4 Considerações sobre o preparo ventricular

Considerando-se que o preparo do VE é desejável, mas oferece desvantagens no modelo utilizado inicialmente, propôs-se o uso de bandagem ajustável do tronco pulmonar, com elevação lenta e progressiva da pós-carga a fim de que o ventrículo pudesse se adaptar melhor, com menores alterações na função sistólica. Com esse objetivo, dispositivos de bandagem com ajuste externo passaram a ser desenvolvidos e utilizados com sucesso<sup>61-66</sup>.

Solis *et al.*<sup>63</sup> analisaram, por meio do ecocardiograma, seis porcos jovens com bandagem ajustável do tronco pulmonar durante trinta dias; todos os animais sobreviveram ao experimento e todos desenvolveram hipertrofia do ventrículo direito.

Lange *et al.*<sup>64</sup>, trabalhando com leitões que tiveram bandagem progressiva do tronco pulmonar, observaram que, após um período de quatro a seis semanas, os animais desenvolveram hipertrofia do ventrículo direito, com aumento significativo de sua massa muscular.

Muraoka *et al.*<sup>65</sup> analisaram oito crianças com cardiopatias congênitas complexas e que foram submetidas à bandagem do tronco pulmonar com torniquete ajustável externamente. Todas sobreviveram ao procedimento, não houve deterioração hemodinâmica, a pressão no tronco pulmonar diminuiu e a pressão arterial sistêmica elevou-se, mostrando que a possibilidade de regular a pós-carga torna o procedimento mais vantajoso e

seguro, pois diminui a morbidade e a mortalidade relacionadas com a bandagem fixa e, às vezes, inadequada.

Outra questão de grande interesse relacionada com a primeira etapa da cirurgia de Jatene incide sobre o tempo necessário para que o ventrículo esteja preparado. Conforme mencionado anteriormente, preparos mais longos implicam em maiores complicações. Estudos experimentais mostram que o miocárdio submetido à sobrecarga de pressão é capaz de sofrer hipertrofia num curto período de tempo, iniciando-se horas após a aplicação do estímulo e completando-se em alguns dias <sup>67-70</sup>.

Bing *et al.* <sup>58</sup> encontraram hipertrofia do ventrículo esquerdo de ratos com bandagem do arco aórtico três dias após o procedimento; com sete dias, a massa muscular atingiu os valores máximos e permaneceu constante nos 21 dias subseqüentes de estudo. Jonas *et al.* <sup>51</sup> mostraram que o preparo rápido, em sete dias, do VE em pacientes com TGA e septo interventricular intacto provoca aumento de 85% da massa muscular do ventrículo; a fração de ejeção diminui nos primeiros três dias, havendo recuperação ao longo do estudo. O preparo rápido do ventrículo pulmonar em crianças com TGA e septo interventricular íntegro também foi pesquisado por Boutin *et al.* <sup>71</sup> que concluíram que existe aumento significativo da massa muscular, atingindo o pico em sete dias. Portanto, é possível a indução de hipertrofia ventricular num período mais curto, reduzindo os riscos de complicações decorrentes da primeira etapa de correção anatômica <sup>72,73</sup>.

Em nosso meio, Assad *et al.*<sup>74</sup> principiaram uma série de estudos experimentais em cabritos utilizando os conceitos de preparo rápido do ventrículo pulmonar e estenose ajustável do tronco pulmonar com a finalidade de causar hipertrofia ventricular<sup>75</sup>. Os trabalhos iniciais basearam-se na idéia de que a primeira fase da cirurgia de Jatene poderia ser realizada de maneira não-cirúrgica, por meio da colocação de um cateter-balão que chegasse ao tronco pulmonar através do ventrículo direito (VD) e provocasse aumento da pós-carga por meio de ajuste controlado<sup>61-66,76</sup>. Desse modo, foi idealizado um modelo de cateter com um balão em uma de suas extremidades, o qual poderia ser insuflado externamente, permitindo um ajuste fino da diminuição do lúmen do tronco pulmonar. Estudando seis cabritos após o período neonatal, com insuflação ininterrupta e progressiva do balão (de nove a vinte dias), observou-se que a espessura da parede livre do ventrículo treinado igualou-se (e, num dos animais, superou) à espessura da parede do ventrículo esquerdo (VE) e do septo interventricular. O estudo de microscopia óptica mostrou aumento relevante do diâmetro dos miocardiócitos do VD em relação aos controles, ao septo interventricular e ao VE; os núcleos dos miocardiócitos aumentaram significativamente em relação aos controles. Esses resultados mostraram não só a possibilidade de um treinamento mais rápido e eficiente, bem como sugeriram possível aumento do material nuclear dos miocardiócitos para realizar uma maior síntese de proteínas no ventrículo pulmonar<sup>74</sup>.

Seguindo a mesma linha de pesquisa para um preparo rápido e controlado do ventrículo pulmonar, Dias *et al.*<sup>77</sup> utilizaram um manguito

hidráulico à base de silicone para bandagem do tronco pulmonar com ajuste percutâneo; o tempo de treinamento foi reduzido para 96 horas. O estudo ecocardiográfico mostrou aumento de 66% na espessura da parede livre do VD em relação aos valores basais, superando, inclusive, a espessura do septo interventricular e da parede livre do VE. À microscopia óptica, observou-se aumento do perímetro e da área dos miocardiócitos do VD, indicando hipertrofia celular. Portanto, o dispositivo mostrou-se capaz de aumentar a massa do ventrículo pulmonar em menor intervalo de tempo.

Com a finalidade de comparar a eficácia dos dois métodos utilizados para causar aumento da sobrecarga ventricular, Canêo *et al.*<sup>78</sup> estudaram dois grupos de animais. Num dos grupos (grupo I) implantou-se o cateter-balão; no outro (grupo II), o manguito hidráulico de bandagem externa. Os animais do grupo II atingiram pressões maiores, porém ambos os engenhos foram competentes para causar hipertrofia do VD num curto intervalo de tempo (96 horas), concluindo-se que, apesar do dispositivo externo ter maior capacidade de provocar estenose, o primordial é o treinamento ventricular, que se revela mais importante que o tipo de mecanismo utilizado. A partir disso, começou-se a pensar em outros tipos de treinamento.

Além do preparo do ventrículo relacionar-se com a aquisição de massa muscular e com a idade do paciente, uma questão muito importante é a qualidade do tecido treinado. O miocárdio que sofre hipertrofia reacional pode apresentar disfunção contrátil com o passar do tempo, o que não é desejável no ventrículo preparado<sup>73,79-81</sup>. Baseando-se no princípio do treinamento de atletas, em que os músculos esqueléticos e também o

músculo cardíaco desenvolvem a capacidade de suportar maior carga de trabalho através da hipertrofia de suas fibras, coloca-se a hipótese de que talvez o ventrículo a ser preparado sofra melhor adaptação, se submetido a uma sobrecarga de pressão intermitente <sup>82-84</sup>.

A qualidade do preparo também está relacionada com o tipo de aquisição de massa muscular <sup>72,73,79,85</sup>. Inicialmente, pensava-se que, após o nascimento, o coração dos mamíferos não estava capacitado para sofrer hiperplasia (aumento da população de células através de mitose) e que o único mecanismo adaptativo disponível em resposta à sobrecarga de pressão seria a hipertrofia celular (aumento do diâmetro das células, sem alteração do número das mesmas) <sup>86,87</sup>. Porém, estudos experimentais e clínicos mostram que a fibra miocárdica e os componentes intersticiais podem apresentar hiperplasia tanto algumas semanas após o nascimento quanto em corações adultos comprometidos por doenças valvares, coronarianas ou por cardiomiopatia dilatada. Essa capacidade de proliferação celular também foi observada em corações transplantados que apresentaram rejeição <sup>88-99</sup>. Isso indica que, mesmo sendo células diferenciadas, os miocardiócitos são capazes de reentrar no ciclo proliferativo em diferentes idades do indivíduo. *Dowel et al.* <sup>85</sup> demonstraram, em ratos adultos com constrição da aorta abdominal, que a incorporação de timidina nos núcleos de miocardiócitos foi 8,11 vezes maior nesse grupo do que nos controles. *Anversa et al.* <sup>92</sup>, estudando ratos adultos, idosos e senis, encontraram uma porcentagem maior de miocardiócitos em mitose nos animais senis, seguidos pelos idosos e depois pelos adultos. Esse aumento

foi 6,3 vezes maior no VE e 2,3 vezes maior no VD, sugerindo que a sobrecarga mecânica à qual o ventrículo sistêmico está submetido estimula o crescimento miocárdico; além disso, a deterioração da função cardíaca com o passar do tempo também induziria à hiperplasia miocárdica. Quaini *et al.*<sup>95</sup> observaram porcentagens semelhantes ( $33,51 \pm 1,60\%$ ) de miocardiócitos marcados com antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) em corações normais de fetos e de pacientes adultos (idades variando de 26 a 80 anos) com ICC. Kajstura *et al.*<sup>99</sup> compararam os índices de mitose entre miocardiócitos de 27 pacientes com isquemia e cardiomiopatia dilatada (médias de idade respectivamente 52 e 55 anos) e nove controles, encontrando um índice dez vezes maior de mitose nos corações doentes.

Após o nascimento, o VE exposto à circulação sistêmica sofre aumento significativo de sua massa e também de seu volume. Desse modo, a relação entre a espessura e o raio ventricular permanece constante, havendo, portanto, uma hipertrofia excêntrica. A proliferação celular (hiperplasia) continua mais intensamente até algumas semanas após o nascimento. Associado a isso, ocorre igualmente aumento do diâmetro dos miócitos (hipertrofia). Esses dois fatores contribuem para o aumento da espessura das paredes do VE. Progressivamente, o crescimento em paralelo supera a proliferação dos miócitos e há aumento do número de mitocôndrias e miofibrilas<sup>4,100,101</sup>.

Nas fases iniciais de sobrecarga de pressão, a espessura das paredes cardíacas aumenta sem que haja dilatação das câmaras (hipertrofia

concêntrica), com o objetivo de normalizar o estresse sistólico sobre os ventrículos<sup>4,45,100</sup>. É de extrema importância saber se isso é devido apenas ao aumento do diâmetro das células cardíacas contráteis ou se também existe replicação das mesmas, pois a hipertrofia como mecanismo adaptativo é eficiente na fase compensada, podendo evoluir para disfunção do músculo e ICC com o tempo<sup>49,52,64,85,98,101,102</sup>.

Sabe-se que ratos jovens (dois meses de idade), com oclusão experimental do tronco pulmonar e conseqüente sobrecarga crônica de pressão sobre o VD apresentam hipertrofia (24%) e aumento do número de miócitos (44%) do referido ventrículo, tornando-o mais apto a diminuir o pico de estresse sistólico resultante da pressão elevada. O número de mitocôndrias apresenta-se elevado numa primeira fase, havendo restauração para os níveis normais após um período crônico, o que indica que a quantidade de mitocôndrias existentes é capaz de produzir energia (ATP) suficiente para evitar disfunção ventricular<sup>100</sup>.

Foram efetuados estudos de proliferação celular em miocárdio através de marcadores da síntese de DNA<sup>103</sup>. Os métodos mais comumente utilizados são:

*Observação de figuras de mitose.* É altamente específico, visto que sua presença identifica com certeza o núcleo em divisão. Entretanto, a fase M (de mitose) é proporcionalmente menor que as outras fases e, como os miocardiócitos têm baixo índice de proliferação, pode ser difícil identificá-la; além disso, as figuras de mitose podem estar relacionadas com a poliploidia.

*Incorporação de timidina.* Também é bastante específico, mas o método é trabalhoso e requer o uso de radioisótopos.

*Incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU).* Células que sintetizam DNA incorporam BrdU e a utilização de anticorpos monoclonais anti- BrdU identifica tais células. Esse método apresenta maior sensibilidade, rapidez e facilidade do que a incorporação de timidina, mas a perda da integridade tecidual durante as etapas de permeabilização pode dificultar a identificação das células. Outra desvantagem consiste na reduzida especificidade do método, o que aumenta as chances de falsos positivos.

*Quantificação direta do DNA nuclear.* Distingue ploidia de replicação do genoma e síntese de DNA para reparo; porém, é um estudo estático, dificultando a diferenciação entre síntese ativa de DNA e alterações cumulativas do conteúdo nuclear.

*Utilização do PCNA.* Esse antígeno participa da proliferação celular e foi utilizado em muitos estudos clínicos e experimentais para identificar hiperplasia dos miocardiócitos. Entretanto, tal antígeno não permite diferenciar o DNA sintetizado para reparo daquele empenhado na replicação celular. Além disso, sua expressão não se limita à fase de síntese de DNA, tendo sido observado em células não proliferativas presentes ao redor de tumores (os quais liberariam fatores parácrinos capazes de induzir a expressão do PCNA na ausência de síntese de DNA).

O anticorpo murino monoclonal da classe das IgG<sub>1</sub> denominado de Ki-67 reconhece um antígeno (Ag Ki-67) presente no núcleo celular e que se

expressa em todas as fases do ciclo da célula, com exceção de G<sub>0</sub> e início de G<sub>1</sub>. Portanto, esse antígeno atua como marcador de proliferação celular<sup>104- 108</sup>, tendo, inclusive, similaridade com DNA topoisomerase II, enzima considerada como marcadora específica de replicação da célula<sup>109</sup>.

Evidências qualitativas de que o Ki-67 atua como marcador de proliferação celular podem ser demonstradas pela sua distribuição em tecidos normais. Células do centro germinativo das amídalas, células basais do epitélio e espermatogônias indiferenciadas dos testículos são fortemente marcadas com esse antígeno. Por outro lado, células do fígado, rim e cérebro não aparecem marcadas com o Ki-67, enquanto que sua expressão é bastante acentuada em linfócitos do sangue periférico estimulados a proliferarem. Quantitativamente, também existe uma correlação muito alta entre o número de células que participam do ciclo proliferativo e a quantidade das mesmas que são marcadas com Ki-67<sup>104,109</sup>.

Estudos realizados em indivíduos normais e pacientes com cardiomiopatia dilatada ou submetidos a transplante cardíaco mostram que o Ki-67 se expressa nos corações com doença inflamatória ou imunológica, indicando que os miocardiócitos são capazes de renovar seu DNA em resposta a tais estímulos<sup>110-114</sup>.

Além das alterações nas fibras contráteis (hipertrofia e hiperplasia), outros mecanismos são descritos na resposta à sobrecarga de pressão, como, por exemplo, o incremento numérico de vasos e da área ocupada pela matriz intersticial. Em particular, admite-se que a fibrose que se deposita no miocárdio nessas condições acaba por levar à disfunção<sup>115</sup>. O

aumento da concentração de colágeno intersticial primeiramente eleva a rigidez diastólica e sistólica do miocárdio, causando disfunção apenas na diástole; a seguir, com a progressão do quadro, a fibrose passa a ser perimuscular, mantendo a rigidez diastólica alta, porém diminuindo a sistólica, o que inicia a falência na contratilidade miocárdica; nas fases finais, a deposição de tecido intersticial passa a ser de caráter reparador, com a finalidade de substituir o tecido muscular perdido, o que agrava ainda mais a disfunção ventricular <sup>115-118</sup>.

A observação do incremento na espessura da parede livre do ventrículo pulmonar frente ao aumento da pós-carga (o que reflete acréscimo na massa muscular), associada à possibilidade de determinar a existência e extensão de proliferação celular no músculo cardíaco após o nascimento, faz surgir a oportunidade de investigar quais mecanismos adaptativos estariam presentes quando se imprime uma sobrecarga de pressão a esse ventrículo.

## **2. Objetivos**

---

O presente trabalho tem por objetivos:

1. Identificar, histologicamente, o tipo de mecanismo adaptativo (hipertrofia e/ou hiperplasia celular) envolvido no preparo rápido do ventrículo pulmonar submetido à sobrecarga de pressão por meio de bandagem ajustável do tronco pulmonar, através da análise das células miocárdicas contráteis e do interstício/vasos;
  
2. Verificar as diferenças, em relação aos controles e aos diferentes segmentos do coração (VD, VE e septo interventricular), na resposta do ventrículo preparado mediante os dois tipos de treinamento – sobrecarga sistólica contínua e intermitente - quanto à:
  - a) massa ventricular direita avaliada pelo ecocardiograma,
  - b) fração de área de colágeno intersticial,
  - c) hipertrofia de miocardiócitos,
  - d) proliferação de miocardiócitos e de células do interstício/vasos.

## 3. Métodos

---

Foram estudados 21 cabritos hígidos de trinta a sessenta dias de idade (correspondente ao período pós-natal), com média de pesos igual a 8,35 kg (mínimo de 4,80 kg, máximo de 12,00 kg), tratados conforme as normas para cuidado e uso de animais de laboratório <sup>119</sup>.

Para atestar que os ventrículos cardíacos já haviam assumido o padrão de pressão esperado para o período pós-natal, realizaram-se exames ecocardiográficos basais antes de qualquer procedimento cirúrgico.

Os animais foram divididos, aleatoriamente, em três grupos: controle - C (n= 7, sem nenhum procedimento cirúrgico), estimulação contínua - EC (n= 7, metodologia explicada abaixo) e estimulação intermitente - EI (n= 7, metodologia explicada abaixo). O número de cabritos por grupo foi determinado segundo estudos anteriores desta linha de pesquisa <sup>74,77,78</sup>.

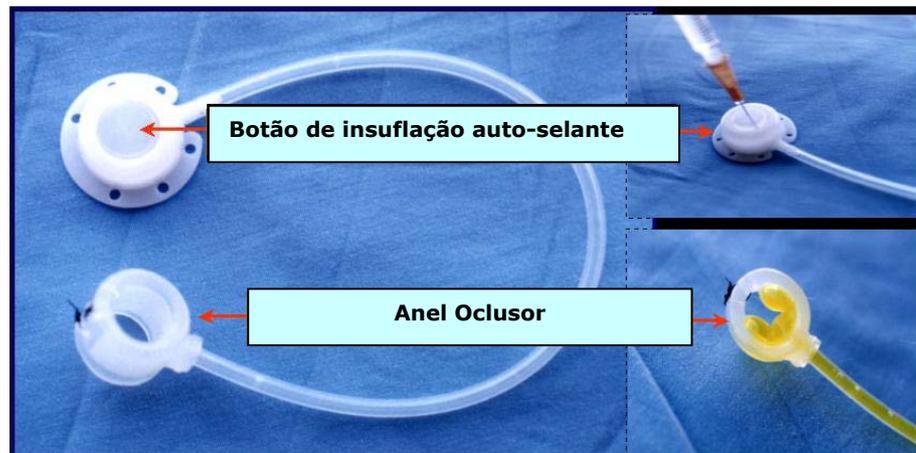
### **3.1 Anestesia**

Após jejum de 24 horas, os animais dos grupos de estimulação contínua e intermitente receberam medicação pré-anestésica (quetamina, 30 mg/kg, intramuscular). Realizou-se tricotomia cervical e no hemitórax esquerdo, seguida da punção na veia jugular externa com Jelco nº 18 para administração de drogas. A anestesia foi mantida com pentobarbital sódico (nembutal, 5-10 mg/kg, via intravenosa) e quetamina (1mg/kg endovenoso); a ventilação mecânica (Harvard 708 South Natick, MA, EUA) foi mantida por

meio de tubo endotraqueal com 100% de saturação de oxigênio e volume corrente de 10 a 15 ml/ kg. Por fim, os cabritos foram posicionados em decúbito lateral direito e preparados para o procedimento cirúrgico estéril.

### **3.2 Dispositivo de bandagem ajustável do tronco pulmonar**

O dispositivo utilizado neste estudo é formado por três componentes: anel oclisor de silicone auto-selante, tubo extensor e botão de insuflação. O anel oclisor (Braile Biomédica, São José do Rio Preto, SP) consiste em um manguito hidráulico em forma de “U”, com diâmetro interno de 10 mm e largura de 5 mm. Externamente, é revestido por silicone rígido com 1 mm de espessura para evitar deformações centrífugas. A superfície interna é formada por uma camada flexível de silicone, com capacidade de expandir-se e comprimir, assim, o lume do vaso de acordo com o volume injetado através do botão de insuflação. Nas duas extremidades distais do manguito, existem pequenos orifícios que têm por finalidade manter o anel bem preso ao tronco pulmonar. O tubo extensor, também feito de silicone, conecta o anel oclisor ao botão de insuflação; possui 2 mm de diâmetro interno e 25 cm de comprimento. O botão de insuflação (Braile Biomédica) é um reservatório circular feito de silicone auto-aderente, com base de metal; possui um conduto conectado ao tubo extensor. Esse botão é implantado no subcutâneo e permite a insuflação ou o esvaziamento do anel oclisor por via percutânea (Figura 1).



**Figura 1** - Dispositivo de bandagem constituído por um anel oclisor ajustável, tubo extensor e botão de insuflação.

### 3.3 Procedimento cirúrgico

Realizou-se toracotomia no quarto espaço intercostal esquerdo para a exposição da aorta descendente e da via de saída do VD. Na aorta, fez-se sutura em bolsa com polipropileno 5-0 para inserção do cateter de 16 gauge (Bard Co) a fim de monitorar a pressão sistêmica. Dois outros cateteres de 16 gauge foram implantados, um no VD e outro distalmente ao tronco pulmonar, fixados com polipropileno 5-0 por meio de sutura em bolsa. Os cateteres foram testados (permeabilidade e curvas de pressão), mantidos heparinizados e exteriorizados através da caixa torácica; as pressões foram medidas pelo sistema de software ACQ Knowledge 3.01 (Biopac Systems, Inc., Goleta, CA, EUA). Em seguida, o tronco pulmonar foi dissecado para a colocação do dispositivo de bandagem ajustável. O anel oclisor foi colocado ao redor do tronco pulmonar e suas extremidades foram suturadas com fio de polipropileno 5-0 na camada adventícia do vaso, logo acima da valva

pulmonar. O tubo extensor foi exteriorizado através do terceiro espaço intercostal e conectado ao botão de insuflação alocado na camada subcutânea da parede torácica. O botão de insuflação foi testado e todo o ar do sistema foi retirado. As costelas foram aproximadas logo após a colocação de um tubo de drenagem no espaço pleural esquerdo e as camadas de tecidos moles foram fechadas, colocando-se, por fim, um colete protetor. Os animais recuperaram-se da anestesia em maca especial (Instituto do Coração – InCor – HC-FMUSP) para quadrúpedes, sofreram extubação e tiveram o tubo de drenagem removido após um período de quatro a seis horas do procedimento cirúrgico. Em seguida, foram encaminhados para o biotério.

Como antibioticoterapia profilática, receberam 500 mg de cefalozina e 10 mg de gentamicina por via intramuscular a cada 12 horas, tendo início imediatamente antes da cirurgia e terminando ao final do protocolo. Também foram administradas digoxina (0,005 mg/Kg por via intravenosa a cada 12 horas) e heparina (2500 U a cada 12 horas, por via subcutânea).

### **3.4 Protocolo de insuflação do dispositivo de bandagem ajustável**

Os animais foram mantidos em descanso por um período de 48 horas para recuperação. Em seguida, foi introduzido o protocolo de insuflação do dispositivo de bandagem ajustável do tronco pulmonar.

Com o animal consciente e imobilizado na maca especial, foram feitas as leituras das pressões basais do VD, tronco pulmonar e aorta, com o dispositivo totalmente vazio.

Após a leitura, deu-se início à insuflação progressiva do dispositivo com água destilada a fim de que a pressão sistólica no VD alcançasse um valor aproximadamente igual a 70% da pressão sistólica sistêmica<sup>27,71-74,77,78</sup>, desde que não houvesse queda superior a 10% nessa última. Caso o cabrito apresentasse sinais clínicos de hipóxia importante (agitação, dispnéia ou arritmias), o volume do dispositivo era reduzido a um valor tolerável pelo animal. Os animais do grupo de estimulação contínua permaneceram em treinamento por um período de 96 horas, com insuflações progressivas a cada 24 horas, no limite máximo tolerado. No grupo de estimulação intermitente, procedeu-se da mesma forma, porém deixando o dispositivo inflado apenas por 12 horas ao dia: ao final desse tempo, o mesmo era esvaziado completamente e assim mantido por mais 12 horas, até a próxima insuflação, perfazendo um total de 48 horas de condicionamento.

O gradiente de pressão entre o VD e o tronco pulmonar foi calculado através da subtração de suas pressões sistólicas.

A insuflação do dispositivo e a mensuração das pressões na aorta, VD e tronco pulmonar foram realizadas diariamente, nos dois grupos. No grupo de estimulação intermitente, as pressões também foram medidas com o dispositivo desinflado. O volume de água aspirado do dispositivo era medido e comparado com o do dia anterior para avaliar possível perda. De

modo geral, foi possível acrescentar um maior volume ao dispositivo a cada dia de insuflação.

### **3.5 Estudo ecocardiográfico**

Para a realização dos ecocardiogramas, os cabritos foram tricotomizados no hemitórax direito, permanecendo acordados e em decúbito esternal durante os exames. Utilizaram-se transdutores de 7,5 MHz para a obtenção das imagens e de 2.5 MHz para a análise dos fluxos (Apogee CX, ATL - Advanced Technologies Laboratories, Bothell, WA). Todos os animais foram avaliados antes do procedimento cirúrgico com a finalidade de atestar a espessura mais fina da parede livre do VD em relação ao VE (perda do padrão circulatório fetal). No seguimento, os exames foram realizados diariamente, após a insuflação do dispositivo de bandagem externa, em ambos os grupos estimulados, durante os cinco dias de condicionamento. No grupo de preparo intermitente, o último ecocardiograma foi feito com o dispositivo vazio. Os cabritos do grupo controle foram estudados uma única vez, por meio de um exame ecocardiográfico basal, antes de serem sacrificados.

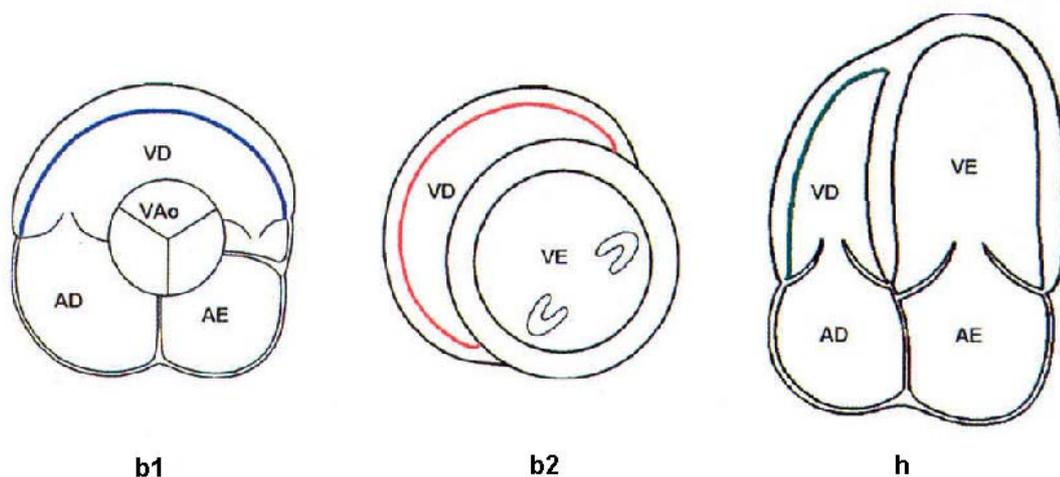
As espessuras do septo interventricular e da parede posterior do VE foram mensuradas no modo M, no final da diástole, por meio do corte paraesternal transversal na altura dos músculos papilares<sup>120</sup>; no mesmo corte foram obtidos os índices de função sistólica do VE (porcentagem de

encurtamento da fibra miocárdica e fração de ejeção) pelo método do cubo, conforme descrito <sup>121</sup>.

A massa do VD foi calculada com base nas observações de Pontes *et al.* <sup>122</sup> a partir da dissecção da parede livre dessa câmara, conforme proposto por Fulton *et al.* <sup>123</sup>. O ventrículo assim isolado assume formato trapezoidal, cuja área é mensurada na fórmula:

$$A = \left( \frac{b1 + b2}{2} \right) \times h \quad (\text{cm}^2) \quad \text{onde } A = \text{área do VD}$$

Transpondo a fórmula para o VD, b1, b2 e h corresponderiam aos perímetros internos da parede livre dessa câmara, obtidos no corte paraesternal transverso (na altura dos vasos da base e no nível dos músculos papilares) e no corte apical quatro câmaras, respectivamente (Figura 2).



**Figura 2** - Esquema das projeções ecocardiográficas para o cálculo da massa do ventrículo direito (conforme Pontes *et al.*). VD- ventrículo direito; VE- ventrículo esquerdo; AD- átrio direito; AE- átrio esquerdo; VAo- valva aórtica.

Adaptado de: Pontes SC Jr, Assef JE, Barretto RB, Chacur P, Moreira DA, Nina VJS, Nunes F, Melani RH, Correia EB, Dinkuisen J, Sousa AM. *Estimation of right ventricular mass by two-dimensional echocardiography. J Am Soc Echocardiogr.* 2005;18(5):427-34.

Devido à dificuldade para a obtenção desse último corte em cabritos (pelo fato de terem o tórax com formato muito convexo), o mesmo foi substituído pelo corte longitudinal quatro câmaras. Em cada uma das três abordagens ecocardiográficas descritas, também foi mensurada a espessura da parede livre dessa câmara, na região onde seus limites fossem mais facilmente visibilizados; a seguir, obteve-se a média aritmética desses valores. Uma vez calculada a área, a mesma foi multiplicada por 1,055 (que corresponde à densidade do miocárdio) e pela espessura média da parede, calculando-se, assim, a massa ventricular direita segundo a fórmula:

$$M = A \times 1,055 \times e \text{ (g)} \quad \text{onde } M = \text{massa do VD}$$

e = espessura média da parede livre do VD

### **3.6 Exame morfológico dos corações**

Após 96 horas de treinamento do ventrículo subpulmonar, os animais dos grupos contínuo e intermitente foram sacrificados de acordo com as normas para cuidado e uso de animais de laboratório <sup>119</sup>. O mesmo procedimento foi realizado com os sete cabritos do grupo controle.

Como medicação pré-anestésica, foi administrada quetamina (20 mg/kg, via intramuscular). Por meio de um cateter venoso percutâneo colocado na veia jugular, administrou-se nembutal (15 mg/kg); a seguir, os cabritos foram entubados e mantidos em ventilação mecânica. Através da mesma incisão utilizada para o procedimento cirúrgico inicial, fez-se a exposição do coração. Ao atingir-se o plano anestésico profundo, foram

administrados, pelo cateter, heparina (500 U/kg) e cloreto de potássio até que houvesse parada cardíaca.

### **3.6.1 ESTUDO HISTOLÓGICO E MORFOMÉTRICO**

Todos os animais sacrificados tiveram seus corações fixados em solução de formalina salina (formol a 10% em solução salina a 0,9%, tamponado com fosfato de sódio monobásico e bibásico, para pH 7,0). Os espécimes foram assim mantidos por um período de 24 horas. No seguimento, após corte transversal ao nível da massa ventricular, obtiveram-se secções de ambos os ventrículos e do septo interventricular (S). O lado direito do septo foi tingido com tinta Nanquim para identificação imediata à microscopia óptica.

As amostras foram processadas para análise histológica e, a partir dos blocos, obtiveram-se cortes de cinco micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) de espessura, utilizando-se micrótomo (Leica RM 2145). Os cortes foram pescados em lâminas de vidro previamente tratadas com organosilano e levados à temperatura de 37°C para secagem e colagem. Seguiram-se as colorações pelos métodos da hematoxilina-eosina (HE) e Picro-sirius vermelho, além das reações de imuno-histoquímica descritas abaixo.

#### **3.6.1.1 Diâmetro das fibras miocárdicas e dos núcleos**

As medidas morfométricas foram realizadas por meio de um sistema computadorizado interativo de análise de imagens (Leica QWin versão 2.2 –

Leica Imaging Systems Ltd, 1997, Cambridge) <sup>124</sup>. Uma câmara de vídeo (JVC modelo TK – 1280U) conectada a microscópio óptico (Leica DMLS) transmite ao sistema cada campo microscópico que é, então, transformado em uma imagem digital binária. Uma seqüência de operações matemáticas e morfológicas permite identificar e quantificar todas as estruturas de interesse.

Os cortes corados pela hematoxilina-eosina foram utilizados para mensurar o diâmetro transversal das fibras miocárdicas e dos núcleos (cortados longitudinal ou transversalmente). Para cada segmento do coração (VD, VE e septo interventricular), foram medidos os diâmetros de sessenta células e de seus respectivos núcleos, com aumento de 40X. As mensurações foram realizadas na altura dos núcleos, em seu maior eixo transversal; os campos foram analisados seqüencialmente; porém, as células deveriam ter os limites bem definidos para que fossem avaliadas. Para o septo interventricular, foram abordadas, separadamente, as metades direita e esquerda do mesmo. Estimou-se o número de miocardiócitos a serem medidos através do estudo da evolução da média de 20, 30, 40, 50, 60, 70,80 e 90 observações. Como, a partir de 60 células medidas, a variação da média mantinha-se menor ou igual a 10%, estipulou-se então esse número de observações.

### **3.6.1.2 Estudo da fração de área de colágeno**

Estudaram-se cortes histológicos dos ventrículos direito e esquerdo dos três grupos, corados pelo método de Picro-sirius vermelho. Esse método cora o colágeno em vermelho e as fibras musculares em amarelo-pálido. Utilizando o sistema computadorizado de análise de imagens <sup>124</sup>, quantificou-se a fração de área de colágeno através da cor, por meio da marcação prévia de uma região sabidamente preenchida por essa proteína, de forma que o programa reconhecesse automaticamente todas as estruturas coradas no mesmo tom (vermelho) como “colágeno”. Ajustes manuais fortuitos foram necessários a fim de adicionar ou remover áreas não marcadas ou reconhecidas incorretamente pelo sistema. Com lente objetiva de 20X, analisaram-se vinte campos e o resultado foi expresso como média da área ocupada por colágeno. Os campos foram escolhidos ao acaso, evitando-se, entretanto, regiões ocupadas por vasos maiores que 50 micrômetros de diâmetro e áreas de grande retração do corte histológico.

### **3.6.1.3 Estudo imuno-histoquímico**

Cortes histológicos de 5  $\mu\text{m}$  de espessura foram submetidos a reações de imuno-histoquímica de acordo com o protocolo de rotina usado na Seção de Imunopatologia do Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto do Coração (InCor) HC-FMUSP (sistema Streptavidina conjugada com peroxidase) <sup>125</sup>. Como controle positivo da reação, utilizou-se corte histológico de esôfago de um dos animais, obtendo-se células marcadas nas

porções basais do epitélio. Tal controle é feito com um segmento de órgão em que as células apresentam alta capacidade de proliferação (como epitélio, por exemplo), com a finalidade de comprovar se a prova imuno-histoquímica aplicada é eficiente para o indivíduo estudado.

Lâminas contendo cortes de tecido foram desparafinadas em três banhos de xilol, hidratadas e submetidas à técnica de recuperação de antígenos com a finalidade de expor os epitopos teciduais para as reações imuno-histoquímicas.

O marcador de proliferação celular utilizado foi o anticorpo primário Ki-67, produzido em camundongo, clone MIB-1, código IM0505, fabricante DAKO, Grostrup, Dinamarca. Conforme estabelecido em estudos anteriores, esse marcador tem sido utilizado em tecidos de caprinos <sup>126,127</sup>.

Para a recuperação antigênica, as lâminas foram imersas em citrato de sódio (10mM) pH 6.0 e aquecidas em panela de pressão durante 15 segundos.

Depois de feita a recuperação de antígenos, as lâminas foram lavadas em dois banhos de PBS (tampão salina fosfato 1M pH 7,4) e realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena pelo tratamento com peróxido de hidrogênio 130 volumes a 3% em PBS. As lâminas foram então colocadas numa câmara úmida e submetidas a soro fetal bovino por uma hora, em estufa a 37 °C. A seguir, foram secas e expostas ao anticorpo primário.

O anticorpo primário foi diluído em BSA (soro albumina bovina) 1% em PBS, na titulação de 1/400.

Após a aplicação do anticorpo primário as lâminas foram deixadas em câmara úmida a 4°C na geladeira, durante a noite. Após um período de 18 a 20 horas de incubação, foram então lavadas em três banhos de PBS pH 7,4 e incubadas em câmara úmida com anticorpo secundário diluído em PBS por uma hora, em estufa a 37°C. Foi utilizado anticorpo secundário anti-camundongo IgG biotilado, produzido em coelho, código E0354 (DAKO), na diluição de 1/200 em PBS, para marcação dos núcleos de miocardiócitos e células do interstício e vasos em proliferação.

Houve, em seguida, passagem em três banhos de PBS e incubação com estreptoavidina (Streptavidin/ HRP, código PO397, DAKO) conjugada com peroxidase na diluição 1/100 em PBS por uma hora, em estufa a 37°C.

As lâminas foram novamente lavadas em três banhos de PBS, seguindo-se a revelação da reação, quando se usaram 3,0 tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB, código K3466, DAKO) – (0,04%), durante cinco minutos em banho-maria, a 37°C.

Após a passagem por água corrente, os cortes foram contracorados com hematoxilina de Harris para evidenciar os núcleos. A seguir, foram desidratados em banhos sucessivos de água corrente, álcool a 70%, álcool a 95%, álcool a 100%, xilol e cobertos com lamínula usando-se resina sintética.

Os miocardiócitos e as células do interstício e dos vasos marcados com o anticorpo (coloração castanho-dourada) foram quantificados microscopicamente de duas maneiras. A primeira, através de contagem de

---

seu número/campo microscópico, utilizando-se objetiva de 40X. A área correspondente a um campo de grande aumento analisado é de 232.428,13  $\mu\text{m}^2$ . Para o septo interventricular, calculou-se separadamente o número de células positivas nas metades direita e esquerda do mesmo. Para cada corte histológico, calculou-se o número médio de células marcadas por campo microscópico - miocardiócitos e células do interstício/vasos. Foram analisados 60 campos para cada um dos segmentos cardíacos (VD, VE e as duas metades do septo interventricular), visto que a variação da média manteve-se menor ou igual a 10% a partir desse número de observações. Considerando-se a possibilidade de hipertrofia celular e, portanto, de haver menor número de células por campo microscópico, realizou-se também a quantificação de células marcadas segundo a taxa de proliferação. Para cada segmento do coração (VD, VE, SD- septo interventricular direito e SE- septo interventricular esquerdo), foram contadas 4000 células (2000 miocardiócitos e 2000 células do interstício/vasos); das células contadas, computou-se o número daquelas marcadas com o antígeno Ki-67, obtendo-se a porcentagem de hiperplasia. Para o septo como um todo, foram escolhidas aleatoriamente as primeiras 1000 células contadas em cada uma das metades direita e esquerda. O número de células a ser contado foi definido segundo dois critérios: quando a variação da média atingiu 10% e o fato de trabalhos anteriores mostraram que 2000 células são uma quantidade confiável para análise <sup>92,103,128-131</sup>.

Por fim, para os VDs dos três grupos, comparou-se a proporção entre miocardiócitos e células do interstício/vasos marcadas com Ki-67.

### 3.7 Análise estatística

Inicialmente, todas as variáveis foram analisadas de modo descritivo. Para as variáveis quantitativas, essa análise foi feita através da observação dos valores mínimo e máximo, e do cálculo da média, erro padrão e mediana.

Para a análise da hipótese de igualdade entre três grupos, utilizou-se a Análise de Variância a um fator <sup>132</sup>, com as comparações múltiplas através de Bonferroni.

Para averiguar o comportamento dos grupos, e considerando as condições estudadas, fez-se uso da técnica Análise de Variância com medidas repetidas <sup>133</sup>, a qual consiste no ajuste de um modelo linear multivariado a partir do qual foram testadas as seguintes hipóteses:

H<sub>01</sub>: os perfis médios de resposta correspondentes aos grupos são paralelos, ou seja, não existe interação entre o fator grupo (controle, EC e EI) e o fator condição de avaliação (VE, VD, S, SE e SD).

H<sub>02</sub>: os perfis médios de resposta são coincidentes, ou seja, não existe efeito do fator grupo.

H<sub>03</sub>: os perfis médios de resposta são paralelos ao eixo das abcissas, ou seja, não há efeito do fator condição de avaliação.

As hipóteses H<sub>02</sub> e H<sub>03</sub> só foram testadas quando não se rejeitou H<sub>01</sub>. Caso contrário, foram testadas hipóteses de igualdade entre subconjuntos dos grupos e entre as condições avaliadas.

A estatística de Wilks, com a aproximação para a estatística F, foi utilizada no teste das hipóteses acima.

O nível de significância utilizado para os testes foi de 5%.

## **4. Resultados**

---

Para cada grupo de animais, foram analisados os resultados referentes

a:

1. gradiente de pressão entre o ventrículo direito e o tronco pulmonar (VD-TP) obtido pelo estudo hemodinâmico;
2. massa do VD estimada pelo exame ecocardiográfico;
3. aspecto histológico geral;
4. fração de área de colágeno do VD e do VE;
5. diâmetro médio dos miocardiócitos e dos núcleos do VD, VE e septo interventricular;
6. índice e número por campo de miocardiócitos e células do interstício e vasos positivos para marcador de proliferação celular (Ki- 67) no VD, VE e septo interventricular;
7. proporção entre o número de miocardiócitos e células do interstício/vasos marcadas com Ki-67 no VD .

## 4.1 Análise hemodinâmica

A avaliação detalhada da evolução hemodinâmica durante o experimento faz parte de outro trabalho de tese. Apresenta-se, a seguir, um resumo desses dados.

**Tabela 1 - Gradientes de pressão desenvolvidos pelo VD nos grupos de sobrecarga sistólica contínua *versus* intermitente (média  $\pm$  EP)**

Tempo	Grupo contínuo	Grupo intermitente
<b>BASAL</b>	15,67 $\pm$ 4,50	9,57 $\pm$ 3,58
<b>0</b>	42,50 $\pm$ 6,91	44,29 $\pm$ 4,21
<b>24</b>	47,50 $\pm$ 7,06	53,29 $\pm$ 4,34
<b>48</b>	61,17 $\pm$ 4,59	72,00 $\pm$ 5,75
<b>72</b>	57,14 $\pm$ 5,22	80,00 $\pm$ 4,92
<b>96</b>	44,17 $\pm$ 2,98	20,43 $\pm$ 5,28

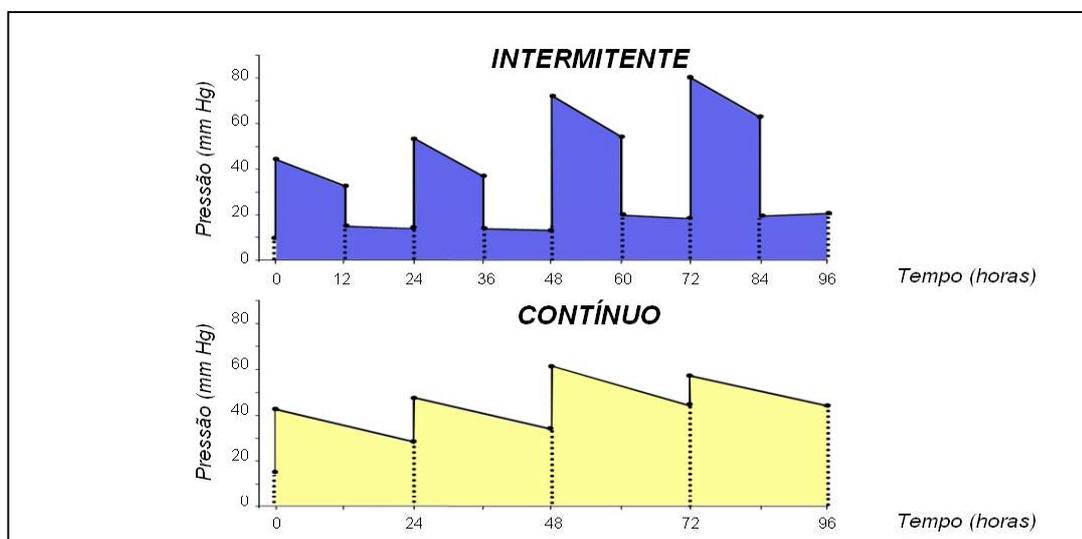
Grupo Contínuo= sobrecarga sistólica contínua do VD.  
 Grupo Intermitente= sobrecarga sistólica intermitente do VD.  
 Valores= média em mm Hg  $\pm$  erro padrão;  
 n = 7; Tempo = horas

### 4.1.1 GRUPO DE ESTIMULAÇÃO INTERMITENTE

O grupo iniciou o experimento com gradiente basal de 9,57 mm Hg (EP= 3,58 mm Hg) e a última insuflação causou um gradiente de 80,00 mm Hg (EP= 4,92 mm Hg), representando um aumento de 736% na variação de pressão VD/ TP (Tabela 1, p= 0,018 – teste não-paramétrico de Wilcoxon). A Figura 3 (painel superior) mostra a variação do gradiente ao longo do estudo.

#### 4.1.2 GRUPO DE ESTIMULAÇÃO CONTÍNUA

A média dos gradientes de pico inicial (primeiro dia de experimento, imediatamente antes da insuflação do dispositivo de bandagem externa) encontrada na mensuração por cateter foi de 15,67 mm Hg (EP= 4,50 mm Hg); ao final do estudo, esse valor passou a ser de 57,14 mm Hg (EP= 5,22 mm Hg), o que representa um acréscimo de 265% na variação de pressão entre o VD e o tronco pulmonar (Tabela 1,  $p= 0,028$  – teste não-paramétrico de Wilcoxon). A Figura 3 (painel inferior) mostra a variação do gradiente ao longo do tempo; os pontos de queda referem-se ao gradiente encontrado no dia seguinte à estimulação, quando o volume do dispositivo diminuía devido a perdas por absorção.

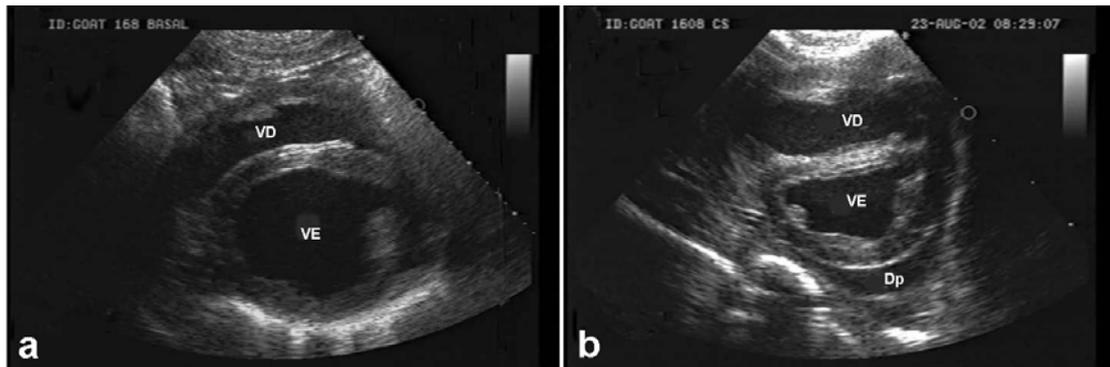


**Figura 3 - Painel superior:** Gradiente VD/TP (mm Hg) do grupo submetido a 12 horas de sobrecarga sistólica do VD, alternadas com 12 horas de descanso.

**Painel inferior:** Gradiente VD/TP (mm Hg) do grupo submetido à sobrecarga sistólica contínua do VD.

## 4.2 Massa estimada do ventrículo direito

O aspecto ecocardiográfico da aquisição de massa muscular pelo VD ao longo do período de estudo está representado na Figura 4.



**Figura 4 -** Ecocardiograma bidimensional nos tempos basal (a) e após cinco dias de treinamento (b), em um animal do grupo de estimulação contínua. VD - ventrículo direito; VE - ventrículo esquerdo; Dp - derrame pericárdico.

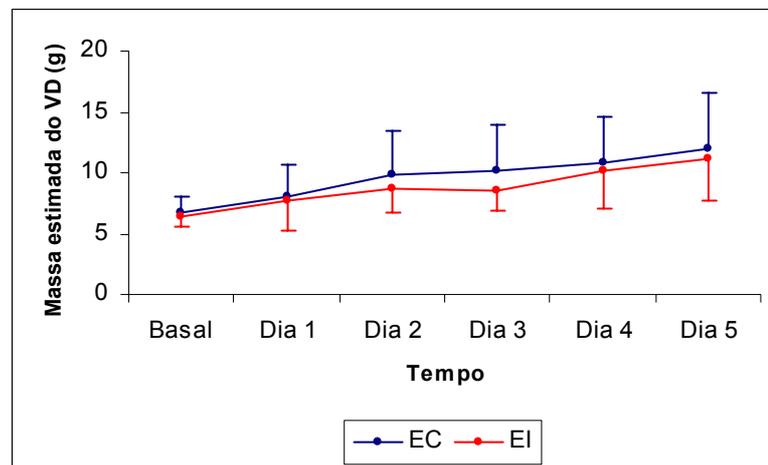
Através da análise de variância com medidas repetidas, observa-se que, no momento basal, a massa estimada do VD não difere em nenhum dos três grupos estudados ( $p= 0,110$ ). Os grupos não apresentam comportamento diferente em relação aos dias avaliados ( $p= 0,856$ ), com perfis de médias paralelos – Tabela 2.

Não há diferença significativa entre os grupos nas médias dos dias ( $p= 0,571$ ).

Há significância estatística entre os momentos de avaliação nos dois grupos estimulados ( $p= 0,032$ ) (Figura 5). No momento basal, a massa estimada do VD é menor que nos outros momentos ( $p< 0,05$ ). O dia 1 difere significativamente do dia 2 ( $p= 0,018$ ); o dia 2 não difere do dia 3 ( $p= 1,000$ ); o dia 3 difere do dia 4 ( $p= 0,013$ ) e o dia 4 difere do dia 5 ( $p= 0,001$ ).

**Tabela 2 -** Valores de média, erro padrão, mediana, mínimo e máximo da variável **massa estimada do ventrículo direito**, segundo o grupo de estudo e os dias de observações

Grupo	Dia	N	Média	EP	Mediana	Mínimo	Máximo
C	Basal	7	5,37	0,45	4,95	3,70	6,76
	Basal	7	6,70	0,52	6,96	4,79	8,58
EC	1	7	8,00	0,98	7,24	4,98	11,20
	2	7	9,91	1,31	9,26	5,54	16,52
	3	7	10,12	1,46	8,95	6,01	17,38
	4	7	10,77	1,43	9,91	7,45	18,34
	5	7	11,97	1,76	9,64	8,36	21,37
EI	Basal	7	6,33	0,30	6,34	5,38	7,72
	1	7	7,69	0,91	6,92	6,08	13,00
	2	7	8,76	0,78	7,78	6,67	12,38
	3	7	8,55	0,65	7,70	6,99	11,95
	4	7	10,13	1,14	9,31	6,62	16,22
	5	7	11,12	1,31	10,06	7,82	18,44



**Figura 5 -** Massa estimada do VD (g) em relação aos dias de treinamento. EC= grupo de estimulação contínua; EI= grupo de estimulação intermitente.

Os índices de função sistólica do ventrículo esquerdo (porcentagem de encurtamento da fibra miocárdica e fração de ejeção) encontravam-se normais no momento basal e mantiveram-se assim nos dois grupos treinados, durante todo o tempo do estudo.

**Em suma: para a variável “massa estimada do VD”, há aquisição significativa por parte dos dois grupos treinados, ao longo dos dias de estudo.**

### **4.3 Aspecto histológico geral**

Tanto para os animais do grupo controle quanto para aqueles dos grupos estimulados, não foram observados, histologicamente, sinais de edema, infiltrado inflamatório relevante ou presença de necrose.

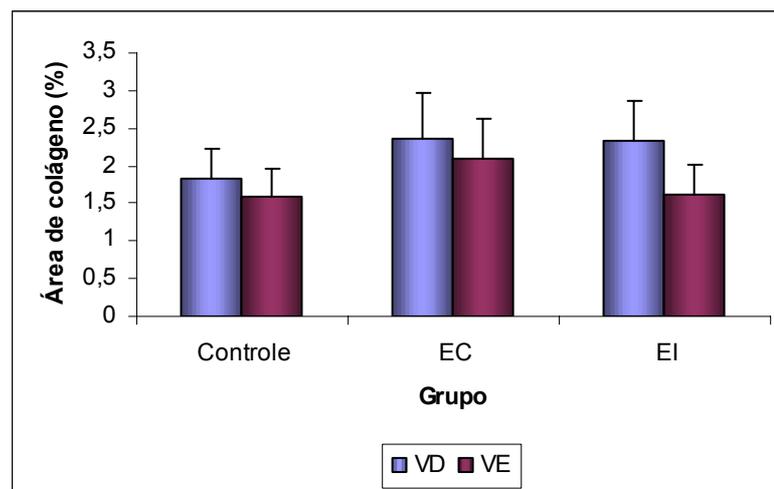
### **4.4 Fração de área de colágeno dos ventrículos direito e esquerdo**

A análise de variância com medidas repetidas mostra que os grupos não apresentam comportamento diferente em relação aos segmentos avaliados ( $p= 0,403$ ), ou seja, apresentam perfis de médias paralelos (Figura 6).

Há diferença estatística entre VD e VE nos três grupos avaliados ( $p= 0,015$ ): os valores do VD são significativamente maiores que os do VE em todos eles (Tabela 3).

**Tabela 3** - Valores de média, erro padrão, mediana, mínimo e máximo da variável **porcentagem de área de colágeno** segundo o grupo de estudo, no miocárdio do VD e VE

Grupo	Segmento	N	Média	EP	Mediana	Mínimo	Máximo
C	VD	7	1,83	0,40	2,23	0,29	3,32
	VE	7	1,58	0,37	1,59	0,24	2,61
EC	VD	7	2,36	0,61	2,64	0,04	4,86
	VE	7	2,09	0,52	2,48	0,02	3,88
EI	VD	7	2,34	0,53	2,86	0,56	3,76
	VE	7	1,63	0,39	1,34	0,56	3,09



**Figura 6** - Média e erro padrão da porcentagem de área de colágeno, segundo grupo e segmento do coração

Em suma: para a variável “fração de área de colágeno”, o VD difere significativamente do VE, apresentando valores maiores nos três grupos estudados, mas não difere significativamente entre os grupos.

## 4.5 Diâmetro médio dos miocardiócitos e de seus respectivos núcleos

### 4.5.1 MIOCARDIÓCITOS

Através da análise de variância com medidas repetidas, observa-se que os grupos não apresentam comportamento significativamente diferente em relação aos segmentos avaliados ( $p= 0,679$ ), isto é, apresentam perfis de médias paralelos.

Considerando-se o septo como um todo (S) e as suas metades direita (SD) e esquerda (SE), tanto entre os grupos quanto intragrupos não há diferença estatística nas médias desses segmentos (Tabela 4,  $p= 0,056$  entre grupos e  $p= 0,907$  dentro dos grupos). Portanto, serão utilizados os valores do septo como um todo para as comparações abaixo.

**Tabela 4 -** Valores de média, erro padrão, mediana, mínimo e máximo da variável **diâmetro dos miocardiócitos** (em micrômetros), segundo o grupo de estudo, nos segmentos S, SD e SE

Grupo	Segmento	N	Média	EP	Mediana	Mínimo	Máximo
C	S	7	7,71	0,26	7,38	7,12	8,89
	SD	7	7,60	0,30	7,20	6,97	9,11
	SE	7	7,83	0,23	7,55	7,28	8,68
EC	S	7	8,65	0,33	8,22	7,76	9,98
	SD	7	8,80	0,29	8,62	8,00	10,06
	SE	7	8,50	0,38	8,08	7,39	9,90
EI	S	7	8,77	0,34	8,84	7,32	10,12
	SD	7	8,64	0,50	8,60	7,11	11,02
	SE	7	8,91	0,34	9,22	7,20	9,79

#### 4.5.1.1 Comparação entre os grupos

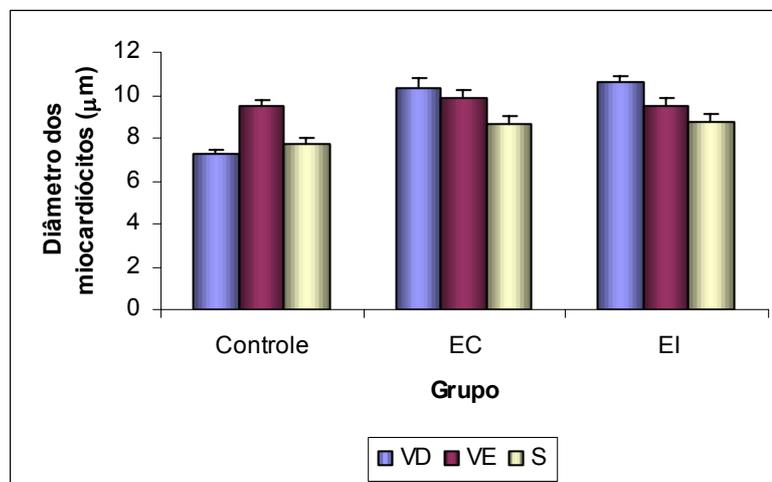
Por meio da análise de variância com medidas repetidas, nota-se que os grupos apresentam comportamento significativamente diferente em relação aos segmentos estudados ( $p < 0,001$ ), existindo, assim, interação entre segmento e grupo (Tabela 5).

Os grupos EC e EI não apresentam comportamento significativamente distinto em relação aos segmentos avaliados, havendo perfis de médias paralelos entre eles ( $p = 0,326$ ); entretanto, diferem do grupo controle com valores estatisticamente maiores para o VD ( $p < 0,001$ ) – Figura 7.

Não há diferença significativa entre os grupos nas médias de S, VD e VE ( $p = 0,978$ ), quando considerados os grupos EC e EI.

**Tabela 5** - Valores de média, erro padrão, mediana, mínimo e máximo da variável **diâmetro dos miocardiócitos** (em micrômetros), segundo o grupo de estudo, nos segmentos VD, VE e S

Grupo	Segmento	N	Média	EP	Mediana	Mínimo	Máximo
<b>C</b>	VD	7	7,28	0,20	7,23	6,66	8,31
	VE	7	9,50	0,24	9,41	8,53	10,44
	S	7	7,71	0,26	7,38	7,12	8,89
<b>EC</b>	VD	7	10,35	0,43	10,76	8,54	11,83
	VE	7	9,88	0,37	9,36	9,23	11,94
	S	7	8,65	0,33	8,22	7,76	9,98
<b>EI</b>	VD	7	10,57	0,27	10,85	9,49	11,33
	VE	7	9,50	0,39	9,66	7,66	10,50
	S	7	8,77	0,34	8,84	7,32	10,12



**Figura 7 -** Média e erro padrão do diâmetro transversal dos miocardiócitos ( $\mu\text{m}$ ), segundo grupo e segmento do coração

#### 4.5.1.2 Comparação dentro de cada grupo

Há diferença entre S, VD e VE nos grupos EC e EI ( $p = 0,001$ ). Em ambos os grupos estimulados, o VD difere do VE ( $p = 0,011$ ) e de S ( $p < 0,001$ ), e o VE difere de S ( $p < 0,001$ ), com valores significativamente maiores (Tabela 5, Figura 7).

O grupo controle apresenta diferenças significativas nos segmentos avaliados ( $p = 0,006$ ). Observa-se que o diâmetro dos miocardiócitos do VD é estatisticamente menor quando comparado ao VE ( $p < 0,001$ ); porém, não difere do diâmetro das células do septo ( $p = 0,134$ ). Os valores encontrados para o VE são significativamente maiores que os do septo ( $p = 0,006$ ).

**Em suma: para a variável “diâmetro dos miocardiócitos”, quando considerados os VDs, os grupos EC e EI apresentam valores**

significativamente maiores que os do grupo controle. Além disso, o diâmetro das células do VD nos grupos EC e EI é estatisticamente maior quando comparado aos demais segmentos desses grupos. No grupo controle, os valores do VD são significativamente menores que os do VE.

#### 4.5.2 NÚCLEOS

Através da análise de variância com medidas repetidas, observa-se que não existem diferenças estatísticas entre os grupos em relação aos segmentos avaliados ( $p= 0,379$ ), ou seja, os mesmos apresentam perfis de médias paralelos (Tabela 6).

**Tabela 6 -** Valores de média, erro padrão, mediana, mínimo e máximo da variável **diâmetro dos núcleos de miocardiócitos** (em micrômetros), segundo o grupo de estudo, nos segmentos S, SD e SE

Grupo	Segmento	N	Média	EP	Mediana	Mínimo	Máximo
<b>C</b>	S	7	3,69	0,12	3,53	3,35	4,13
	SD	7	3,59	0,13	3,39	3,24	4,08
	SE	7	3,80	0,12	3,67	3,47	4,22
<b>EC</b>	S	7	3,99	0,15	3,90	3,54	4,73
	SD	7	3,97	0,13	3,84	3,47	4,45
	SE	7	4,00	0,20	3,79	3,50	5,06
<b>EI</b>	S	7	3,96	0,11	3,97	3,61	4,40
	SD	7	3,95	0,14	3,89	3,38	4,52
	SE	7	3,97	0,10	4,05	3,44	4,29

Não há diferença significativa entre os grupos nas médias de S, SD e SE ( $p= 0,252$ ). O mesmo ocorre considerando-se os três segmentos dentro de cada grupo ( $p= 0,379$ ). Assim, será utilizado o valor de S para as comparações abaixo (Tabela 7).

**Tabela 7** - Valores de média, erro padrão, mediana, mínimo e máximo da variável **diâmetro dos núcleos de miocardiócitos** (em micrômetros), segundo o grupo de estudo, nos segmentos VD, VE e S

Grupo	Segmento	N	Média	EP	Mediana	Mínimo	Máximo
<b>C</b>	VD	7	3,49	0,11	3,42	3,20	3,98
	VE	7	4,26	0,06	4,28	4,01	4,47
	S	7	3,69	0,12	3,53	3,35	4,13
<b>EC</b>	VD	7	4,67	0,19	4,78	3,82	5,25
	VE	7	4,28	0,22	4,20	3,73	5,48
	S	7	3,99	0,15	3,90	3,54	4,73
<b>EI</b>	VD	7	4,54	0,08	4,50	4,28	4,84
	VE	7	4,08	0,07	4,05	3,80	4,35
	S	7	3,96	0,11	3,97	3,61	4,40

#### 4.5.2.1 Comparação entre os grupos

A análise de variância com medidas repetidas mostra que os grupos apresentam diferenças significativas em relação aos segmentos avaliados ( $p= 0,001$ ), havendo interação entre segmento e grupo.

Não se observam diferenças entre os grupos EC e EI em relação aos segmentos ( $p= 0,744$ ); entretanto, quando considerados os ventrículos direitos, ambos os grupos treinados diferem dos controles (EC x C:  $p< 0,005$  e EI x C:  $p< 0,001$ ) – Tabela 7.

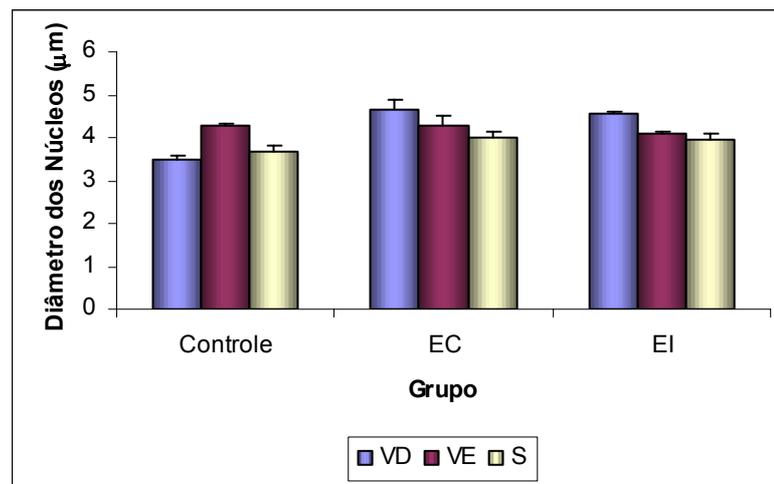
Comparando-se os grupos EC e EI, não há diferença significativa entre eles nas médias de S, VD e VE ( $p= 0,439$ ).

#### **4.5.2.2 Comparação dentro de cada grupo**

Considerando-se o VD dos animais treinados, o mesmo difere do VE ( $p= 0,008$ ) e de S ( $p= 0,001$ ), com valores significativamente maiores em ambos os grupos EC e EI (Tabela 7, Figura 8). Nesses mesmos grupos, não há diferença estatística entre o VE e S ( $p= 0,063$ ).

Para o grupo controle, há significância estatística entre os segmentos ( $p= 0,008$ ). O VD apresenta valores menores que o VE ( $p= 0,001$ ), e maiores que S ( $p= 0,025$ ); da mesma forma, os núcleos dos miocardiócitos do VE possuem diâmetro maior quando comparados a S ( $p= 0,005$ ).

**Em suma: para a variável “diâmetro dos núcleos de miocardiócitos” os grupos EC e EI respondem da mesma forma e apresentam valores maiores para o VD em relação ao grupo controle. Dentro de cada grupo, os valores são maiores para os VDs dos grupos condicionados (EC e EI).**

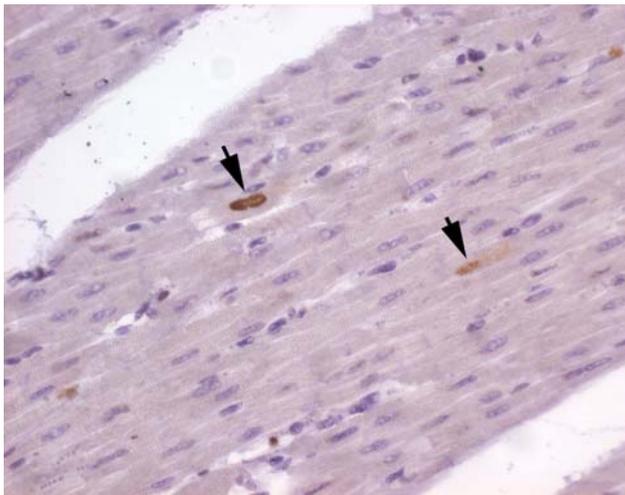


**Figura 8 -** Média e erro padrão do diâmetro transverso dos núcleos de miocardiócitos ( $\mu\text{m}$ ), segundo grupo e segmento do coração.

## 4.6 Número de miocardiócitos e células do interstício e vasos positivos para Ki- 67

### 4.6.1 ANÁLISE DO ÍNDICE DE MIOCARDIÓCITOS Ki-67+

O aspecto histológico dos miocardiócitos com núcleos marcados pelo Ki- 67 está demonstrado na Figura 9.



**Figura 9.** Fotomicrografia de miocárdio do VD submetido à reação de imuno-histoquímica para marcação com Ki-67. As setas mostram núcleos positivos de miocardiócitos. Objetiva 40X, contra-coloração pela hematoxilina de Harris.

Através da análise de variância com medidas repetidas, observa-se que os grupos não apresentam comportamento diferente em relação aos segmentos avaliados ( $p= 0,085$ ), havendo, portanto, perfis de médias paralelos entre eles (Tabela 8).

**Tabela 8 -** Valores de média, erro padrão, mediana, mínimo e máximo da variável **índice de miocardiócitos marcados com Ki-67** (expresso em porcentagem), segundo o grupo de estudo, nos segmentos S, SD e SE

Grupo	Segmento	N	Média	EP	Mediana	Mínimo	Máximo
<b>C</b>	S	7	0,18	0,12	0,05	0,00	0,90
	SD	7	0,19	0,10	0,05	0,00	0,65
	SE	7	0,30	0,21	0,10	0,00	1,55
<b>EC</b>	S	7	0,21	0,05	0,25	0,00	0,40
	SD	7	0,40	0,06	0,40	0,20	0,60
	SE	7	0,16	0,05	0,10	0,00	0,35
<b>EI</b>	S	7	0,08	0,03	0,05	0,00	0,25
	SD	7	0,03	0,01	0,00	0,00	0,10
	SE	7	0,09	0,04	0,05	0,00	0,30

Não há diferença estatística entre os grupos nas médias de S, SD e SE ( $p= 0,226$ ). Também não existe diferença entre esses segmentos nos três grupos estudados ( $p= 0,187$ ). Conseqüentemente, será utilizado o valor de S para as comparações abaixo.

#### 4.6.1.1 Comparação entre os grupos

Não há diferença estatística entre os grupos nas médias de VD, VE e S (Tabela 9,  $p= 0,351$ ).

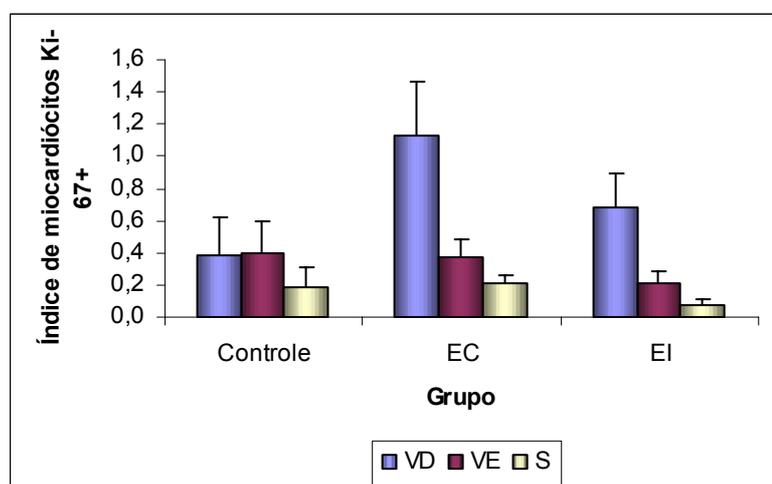
**Tabela 9** - Valores de média, erro padrão, mediana, mínimo e máximo da variável **índice de miocardiócitos marcados com Ki-67** (expresso em porcentagem), segundo o grupo de estudo, nos segmentos VD, VE e S

Grupo	Segmento	N	Média	EP	Mediana	Mínimo	Máximo
<b>C</b>	VD	7	0,39	0,23	0,15	0,00	1,70
	VE	7	0,40	0,19	0,20	0,05	1,45
	S	7	0,18	0,12	0,05	0,00	0,90
<b>EC</b>	VD	7	1,13	0,34	1,10	0,15	2,25
	VE	7	0,37	0,12	0,25	0,00	0,90
	S	7	0,21	0,05	0,25	0,00	0,40
<b>EI</b>	VD	7	0,68	0,21	0,75	0,05	1,40
	VE	7	0,21	0,08	0,20	0,00	0,60
	S	7	0,08	0,03	0,05	0,00	0,25

Pela análise de variância com medidas repetidas, nota-se que os grupos não apresentam comportamento diferente em relação aos segmentos avaliados ( $p= 0,315$ ), não havendo, portanto, interação entre segmento e grupo.

#### 4.6.1.2 Comparação dentro de cada grupo

Há diferença entre S, VD e VE, nos três grupos ( $p= 0,001$ ). O VD difere do VE ( $p= 0,009$ ) e de S ( $p< 0,001$ ), apresentando valores significativamente maiores nos grupos EC e EI; no grupo controle, o VE apresenta valores maiores que o VD. Em relação ao septo, o VE possui valores estatisticamente maiores ( $p= 0,012$ ) nos três grupos estudados (Tabela 9, Figura 10).

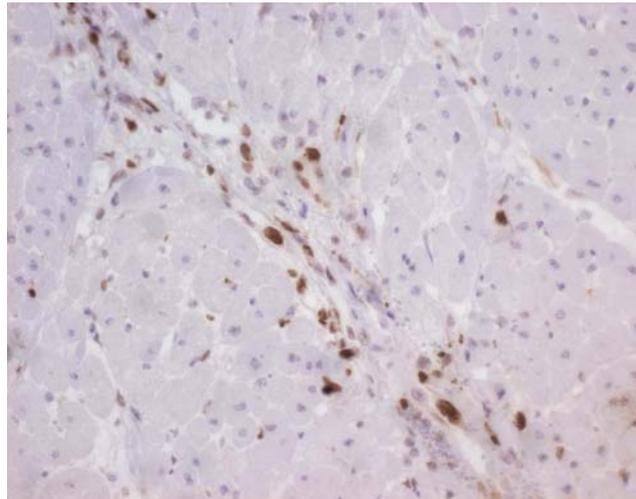


**Figura 10** - Média e erro padrão do índice de miocardiócitos marcados com Ki-67 (número de células positivas/2000 miocardiócitos, expresso em porcentagem)

**Em suma: para a variável “índice de miocardiócitos positivos para Ki-67”, o VD apresenta valores estatisticamente maiores nos grupos EC e EI quando comparado com os outros segmentos dos mesmos grupos.**

#### 4.6.2 ANÁLISE DO ÍNDICE DE CÉLULAS DO INTERSTÍCIO E VASOS Ki-67+

O aspecto histológico das células do interstício e vasos com núcleos marcados pelo Ki-67 está demonstrado na Figura 11.



**Figura 11** - Fotomicrografia de miocárdio do VD submetido à reação de imunohistoquímica para marcação com Ki-67. Notam-se numerosos núcleos positivos, pertencentes a células do interstício e vasos. Objetiva 40X; contra-coloração pela hematoxilina de Harris.

Pela análise de variância com medidas repetidas, nota-se que os grupos não apresentam comportamento diferente em relação aos segmentos avaliados ( $p= 0,248$ ), ou seja, os perfis das médias são paralelos (Tabela 10).

Não há diferença estatística entre os grupos nas médias de S, SD e SE ( $p= 0,336$ ). Porém, considerando-se os três grupos estudados, há diferença entre S, SD e SE ( $p= 0,036$ ). O valor de S difere significativamente dos valores de SD ( $p= 0,009$ ) e SE ( $p= 0,029$ ). O SD e SE também diferem entre si ( $p= 0,024$ ).

Portanto, serão utilizados os valores de SE e SD para as comparações que se seguem.

**Tabela 10** - Valores de média, erro padrão, mediana, mínimo e máximo da variável **índice de células do interstício e vasos (I/V)** – expresso em porcentagem – segundo o grupo de estudo, nos segmentos S, SD e SE

Grupo	Segmento	N	Média	EP	Mediana	Mínimo	Máximo
<b>C</b>	S	7	1,47	0,76	0,60	0,20	5,95
	SD	7	1,59	0,80	0,85	0,10	6,05
	SE	7	1,62	0,78	0,75	0,40	6,20
<b>EC</b>	S	7	3,01	0,84	2,15	0,75	6,60
	SD	7	3,73	1,20	2,30	0,85	9,40
	SE	7	2,06	0,54	1,40	0,75	4,55
<b>EI</b>	S	7	3,17	1,04	2,85	0,90	9,00
	SD	7	4,94	1,56	4,60	0,70	13,00
	SE	7	1,61	0,34	1,25	1,00	3,55

#### 4.6.2.1 Comparação entre os grupos

Os grupos EC e EI não apresentam comportamento diferente em relação aos segmentos avaliados ( $p= 0,462$ ), mas diferem do grupo controle (EC x C:  $p= 0,0095$ ; EI x C:  $p= 0,0014$ ). No grupo controle, o VD, VE, SD e SE se comportam da mesma forma; entretanto, nos grupos estimulados, o VD possui valores maiores, vindo logo a seguir o SD, com o VE e SE apresentando os índices mais baixos (Tabela 11).

**Tabela 11** - Valores de média, erro padrão, mediana, mínimo e máximo da variável **índice de células do interstício e vasos (I/V)** – expresso em porcentagem – segundo o grupo de estudo, nos segmentos VD, VE, SD e SE

Grupo	Segmento	N	Média	EP	Mediana	Mínimo	Máximo
<b>C</b>	VD	7	1,16	0,75	0,40	0,00	5,50
	VE	7	1,81	0,52	1,30	0,25	4,55
	SD	7	1,59	0,80	0,85	0,10	6,05
	SE	7	1,62	0,78	0,75	0,40	6,20
<b>EC</b>	VD	7	16,32	3,03	16,20	5,40	30,80
	VE	7	2,57	0,53	2,50	0,15	4,70
	SD	7	3,73	1,20	2,30	0,85	9,40
	SE	7	2,06	0,54	1,40	0,75	4,55
<b>EI</b>	VD	7	12,36	1,82	13,10	2,70	17,45
	VE	7	1,45	0,29	1,30	0,85	3,10
	SD	7	4,94	1,56	4,60	0,70	13,00
	SE	7	1,61	0,34	1,25	1,00	3,55

Através da análise de variância com medidas repetidas, observa-se que os grupos exibem comportamento diferente em relação aos segmentos avaliados ( $p= 0,003$ ), havendo interação entre segmento e grupo.

Para os grupos EC e EI, não há diferença entre eles nas médias de S, VD e VE ( $p= 0,399$ ), comportando-se, portanto, de maneira semelhante.

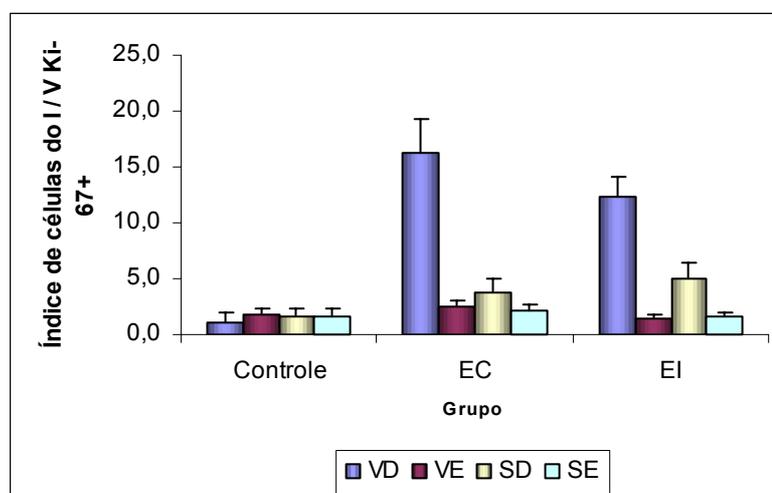
#### 4.6.2.2 Comparação dentro de cada grupo

Em ambos os grupos treinados – EC e EI – há diferença entre VD, VE, SD e SE ( $p < 0,001$ ): o VD apresenta valores significativamente maiores que os outros segmentos ( $p < 0,001$ ); o SD possui índices estatisticamente

maiores que o VE ( $p= 0,024$ ) e que o SE ( $p= 0,012$ ); o VE não difere do SE ( $p= 0,527$ ) – Figura 12.

O grupo controle não apresenta diferença entre os segmentos analisados ( $p= 0,198$ ).

**Em suma: para a variável “índice de células do interstício e vasos marcadas com Ki-67”, os grupos EC e EI respondem da mesma forma, com valores significativamente maiores para o VD em comparação com o grupo controle. Em ambos os grupos estimulados, o VD apresenta maior número de células marcadas em comparação com o VE, SD e SE.**



**Figura 12-** Média e erro padrão do índice de células do interstício e vasos marcadas com Ki-67 (número de células positivas/2000 células do interstício/vasos, expresso em porcentagem)

#### 4.7 Proporção entre índices de miocardiócitos e células do interstício/vasos marcadas com Ki-67

Através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, observa-se que não existem diferenças significativas no VD entre os grupos estudados (Tabela 12,  $p=0,432$ ).

**Tabela 12** - Valores de média, erro padrão, mediana, mínimo e máximo da variável **proporção entre índices de miocardiócitos e células I/V Ki-67 positivas**, segundo o grupo de estudo, no segmento VD

VD-Grupo	N	Média	EP	Mediana	Mínimo	Máximo
C	6*	0,23	0,07	0,30	0,00	0,45
EC	7	0,06	0,01	0,06	0,02	0,14
EI	7	0,05	0,01	0,05	0,01	0,10

\* divisão por zero em um dos animais

**Em suma: os grupos C, EC e EI respondem da mesma forma e não apresentam diferença estatística para a variável “proporção entre miocardiócitos e células do interstício/vasos Ki-67 +”.**

Os resultados da quantificação de células marcadas com Ki-67 (miocardiócitos e células do interstício/vasos) através da análise por campo microscópico estão demonstrados nos anexos de 1 a 4.

## **5. Discussão**

---

## 5.1 Aspectos gerais sobre o preparo ventricular

A indução artificial de hipertrofia miocárdica vem sendo utilizada em crianças com transposição das grandes artérias candidatas à chamada correção anatômica do defeito, com a finalidade de preparar o ventrículo que se tornará sistêmico e que, portanto, será submetido a pressões mais elevadas<sup>52,65,71,134-136</sup>.

Durante a vida intra-uterina, os pulmões não funcionam para trocas gasosas, recebendo sangue apenas para seu desenvolvimento como tecido, e a hematose é realizada através da placenta. Nessa situação, a resistência vascular pulmonar é alta e as pressões no VE e no ventrículo direito encontram-se igualadas, possuindo ambas as câmaras, portanto, paredes de mesma espessura. Após o nascimento, com a queda na resistência vascular pulmonar, os ventrículos adaptam-se às respectivas pressões, o que se reflete na massa dos mesmos<sup>10,13,21</sup>.

Na TGA, o ventrículo pulmonar (anatomicamente o VE) sofrerá diminuição da espessura de suas paredes após perder o “padrão fetal”<sup>22,24,25</sup>. Como o melhor procedimento a ser adotado nesses pacientes é a correção cirúrgica “anatômica” (Cirurgia de Jatene, quando se faz a conexão do VE à circulação sistêmica através da aorta e do VD ao tronco pulmonar), o diagnóstico e a conduta operatória devem ser precoces a fim de evitar que o ventrículo a ser submetido à maior resistência se encontre desadaptado<sup>39-44</sup>. Quando isso não é possível, o que pode ser feito para contornar o

problema é realizar a cirurgia em duas etapas, sendo que, numa primeira fase, o VE seria preparado para se tornar sistêmico, passando-se, a seguir, para a segunda fase, que compreenderia a conexão das artérias aos ventrículos correspondentes <sup>53,55</sup>.

Uma maneira de realizar esse preparo é imprimir ao ventrículo uma sobrecarga de pressão através da obstrução de sua via de saída. Isso causa aumento reacional da massa muscular, o que, teoricamente, imprime força contrátil efetiva contra pressões mais elevadas <sup>50,51,56,60,71,74,77,78</sup>. Quando a correção anatômica da TGA é realizada numa única fase, as chances de os pacientes desenvolverem disfunção ventricular tardiamente são menores do que quando se procede ao preparo prévio do ventrículo pulmonar. Provavelmente, tal fato esteja relacionado com a sobrecarga aguda que é imposta a essa câmara e, conseqüentemente, com o tipo de resposta que ela desenvolve frente a esse estímulo (hipertrofia e/ ou hiperplasia) <sup>51,52</sup>.

É de extrema importância que a adaptação do ventrículo pulmonar às pressões sistêmicas seja realmente efetiva, isto é, que ele permaneça com sua massa elevada e não sofra dilatação e disfunção com o passar do tempo.

Com base no princípio de preparo muscular de atletas, em que os músculos esqueléticos e cardíaco desenvolvem a capacidade de suportar maior carga de trabalho através da hipertrofia de suas fibras, coloca-se a hipótese de que talvez o ventrículo a ser preparado tenha melhor adaptação se for submetido a um preparo intermitente <sup>82-84</sup>.

Tanto o músculo cardíaco quanto o esquelético fazem parte da musculatura estriada e ambos podem sofrer hipertrofia como mecanismo adaptativo frente a sobrecargas de trabalho. O trabalho concêntrico é observado na musculatura esquelética em presença da produção de tensão ativa quando o músculo sofre encurtamento (como no caso dos levantadores de peso); no músculo cardíaco, ocorre na elevação de pós-carga, ou seja, na sobrecarga de pressão; nesse caso, o aumento da massa é desproporcional ao volume da câmara <sup>137,138</sup>.

As unidades contráteis da musculatura estriada são representadas pelos sarcômeros, os quais se constituem em filamentos finos e grossos, organizados longitudinalmente, formando uma intrincada rede tridimensional de proteínas, cuja função é produzir força e movimento. Por serem estruturas tridimensionais, podem crescer em comprimento ou em largura; na hipertrofia concêntrica, novos sarcômeros são adicionados em paralelo, fazendo com que a célula aumente seu volume na tentativa de diminuir o estresse sobre a parede muscular, no momento da contração <sup>137,139</sup>. Em atletas de força, esse ganho de massa muscular é desejável e conseguido com programas de treinamento físico; no coração, a hipertrofia concêntrica é relacionada de imediato com condições patológicas de sobrecarga de pressão, podendo levar, com o tempo, à disfunção contrátil do ventrículo. Isso se relaciona a uma das principais diferenças entre os músculos estriados: no músculo esquelético, a hipertrofia é alcançada mediante trabalho intermitente e, no coração, a aquisição de massa muscular deve-se ao trabalho contínuo <sup>137</sup>.

Por serem ambos estriados, existe a possibilidade de que, se o músculo cardíaco for submetido a um programa de exercício semelhante àquele preconizado para o esquelético, talvez a qualidade da massa muscular adquirida seja melhor, por proporcionar um maior aproveitamento dos mecanismos de adaptação durante o descanso. Além disso, existem evidências de que a hipertrofia proporcionada pelo exercício físico é desencadeada por mecanismos genéticos e biomoleculares semelhantes àqueles que provocam hipertrofia patológica<sup>140,141</sup>.

De Maria *et al.*<sup>82</sup> analisaram 26 adultos normais por meio do ecocardiograma, verificando as alterações estruturais e funcionais que o exercício físico provocou num treinamento de caminhada e corrida durante uma hora por dia, quatro dias por semana. Após um condicionamento de 11 semanas, encontraram aumento no diâmetro diastólico final e diminuição no diâmetro sistólico final do VE, o que resultou em aumento na fração de encurtamento dessa câmara. Além disso, houve aumento na espessura das paredes ventriculares esquerdas, com conseqüente aquisição de massa muscular. Portanto, os resultados indicaram melhora no desempenho ventricular esquerdo após o programa de treinamento. Scheuer *et al.*<sup>142</sup> demonstraram que o aumento da massa miocárdica induzida pelo exercício associa-se a uma maior atividade da actomiosina ATPase, sugerindo melhor desempenho ventricular nesse tipo de hipertrofia em contraste com aquela reacional à sobrecarga hemodinâmica. O estudo de Ziada *et al.*<sup>143</sup>, utilizando ratos geneticamente hipertensos (SHR) e com hipertrofia miocárdica do VE, atesta que aqueles submetidos a exercícios de corrida ou

esteira durante uma hora por dia, cinco dias por semana, apresentaram um acréscimo significativo de 38% na capacidade de trocas gasosas, além de um aumento de 48% na proliferação de vasos miocárdicos, mostrando que o treinamento físico estimula a angiogênese, com conseqüente acréscimo no suprimento de oxigênio para o miocárdio hipertrofiado.

No presente estudo, o período de 12 horas de estímulo ao dia foi escolhido pela maior conveniência na manipulação dos animais dentro da rotina do Laboratório Experimental. Na verdade, não se conhece ainda qual o tempo ideal de sobrecarga sistólica para que o ventrículo pulmonar adquira massa muscular satisfatória.

Até o início do século passado, acreditava-se que o aumento da massa muscular cardíaca fosse conseqüência de hiperplasia (aumento da população de células através de mitose) e de hipertrofia (aumento do diâmetro das células, sem alteração no número das mesmas). Entretanto, a partir da segunda década do referido século, postulou-se que o coração era um órgão pós-mitótico e que, depois do nascimento, os miocardiócitos estavam incapacitados para sofrer proliferação. Tal afirmação baseava-se na dificuldade de identificar figuras de mitose, uma vez que a fase M tem curta duração (aproximadamente 30 minutos), além do fato de os miocardiócitos apresentarem baixa taxa de divisão celular<sup>88</sup>. Porém, estudos experimentais e clínicos recentes mostram que tanto a fibra miocárdica quanto os componentes intersticiais podem apresentar hiperplasia até algumas semanas após o nascimento, como também o podem corações adultos comprometidos por doenças valvares, coronarianas ou por cardiomiopatia

dilatada. Essa capacidade de proliferação celular foi igualmente observada em corações transplantados que apresentaram rejeição<sup>89-99,128</sup>. O conceito de que os miocardiócitos não se replicam após o período neonatal implica em considerar que todas as células presentes ao nascimento deveriam perdurar pela vida inteira do indivíduo. Num modelo experimental em ratos Fischer 344, Anversa *et al.*<sup>129</sup> demonstraram que, com o transcorrer da idade, dá-se uma perda progressiva da função ventricular, o que, no entanto, só se torna aparente no final da vida desses animais. Tal disfunção relaciona-se com perda de miocardiócitos, diminuição da densidade dos capilares e acúmulo de colágeno. Numa tentativa de reposição celular, os miocardiócitos sofrem hiperplasia, a qual é mais intensa no VD do que no VE. Esses estudos indicam que, mesmo sendo células diferenciadas, os miocardiócitos são capazes de reentrar no ciclo proliferativo. Na vida intra-uterina, o crescimento cardíaco deve-se principalmente à proliferação dos miocardiócitos; no período neonatal, ocorre a transição do crescimento hiperplásico para o crescimento hipertrófico e, no coração adulto, a maior parte dos miocardiócitos não prolifera. Portanto, a idade em que o estímulo aparece é um fator de suma importância para a ocorrência de replicação satisfatória dessas células<sup>4,52,85,91,92,103</sup>.

Anversa *et al.*<sup>4, 100</sup> demonstraram em ratos que, após o nascimento, o VE, exposto à circulação sistêmica, sofre aumento significativo de sua massa e também de seu volume. Desse modo, a relação entre a espessura e o raio ventricular permanece constante em um processo fisiológico. A proliferação celular (hiperplasia) continua até algumas semanas após o

nascimento. Associado a isso, há também aumento no diâmetro dos miócitos (hipertrofia). Esses dois fatores contribuem para o aumento na espessura das paredes do VE. Progressivamente, o crescimento em paralelo supera a proliferação dos miócitos e há aumento do número de mitocôndrias e miofibrilas.

Na presença de sobrecarga anormal de pressão, a espessura das paredes cardíacas aumenta sem que haja dilatação das câmaras (hipertrofia concêntrica), com o objetivo de normalizar o estresse sistólico sobre o ventrículo <sup>100,144</sup>. É importante determinar se esse espessamento é devido apenas ao aumento do diâmetro das células cardíacas contráteis ou se existe também replicação das mesmas, pois a hipertrofia como mecanismo adaptativo é eficiente na fase compensada, podendo evoluir para disfunção do músculo e insuficiência cardíaca congestiva com o tempo <sup>102</sup>. Sabe-se que ratos jovens (dois meses de idade), com oclusão experimental do tronco pulmonar e conseqüente sobrecarga crônica de pressão sobre o VD, apresentam hipertrofia (24%) e aumento do número de miócitos (44%) desse ventrículo, tornando-o mais apto a diminuir o pico de estresse sistólico resultante da pressão elevada. O número de mitocôndrias apresenta-se elevado numa primeira fase e há restauração aos níveis normais após um período crônico, indicando que a quantidade de mitocôndrias existentes é capaz de produzir energia (ATP) suficiente para evitar disfunção ventricular <sup>100</sup>. No presente trabalho, observa-se tanto hipertrofia como hiperplasia de miocardiócitos após sobrecarga de pressão, em animais que já haviam ultrapassado o período neonatal, como será discutido adiante.

## 5.2 A hipertrofia miocárdica

Este trabalho evidenciou, por meio do ecocardiograma, que houve aquisição de massa muscular do VD em ambos os grupos estimulados e em porcentagens semelhantes. Um dado importante a ser considerado no cálculo da massa ventricular é a espessura da parede livre do VD, a qual mostrou equalização com o septo interventricular e parede inferior do VE por volta do terceiro dia de preparo em ambos os grupos treinados, apesar do grupo EI ter sido estimulado durante a metade do tempo do grupo EC.

A análise histológica e morfométrica mostrou que, para ambos os grupos estimulados, houve hipertrofia dos miocardiócitos do VD e dos seus respectivos núcleos, quando comparados aos do grupo controle, comprovando que esse mecanismo faz parte da aquisição de massa muscular do ventrículo em treinamento, como já demonstrado em outros modelos experimentais de sobrecarga de pressão<sup>4,100,101</sup>.

O miocárdio é formado por três componentes: muscular, intersticial e vascular<sup>115</sup>. A hipertrofia miocárdica caracteriza-se não só pelo aumento do componente muscular, mas também pela proliferação de células do interstício<sup>116</sup>, o qual exerce funções importantes, como: 1. fornecer suporte para os miocardiócitos, vasos sanguíneos e linfáticos; 2. atuar como mecanismo de defesa contra microorganismos estranhos; 3. facilitar as trocas de nutrientes entre os miocardiócitos; 4. auxiliar na contratilidade das células<sup>117</sup>. Entretanto, quando está presente em excesso, pode causar disfunção cardíaca, inicialmente diastólica e, nos estágios finais, também sistólica<sup>115-118</sup>. Reiss *et al.*<sup>93</sup>, estudando corações fetais e neonatais de

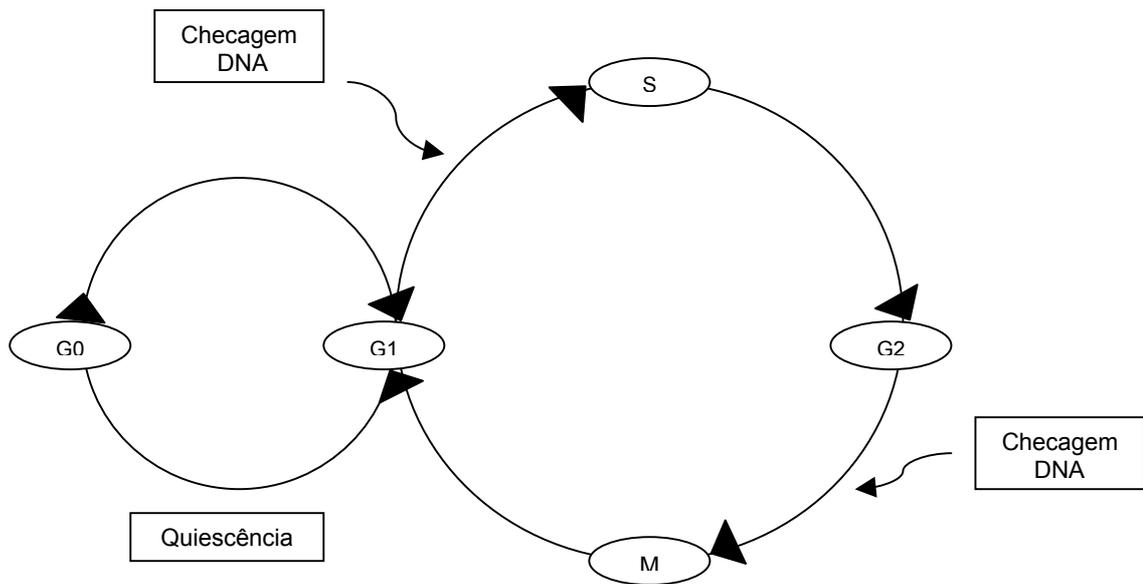
ratos, demonstraram que o padrão de proliferação das células miocárdicas é o mesmo para os miocardiócitos e para os fibroblastos, decrescendo progressivamente no período pós-natal, o que sugere ser o crescimento miocárdico coordenado entre essas duas maiores populações celulares.

No presente estudo, não houve diferença significativa na porcentagem de colágeno intersticial do VD nos três grupos; como a síntese de miosina é mais rápida que a do colágeno <sup>117</sup>, talvez o tempo observado não tenha sido suficiente para mostrar um incremento do componente intersticial. Le Bret *et al.* <sup>84</sup> compararam, durante cinco semanas, três tipos de preparo do ventrículo pulmonar em ovelhas jovens, após o período neonatal: contínuo, progressivo e intermitente. Nenhum dos animais treinados de forma intermitente apresentou fibrose do VD, ao contrário dos outros grupos, sugerindo que a cascata de eventos que tem início na hipertrofia miocárdica não é acompanhada por fibrose quando se desenvolve em boas condições de oxigenação (correspondente ao período em que o ventrículo não está submetido a aumento na pós-carga). Buccino *et al.* <sup>145</sup>, estudando 26 gatos com hipertrofia ventricular direita produzida por constrição contínua do tronco pulmonar, encontraram maior concentração de colágeno no VD em relação aos controles e aos VEs. O tempo de constrição do tronco pulmonar variou de três a noventa dias, sendo que a maioria dos VDs entraram em falência com vinte a cinquenta dias. Portanto, é necessário considerar o tipo de treinamento e o fato de que talvez a indução de fibrose miocárdica seja responsável pela disfunção a longo prazo nos corações preparados para a correção da transposição no plano arterial.

O achado de maior quantidade de colágeno intersticial no VD em comparação com o VE encontra embasamento em trabalhos prévios <sup>115-118,146,147</sup>, que mostram ser o interstício proporcionalmente maior no primeiro em humanos <sup>115-118</sup>, ratos <sup>146</sup> e coelhos <sup>147</sup>.

### **5.3 Marcadores da proliferação celular**

Para que haja proliferação celular, é pré-requisito a ocorrência de duplicação do genoma por meio da síntese de DNA <sup>90,103,148</sup>. A partir disso, tem lugar uma série de eventos que fazem parte do chamado ciclo celular. As células que não se dividem continuamente encontram-se, a princípio, num estado quiescente ou fase G<sub>0</sub>; para entrarem no ciclo celular, faz-se necessário que as mesmas passem para a fase G<sub>1</sub>, a qual representa um “gatilho” para iniciar o processo de duplicação. O passo seguinte é a transição para a fase S (de síntese celular); entretanto, antes disso, dá-se a verificação, por parte do organismo, de que o DNA encontra-se íntegro, para só então ocorrer a replicação. Passada essa etapa, a célula atinge a fase G<sub>2</sub> e, antes de chegar à mitose propriamente dita, ocorre nova checagem acerca da qualidade do DNA. Se o material genético duplicado apresentar danos, o mesmo pode ser reparado ou, caso isso não seja viável, a célula será desprezada através de um mecanismo conhecido como apoptose ou morte celular programada <sup>148</sup> – Figura 13.



**Fig. 13 -** Ciclo proliferativo celular. G- *gap*; M- mitose; S- síntese  
Adaptado de: Kumar V, Abbas AK, Fausto N. *Tissue reneval and repair: regeneration, healing, and fibrosis*. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005, Cap 3, p.87-118.

Estudos clínicos e experimentais foram desenvolvidos utilizando marcadores da síntese de DNA para demonstrar a proliferação dos miocardiócitos no período pós-natal e em corações adultos sob condições patológicas. Com exceção da presença de figuras de mitose, que indicam especificamente a célula em divisão, mas são difíceis de serem observadas, os outros marcadores comumente utilizados (incorporação de timidina, bromodeoxiuridina e PCNA) podem indicar síntese de DNA para citocinese, mas também para cariocinese e reparo celular<sup>103,130</sup>.

Em 1983, Gerdes *et al.*<sup>104</sup> descreveram pela primeira vez um anticorpo murino monoclonal, da classe das IgG, gerado pela imunização de camundongos com o núcleo de células pertencentes a linfoma de Hodgkin. Essa proteína foi chamada de Ki-67 (K de Kiel, cidade de origem e 67 referindo-se ao número do clone original)<sup>108</sup>. Seu respectivo antígeno (Ag Ki-67) está presente no núcleo celular e se expressa em todas as fases do ciclo ativo da célula, com exceção de G<sub>0</sub> e início de G<sub>1</sub><sup>105,106,108,109</sup>.

O Ag Ki-67 tem similaridade com DNA topoisomerase II, enzima considerada como marcadora específica de replicação da célula<sup>109</sup>. Esse antígeno nuclear aparece principalmente no final da fase S e, como marcador de proliferação, é preferível à timidina, bromodeoxiuridina e ao PCNA, pois não está envolvido com reparo celular nem com ploidia<sup>103,105,108,113</sup>.

Evidências qualitativas de que o Ki-67 atua como marcador de proliferação celular podem ser demonstradas pela sua distribuição em tecidos normais. Células do centro germinativo das amídalas, células basais do epitélio e espermatogônias indiferenciadas dos testículos são fortemente marcadas com esse antígeno. Por outro lado, células do fígado, rim e cérebro não aparecem marcadas com o Ki-67, ao passo que sua expressão é bastante acentuada em linfócitos do sangue periférico estimulados a proliferar<sup>104,109</sup>.

Outras fortes evidências atestam que a proteína Ki-67 está relacionada com a proliferação celular. Leri *et al.*<sup>113</sup>, estudando cães com ICC induzida por marca-passo, observaram expressão simultânea do Ki-67 e

da telomerase, a qual é uma enzima que garante a replicação do DNA, uma vez que mantém intactos os telômeros durante a multiplicação celular. Behr *et al.* <sup>111</sup> demonstraram co-expressão de vimentina e Ki-67 em 15% das biópsias analisadas de corações transplantados; o gene da vimentina pertence ao grupo dos genes precoces, o qual só se expressa em miocardiócitos embrionários e é crescimento-dependente. Sua expressão indica a presença de células indiferenciadas e precede a manifestação do Ki-67, uma vez que aparece na transição da fase G<sub>0</sub> para G<sub>1</sub>.

Relatos experimentais já publicados evidenciam que o anticorpo utilizado no presente trabalho é um marcador adequado de células proliferativas em tecidos de caprinos, razão pela qual foi aplicado ao material deste estudo <sup>126,127</sup>.

Quantitativamente, existe uma correlação muito alta entre o número de células que participam do ciclo proliferativo e a quantidade das mesmas que são marcadas com Ki-67 <sup>104,105</sup>.

Dentro da área cardiológica, estudos realizados em indivíduos normais e pacientes com cardiomiopatia dilatada ou submetidos a transplante cardíaco mostram que o Ki-67 se expressa nos corações com doença inflamatória ou imunológica, indicando que os miocardiócitos são capazes de renovar seu DNA em resposta a esses estímulos <sup>110-113</sup>.

A imensa maioria dos trabalhos considera o Ki-67 como um marcador de proliferação celular bastante confiável <sup>104,106,108,109,112,113,127</sup>, embora raros estudos questionem essa capacidade <sup>149</sup>. Segundo Scholzen e Gerdes <sup>108</sup>, a

classificação de uma determinada população celular em proliferativa ou não proliferativa é mais complexa do que pode parecer, visto que, *in vivo*, as células tendem a apresentar uma grande variação de tempos intermitóticos. Os procedimentos habituais para determinar a fração de crescimento celular são baseados em protocolos experimentais que evidenciam o DNA sintetizado durante a fase S; as amostras são analisadas em diferentes tempos e a fração de núcleos marcados (núcleos em mitose) é estimada. Se uma fração considerável das células analisadas tiver tempos intermitóticos que excedam o intervalo de marcação, o resultado obtido pode subestimar a fração de crescimento do tecido estudado. Em seu trabalho sobre a relação da proteína Ki-67 com o ciclo celular, Gerdes *et al.*<sup>105</sup> subdividem a fase G<sub>1</sub> em G<sub>1T</sub>, G<sub>1a</sub> e G<sub>1b</sub>, sendo que a fase G<sub>1T</sub> é aquela de transição de G<sub>0</sub> para G<sub>1</sub>, G<sub>1a</sub> é a fase inicial de G<sub>1</sub> e G<sub>1b</sub> a fase final; neste estudo, células em G<sub>0</sub>, G<sub>1T</sub> e G<sub>1a</sub> foram negativas para Ki-67.

Outro ponto importante a ser considerado é que a positividade para o Ag Ki-67 não significa necessariamente que a célula entrará em divisão: a mesma pode deixar o ciclo ativo e entrar em estado quiescente; também existe a possibilidade de a divisão celular ser interrompida sem interferir imediatamente na marcação pelo Ki-67. Em tais situações, a expressão desse antígeno pode significar que a célula tem capacidade de continuar a proliferação após ser removido o estímulo negativo. Apesar disso, são fortíssimas as evidências de que o Ki-67 está intimamente relacionado com a proliferação celular, tornando adequada sua utilização como marcador específico dessa situação. Tem sido ainda utilizado para estudar o padrão

de crescimento de tumores, seu comportamento frente a drogas e o prognóstico dos pacientes <sup>108</sup>. No contexto do presente estudo, tais características podem ser úteis na análise dos diferentes estímulos utilizados para provocar aumento da massa muscular do VD, indicando qual o treinamento mais eficiente na capacitação dos miocardiócitos para reentrar no ciclo celular.

Pode-se questionar, ainda, se os núcleos marcados pelo Ki- 67, na verdade, não estariam relacionados com células em processo de poliploidia, uma vez que o miocárdio apresenta uma porcentagem considerável de miocardiócitos mono e binucleados e uma menor fração de células tri e tetranucleadas <sup>91,92,150</sup>. Além do fato de o Ki-67 ser considerado um marcador específico para células em proliferação, Olivetti *et al.* <sup>151</sup>, estudando 245 corações humanos (72 normais, 81 com hipertrofia macroscópica e 92 com doença arterial coronariana), com idades entre 26 e 96 anos, demonstraram que a porcentagem de miocardiócitos mono, bi, tri e tetranucleados não varia com a idade nem com a condição de normalidade ou das doenças analisadas. Os miocardiócitos mononucleados correspondem a aproximadamente 77%, os binucleados a 22% e os tri e tetranucleados a menos de 1% do total. Verificaram ainda que, nos corações com hipertrofia macroscópica, o aumento do volume dos miocardiócitos foi menor que o aumento da massa muscular, indicando proliferação de células.

Mesmo sendo amplamente utilizada em pesquisas como indicadora de células em proliferação, a função dessa imensa proteína ainda permanece desconhecida <sup>108</sup>. Sabe-se que ela faz parte do componente

fibrilar denso do nucléolo, o qual sofre profundas alterações morfológicas e funcionais durante o ciclo celular. Como o Ag Ki-67 não se expressa em células quiescentes, conclui-se que não seja essencial para a formação dos ribossomos, mas supõe-se que atue como um fator de eficiência e de melhora na síntese de RNAr, facilitando o crescimento celular rápido antes da proliferação<sup>152,153</sup>.

## **5.4 Estudo da proliferação celular**

O estudo da proliferação celular foi realizado de duas maneiras: quantificação de células marcadas por campo e por índice. O primeiro método pode induzir a um viés, pois, considerando-se que ocorre hipertrofia, é possível que exista menor número de células numa determinada área de campo microscópico. Entretanto, essa análise foi mantida pensando-se em sua aplicação clínica, uma vez que as amostras para biópsia possuem tamanho bastante reduzido e nem sempre é possível obter 2000 células para contagem por índice.

### **5.4.1 MIOCARDIÓCITOS**

Quanto à análise histológica quantitativa do índice de células cardíacas marcadas, os animais do grupo controle apresentaram diferença significativa no número de células positivas para Ki-67, quando comparados o VD e o VE, com valores estatisticamente maiores para o segundo. Entretanto, o número de miocardiócitos marcados no VD dos grupos

estimulados foi significativamente maior do que no VE e S dos mesmos grupos, indicando que a sobrecarga de pressão induz a um expressivo aumento da proliferação celular, mesmo em animais que já ultrapassaram o período neonatal, em ambos os tipos de treinamento.

A quantificação por campo também mostrou que os VDs dos grupos EC e EI possuem maior número de miocardiócitos positivos, quando comparados aos respectivos VEs. Nesses animais treinados, o VD e S apresentaram valores similares, sendo que o último segmento evidenciou mais hiperplasia que o VE; nos controles, o VD aparece com os menores valores, seguido do VE e S. Comparando-se os três grupos, observou-se que o VD dos grupos EC e EI possui valores maiores que o VD do grupo C; entre os cabritos treinados, o grupo EC apresentou valores maiores que o grupo EI em todos os segmentos estudados. Em relação a esse último dado, alguns aspectos interessantes devem ser levados em conta: os grupos EC e EI não apresentaram diferença no grau de hipertrofia dos miocardiócitos e de seus respectivos núcleos, o que, somado ao fato de que a proliferação de células contráteis foi maior nos animais treinados continuamente, pode levar, à primeira vista, à interpretação de que o estímulo contínuo mostrou-se mais eficiente do que intermitente. Entretanto, deve-se considerar que o miocárdio não se constitui apenas por miocardiócitos: existem também os elementos não contráteis, os quais podem ter sofrido expansão maior no grupo EI, levando à contagem de um menor número de miócitos por campo; além disso, nesse último grupo, o tempo total de bandagem foi metade daquele imposto ao grupo EC. Talvez um maior tempo de treinamento intermitente

possa induzir um aumento significativo de miocardiócitos em proliferação, como aconteceu no treinamento contínuo. Vale a pena lembrar ainda que, na prática, após o período de treinamento, faz-se a cirurgia de Jatene e o ventrículo subpulmonar será permanentemente submetido à resistência da circulação sistêmica e que, portanto, o estímulo proliferativo talvez continue atuando até um provável equilíbrio. Dessa forma, não é possível deduzir, a partir de um experimento como o presente, se o resultado final de cada tipo de treinamento, após a cirurgia definitiva, será distinto.

#### **5.4.2 CÉLULAS DO INTERSTÍCIO E VASOS**

Quando analisadas as células do interstício e dos vasos marcadas com Ki-67 por índice e por campo, constatou-se diferença significativa no VD de ambos os grupos estimulados em relação aos respectivos VEs, bem como em relação ao VD do grupo controle. Comparando o VD dos grupos estimulados, não houve diferença estatística no número de células em proliferação; porém, esse segmento superou o VE e o septo nessa variável. No grupo controle, todos os segmentos miocárdicos (VD, VE e septo) comportaram-se da mesma forma em ambas as análises. Tais dados mostram que, também para as células do interstício e dos vasos, tanto o preparo contínuo quanto o intermitente foram eficientes em aumentar a hiperplasia celular durante o tempo de treinamento. Na análise por índice, também houve significância estatística entre o septo direito dos grupos treinados, quando comparado com o VE e SE dos mesmos grupos; não houve diferença entre o VE e a metade esquerda do septo. Feigenbaum<sup>154</sup>,

já havia descrito a presença de uma linha hiperecogênica dividindo os dois lados do septo interventricular. Boettler *et al.*<sup>155</sup>, estudando o coração de 30 indivíduos normais, demonstraram, por meio do ecocardiograma, que essa linha provavelmente representa a divisão do septo em duas metades (direita e esquerda). O lado esquerdo é mais espesso e apresenta maior deformação radial que o direito; a linha brilhante referir-se-ia à mudança abrupta na orientação das fibras musculares e à presença das artérias coronárias. O resultado do presente estudo sugere que existe diferença entre os dois lados do septo interventricular, de maneira que o aumento da pós- carga do VD reflete- se na metade direita do septo.

#### **5.4.3 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE PROLIFERAÇÃO CELULAR**

Embora, à primeira vista, se possa admitir que seja desejável que a hiperplasia do ventrículo em preparo ocorra principalmente às custas dos miocardiócitos, para que essa câmara apresente acréscimo efetivo em sua força contrátil e possa suportar pressões maiores, isso pode não ser correto. Não se deve esquecer que o incremento do número de células contráteis aumentará também a demanda por nutrientes e oxigênio do miocárdio e que, dessa forma, será imperioso o acréscimo de vasos sangüíneos para manutenção das células proliferadas<sup>83,100</sup>. É desejável que haja um equilíbrio entre a proliferação de miocardiócitos e de capilares a fim de que o preparo possa ser considerado capaz de sustentar as solicitações da circulação sistêmica<sup>156,157</sup>. Anversa *et al.*<sup>83</sup> submeteram ratos Wistar-Kyoto

com cinco semanas de idade a um treinamento intermitente: corridas de uma hora por dia, cinco dias por semana, durante sete semanas. Ao final do experimento, encontraram aumento de 16% no número de capilares por  $\text{mm}^2$ , indicando que houve proliferação dessas células nesse modelo mais fisiológico de treinamento.

Nos preparados de imuno-histoquímica, não é tarefa fácil distinguir entre células intersticiais (fibroblastos em sua maioria) e células endoteliais de capilares, pois os últimos nem sempre se encontram abertos. Logo, não se pode, no presente estudo, afirmar se as células do interstício/vasos são predominantemente endoteliais ou fibroblastos. No primeiro caso, esse incremento seria um fator positivo (aumento de vascularização). Já no segundo, a conseqüência seria proliferação exagerada de fibroblastos e deposição de fibrose. Como foi discutido anteriormente, a análise da porcentagem de fibrose do VD pelo método de Picro-sirius vermelho não mostrou diferença significativa entre os três grupos. Talvez estudos com dupla marcação imuno-histoquímica (para endotélio e células em proliferação) possam, no futuro, esclarecer essa questão.

Quanto à proporção entre miocardiócitos e células do interstício e vasos do VD marcadas pelo Ki-67, não houve significância estatística entre os três grupos. Aparentemente, portanto, os dois regimes de preparo induzem a um crescimento numérico proporcionalmente igual de elementos contráteis e não contráteis.

Tem-se demonstrado que o coração adulto encontra-se apto a sofrer proliferação dos miocardiócitos em condições normais ou patológicas,

existindo uma subpopulação celular indiferenciada. Não se sabe ainda se essas células-tronco são provenientes do próprio coração ou se são migrantes de outros órgãos <sup>158</sup>. As pesquisas realizadas, principalmente em corações com cardiomiopatia dilatada <sup>158,159</sup> e infarto do miocárdio <sup>160</sup>, também verificaram que essa capacidade de replicação vem acompanhada de apoptose <sup>161</sup>. Nesse processo, o DNA nuclear é degradado de modo específico, com consumo de energia <sup>114,162,163</sup>. A morte dos miocardiócitos via apoptose está presente na cardiogênese <sup>163,164</sup> e também em doenças, como displasia arritmogênica ventricular <sup>163</sup> e ICC progressiva <sup>114,159,161</sup>.

Também o miocárdio hibernante crônico apresenta uma série de alterações observadas nos miocardiócitos indiferenciados de embriões e fetos. Dispersyn *et al.* <sup>162</sup>, estudando esses corações doentes, colocam a hipótese de que, no miocárdio hibernante, os miócitos podem ativar um “programa fetal”, retornando ao estágio indiferenciado, o que possibilitaria a essas células sobreviverem em condições reduzidas de oxigênio, retornando ao estado diferenciado após a restauração do suprimento sanguíneo (revascularização cardíaca). Dessa forma, os miocardiócitos não diferenciados não terminariam em apoptose, o que pode estar relacionado com a proteção miocárdica presente na hibernação. Considerando a possibilidade desse processo de retorno a um padrão embriogênico, as células cardíacas contráteis estariam aptas a sofrer hiperplasia, mesmo após o período neonatal.

Zorc *et al.* <sup>158</sup>, estudando marcadores de proliferação celular (Ki- 67 e PCNA), de apoptose (TUNEL e bcl- 2, sendo que o último é um anticorpo

que inibe a apoptose) e índices morfométricos (volume das miofibrilas e densidade do tecido intersticial) de pacientes com cardiomiopatia dilatada, classificaram a doença em duas formas:

- progressiva: alta porcentagem de miocardiócitos marcados pelo TUNEL, menor expressão do bcl- 2, baixa porcentagem de miocardiócitos marcados pelo Ki-67 e PCNA, baixo volume das miofibrilas e alta densidade de tecido intersticial;
- não-progressiva: marcação de miocardiócitos baixa pelo TUNEL e alta pelo Ki-67 e PCNA, maior expressão de bcl- 2, alto volume de miofibrilas e pouca densidade de tecido intersticial.

Sarkar *et al.* <sup>114</sup>, trabalhando com ratos de linhagem selvagem e geneticamente hipertensos, observaram que os ratos hipertensos adultos que evoluíram para ICC apresentaram simultaneamente apoptose e proliferação dos miocardiócitos, sendo que a morte celular programada teve expressão mais significativa do que a replicação celular.

Esses estudos sugerem que a homeostase tecidual depende do equilíbrio entre proliferação, diferenciação e apoptose de modo que, sob estresse significativo, a apoptose se sobressairia em relação à divisão celular <sup>114,159</sup>. Parece que uma das funções da proteína Ki-67 é promover a ligação da cromatina à matriz nuclear durante a proliferação; as pesquisas também sugerem que essa proteína é fundamental para a replicação do DNA e que tem a capacidade de se ligar ao ácido nucléico *in vitro*. Supõe-se que uma maior demanda por DNA viria acompanhada de um aumento no

Ki-67 ligado ao ácido nucléico; tal competição pelo sítio de ligação no DNA faria com que a cromatina ligada à matriz nuclear fosse liberada no nucleoplasma, causando ruptura nuclear e, eventualmente, apoptose<sup>152</sup>. A associação entre apoptose e proliferação celular tem implicações importantes quando se objetiva preparar um ventrículo para suportar pressões sistêmicas, dado que o desejável é que ocorra proliferação das células contráteis e que, ao mesmo tempo, as mesmas consigam manter-se ativas e preservadas. Do ponto de vista terapêutico, miocardiócitos proliferando a uma taxa de 0,05 a 0,1% já seriam suficientes para aumentar significativamente o número de células contráteis ao longo de alguns meses, desde que tal crescimento ocorra de forma sustentada, ou seja, sem ser sobrepujado por morte celular<sup>103,112</sup>. No presente estudo, os grupos treinados apresentaram índices de 1,13% (grupo EC) e de 0,68% (grupo EI).

Outro fator importante a ser analisado futuramente é a quantificação dos capilares nos três grupos estudados por meio de marcação imuno-histoquímica. O tipo de treinamento que apresentar o melhor equilíbrio entre proliferação de células contráteis e de vasos sanguíneos, além da menor taxa de apoptose, poderá ser classificado, com mais propriedade, como sendo aquele mais adequado na correção da TGA em duas etapas.

## 5.5 Limitações do estudo

A principal limitação deste trabalho é o fato de que existem distinções entre os ventrículos direito e esquerdo no que diz respeito à anatomia e fisiologia.

Anatomicamente, o VD apresenta forma irregularmente cônica e o VE é mais ovóide; a valva atrioventricular esquerda e a aorta apresentam continuidade, enquanto as valvas tricúspide e pulmonar são separadas pela crista supraventricular. As diferenças fisiológicas estão relacionadas com as morfológicas e são determinadas principalmente pelas pressões às quais cada ventrículo está conectado, o que, por sua vez, dita também a diferença na espessura das paredes<sup>6,7</sup>.

Assumir que o ventrículo pulmonar é simplesmente aquele que trabalha com regime de pressões mais baixas não é correto, pois as particularidades de cada um deles determinam seu comportamento ao longo da vida do indivíduo. Um exemplo bastante adequado dentro desse contexto são os pacientes com transposição corrigida das grandes artérias: o defeito anatômico correspondente às discordâncias atrioventricular e ventrículo-arterial faz com que, fisiologicamente, a circulação comporte-se de maneira normal. Apesar disto, uma parcela desses doentes morrem entre a terceira e quinta décadas de vida devido à falência do VD, que, apesar de apresentar-se hipertrofiado, não consegue se manter como ventrículo sistêmico<sup>6</sup>. Entretanto, mesmo tendo ciência da relevância de tal fato, optou-se por realizar o experimento em animais hípidos, uma vez que a alteração

cirúrgica da concordância ventrículo- arterial acarretaria alta porcentagem de mortalidade, inviabilizando a pesquisa <sup>78</sup>.

Outra restrição que deve ser considerada é aquela que se refere ao tempo de treinamento dos dois grupos: os animais preparados continuamente o foram por 96 horas, ao passo que aqueles do grupo El tiveram um tempo de preparo reduzido pela metade (48 horas). Essa discrepância pode ser responsável pelos resultados encontrados; porém, neste trabalho, a intenção foi a de analisar o comportamento dos ventrículos submetidos ao preparo rápido, totalizando uma semana de estudo. O objetivo final desta linha de pesquisa é obter os melhores resultados no menor tempo possível, visando a aplicação clínica. Contudo, trata-se de uma dúvida que pode ser dirimida numa próxima investigação, onde o tempo de preparo intermitente seja expandido para 96 horas.

## **5.6 Perspectivas futuras**

Estudos crônicos para conhecer o que ocorre com os miocardiócitos do ventrículo treinado ao longo do tempo em relação à morte celular programada serão de grande valia para determinar a aplicabilidade clínica desse tipo de procedimento. Igualmente importante é a análise da concentração dos capilares nos grupos estimulados, a fim de se conhecer o comportamento vascular nos dois modelos de preparo. A análise do tecido colhido neste experimento poderá ser efetuada posteriormente, com vistas à

detecção de apoptose e de aumento na densidade capilar na fase inicial de estimulação.

Em relação ao treinamento intermitente, duas questões chamam a atenção: o que aconteceria se o tempo de preparo fosse igual aquele aplicado ao grupo de estimulação contínua (96 horas) e, no caso das crianças submetidas à correção em duas etapas, como seria a evolução, uma vez que o aumento descontinuado na pós-carga se transformaria em contínuo após a conexão da aorta ao ventrículo morfologicamente esquerdo.

Os achados do presente estudo abrem um leque de possibilidades não só para os pacientes que perderam a chance da cirurgia de Jatene em uma só etapa, mas também para aqueles submetidos à correção no plano atrial e cujo ventrículo sistêmico entrou em falência com o passar do tempo.

## **6. Conclusões**

---

À luz dos resultados obtidos para o ventrículo pulmonar submetido à sobrecarga de pressão por meio de bandagem ajustável do tronco pulmonar, nas condições de tempo e regime de treinamento do presente trabalho, pode-se concluir que:

1. Tanto hipertrofia como hiperplasia celular são mecanismos presentes na adaptação do miocárdio à sobrecarga de pressão
2. Comparando os tipos de estimulação (contínua e intermitente), pode-se afirmar que:
  - a) ambos foram eficientes em proporcionar aquisição de massa ventricular direita;
  - b) nenhum deles proporcionou aumento significativo da fração de área ocupada por colágeno miocárdico intersticial;
  - c) ambos induziram significativa hipertrofia de miocardiócitos;
  - d) ambos induziram hiperplasia de miocardiócitos e de células do interstício e vasos, quando comparados os ventrículos treinados com os outros segmentos do coração.

## **7. Anexos**

---

**Anexo 1:** Valores de média, erro padrão, mediana, mínimo e máximo da variável **número de miocardiócitos Ki-67+/campo**, segundo o grupo de estudo, nos segmentos S, SD e SE.

Grupo	Segmento	N	Média	EP	Mediana	Mínimo	Máximo
C	S	7	2,34	1,29	0,82	0,28	9,85
	SD	7	2,23	1,11	0,87	0,37	8,57
	SE	7	2,46	1,48	0,77	0,20	11,13
EC	S	7	2,70	0,57	2,32	1,58	5,95
	SD	7	2,96	0,91	2,13	1,63	8,40
	SE	7	2,43	0,34	2,20	1,20	3,63
EI	S	7	1,26	0,20	1,48	0,50	1,77
	SD	7	1,41	0,31	1,57	0,37	2,30
	SE	7	1,12	0,14	1,10	0,63	1,83

**Anexo 2:** Valores de média, erro padrão, mediana, mínimo e máximo da variável **número de miocardiócitos Ki-67+/campo**, segundo o grupo de estudo, nos segmentos VD, VE e S.

Grupo	Segmento	N	Média	EP	Mediana	Mínimo	Máximo
C	VD	7	0,70	0,37	0,28	0,17	2,90
	VE	7	1,27	0,64	0,78	0,23	4,97
	S	7	2,34	1,29	0,82	0,28	9,85
EC	VD	7	3,75	0,77	3,02	1,45	6,30
	VE	7	1,17	0,24	1,28	0,15	1,80
	S	7	2,70	0,57	2,32	1,58	5,95
EI	VD	7	1,53	0,39	1,10	0,40	3,18
	VE	7	0,59	0,07	0,57	0,38	0,90
	S	7	1,26	0,20	1,48	0,50	1,77

**Anexo 3:** Valores de média, erro padrão, mediana, mínimo e máximo da variável **número de células do interstício e vasos (I/ V) positivas para Ki-67/campo**, segundo o grupo de estudo, nos segmentos S, SD e SE.

Grupo	Segmento	N	Média	EP	Mediana	Mínimo	Máximo
C	S	7	1,47	0,82	0,72	0,30	6,37
	SD	7	1,81	1,15	0,63	0,27	8,63
	SE	7	1,14	0,51	0,77	0,33	4,10
EC	S	7	6,74	1,57	6,15	2,67	14,08
	SD	7	9,94	2,98	7,57	2,30	25,23
	SE	7	3,53	0,69	3,23	1,17	6,43
EI	S	7	3,76	1,18	2,92	0,95	9,70
	SD	7	4,03	1,12	4,27	0,77	9,37
	SE	7	3,50	1,86	1,87	0,63	14,57

**Anexo 4:** Valores de média, erro padrão, mediana, mínimo e máximo da variável **número de células do interstício e vasos (I/ V) positivas para Ki-67/campo**, segundo o grupo de estudo, nos segmentos VD, VE e S.

Grupo	Segmento	N	Média	EP	Mediana	Mínimo	Máximo
C	VD	7	0,84	0,52	0,28	0,17	3,92
	VE	7	0,77	0,37	0,38	0,07	2,93
	S	7	1,47	0,82	0,72	0,30	6,37
EC	VD	7	13,39	2,48	10,23	6,10	24,03
	VE	7	1,75	0,28	1,72	0,63	2,95
	S	7	6,74	1,57	6,15	2,67	14,08
EI	VD	7	12,76	3,03	10,23	0,80	23,00
	VE	7	1,37	0,26	1,48	0,40	2,42
	S	7	3,76	1,18	2,92	0,95	9,70

## **8. Referências**

---

1. Friedman WF. Diseases of the heart, pericardium, aorta, and pulmonary vascular bed. In: Braunwald E. *Heart Disease. A Textbook of Cardiovascular Medicine*. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1992, Cap 31, p.887-965.
2. Bustamante LN. Cardiopatias congênitas cianogênicas. In: Ramires JAF. *Cardiologia em Pediatria*. 1<sup>a</sup> ed. São Paulo: Rocca; 2000. cap. 12, p.287-329.
3. Ho SY, Baker EJ, Rigby ML, Anderson RH. Transposição completa. In: Ho SY, Baker EJ, Rigby ML, Anderson RH. *Atlas Colorido de Cardiopatias Congênitas*. Rio de Janeiro: Revinter; 1998. cap. 13, p.135-44.
4. Anversa P, Olivetti G, Loud AV. Morphometric study of early postnatal development in the left and right ventricular myocardium of the rat. I. Hypertrophy, hyperplasia, and binucleation of myocytes. *Circ Res*. 1980;46:495-502.
5. Assad RS. Cirurgia cardíaca fetal: uma realidade dos anos 90? *Arq Bras Cardiol*. 1991; 56:425-7.
6. Kvasnicka J, Vokrouhlicky L. Heterogeneity of the myocardium. Function of the left and right ventricle under normal and pathological conditions. *Physiol Res*. 1991; 40:31-7.
7. Weber KT, Janicki JS, Shroff SG et al. The right ventricle: physiologic and pathophysiologic considerations. *Crit Care Med*. 1983; 11(5): 323-8.

8. Snider AR, Serwer GA, Ritter SB. Abnormalities of ventriculoarterial connection. In: *Echocardiography in pediatric heart disease*. 2<sup>nd</sup> edition. St. Louis, Missouri: Mosby- Year Book; 1997. cap 7, p. 297-342.
9. Rudolph AM. The changes in the circulation after birth. *Circulation*. 1970;41:343-59.
10. Dawes GS. Changes in the circulation at birth. *Brit Med Bull*. 1961; 17 (2): 148-53.
11. Dawes GS, Mott JC, Widdicombe JG, Wyatt DG. Changes in the lungs of the newborn lamb. *J Physiol*. 1963;121:141-62
12. Rudolph AM. Distribution and regulation of blood flow in the fetal and neonatal lamb. *Circ Res*. 1985; 57(6):811-21.
13. Friedman AH, Fahey JT. The transition from fetal to neonatal circulation: normal responses and implications for infants with heart disease. *Seminars in Perinatology*. 1993; 17(2):106-21.
14. Harreveld A, Russel FE. Postnatal development of a left- right atrial pressure gradient. *Am J Physiol*. 1956; 521-4.
15. Alenick DS, Holzman IR, Ritter SB. The neonatal transitional circulation: a combined noninvasive assessment. *Echocardiography*. 1992; 9(1):29-37.
16. Walther FJ, Benders MJ, Leighton JO. Early changes in the neonatal circulatory transition. *J Pediatr*. 1993;123:625-32.

17. Randala M, Eronen M, Andersson S, Pohjavuori M, Pesonen E. Pulmonary artery pressure in term and preterm neonates. *Acta Paediatr.* 1996;85:1344-7.
18. Cassin S, Dawes GS, Mott JC, Ross BB, Strang LB. The vascular resistance of the foetal and newly ventilated lung of the lamb. *J Physiol.* 1964;171:61-79.
19. Takenaka K, Waffarn F, Dabestani A, Gardin JM, Henry WL. A pulsed Doppler echocardiographic study of the postnatal changes in pulmonary artery and ascending aortic flow in normal term newborn infants. *Am Heart J.* 1987;113:759-66.
20. Kishkurno S, Takahashi Y, Harada K, Ishida A, Tamura M, Takada G. Postnatal changes in left ventricular volume and contractility in healthy term infants. *Pediatr Cardiol.* 1997;18:91-5.
21. Keen EN. The postnatal development of the human cardiac ventricles. *J Anat.* 1955;89(4):484-502.
22. Lev M, Rimoldi HJA, Paiva R, Arcilla RA. The quantitative anatomy of simple complete transposition. *Am J Cardiol.* 1969;23:409-16.
23. Plauth WH, Nadas AS, Bernhard WF, Fyler DC. Changing hemodynamics in patients with transposition of the great arteries. *Circulation.* 1970;17:131-42.
24. Tynan M. Transposition of the great arteries. Changes in the circulation after birth. *Circulation.* 1972;46:809-14.
25. Baño- Rodrigo A, Quéro- Jiménez M, Moreno- Granado F, Gamallo- Amat C. Wall thickness of ventricular chambers in transposition of the great arteries. *J Thorac Cradiovasc Surg.* 1980;79:592-7.

- 
26. Huhta JC, Edwards WD, Feldt RH, Puga FJ. Left ventricular wall thickness in complete transposition of the great arteries. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1982;84:97-101.
  27. Ilbawi MN, Idriss FS, DeLeon SY, Muster AJ, Gidding SS, Duffy E, Paul MH. Preparation of the left ventricle for anatomical correction in patients with simple transposition of the great arteries. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1987;94:87-94.
  28. Paul MH, Muster AJ, Cole RB, Baffes TG. Palliative management for transposition of the great arteries, 1957-1967. *Ann Thorac Surg.* 1968;6(4):321-9.
  29. Stark J, Tynan MJ, Ashcraft KW, Aberdeen E, Waterston DJ. Obstruction of pulmonary veins and superior vena cava after the Mustard operation for transposition of the great arteries. *Circulation.* 1972;45-46(Suppl I):I-116-I-120.
  30. Mee RBB. Severe right ventricular failure after Mustard or Senning operation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1986;92:385-90.
  31. Graham Jr. TP. Hemodynamic residua and sequelae following intraatrial repair of transposition of the great arteries: a review. *Ped Cardiol.* 1982;2:203-13.
  32. Graham Jr. TP, Atwood GF, Boucek RJ, Boerth RC, Bender Jr. H. Abnormalities of right ventricular function following Mustard's operation for transposition of the great arteries. *Circulation.* 1975;52:678-84.
  33. Okuda H, Nakazawa M, Imai Y, Kurosawa H, Takanashi Y, Hoshino S, Takao A. Comparison of ventricular function after Senning and Jatene procedures for complete transposition of the great arteries. *Am J Cardiol.* 1985;55:530-4.

- 
34. Graham Jr. TP, Parrish MD, Boucek RJ, Boerth RC, Breitwieser JA, Thompson S, Robertson RM, Morgan JR, Friesinger GC. Assessment of ventricular size and function in congenitally corrected transposition of the great arteries. *Am J Cardiol.* 1983;51:244-51.
  35. Morhy SS, Andrade JL, Soares AM, Ribeiro ZV, Wilberg TM, Mathias W Jr., Parga JR, Bustamante LNP, Atik E, Ramires JF. Non-invasive assessment of right ventricular function in the late follow-up of the Senning procedure. *Cardiol Young.* 2005;15:154-9).
  36. El- Said G, Rosenberg HS, Mullins CE, Hallman GL, Cooley DA, McNamara DG. Dysrhythmias after Mustard's operation for transposition of the great arteries. *Am J Cardiol.* 1972;30:526-32.
  37. Freedom RM, Culham JAG, Olley PM, Rowe RD, Williams WG, Trusler GA. Anatomic correction of transposition of the great arteries: pre- and postoperative cardiac catheterization, with angiocardiography in five patients. *Circulation.* 1981;63(4):905-14.
  38. Jatene AD, Fontes VF, Paulista PP, Souza LCB, Neger F, Galantier M, Souza JEMR. Successful anatomic correction of transposition of the great vessels: a preliminary report. *Arq Bras Cardiol.* 1975;28(4):461-4.
  39. Smith A, Wilkinson JL, Arnold R, Dickinson DF, Anderson RH. Growth and development of ventricular walls in complete transposition of the great arteries with intact septum (simple transposition). *Am J Cardiol.* 1982;49:362-8.
  40. Jatene AD, Fontes VF, Souza LCB, Paulista PP, Abdulmassih Neto C, Souza JEMR. Anatomic correction of transposition of the great arteries. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1982;83:20-6.

41. Castaneda AR, Norwood WI, Jonas RA, Colon SD, Sanders SP, Lang P. Transposition of the great arteries and intact ventricular septum: anatomical repair in the neonate. *Ann Thorac Surg.* 1984;38(5):438-43.
42. Quaegebeur JM, Rohmer J, Ottenkamp J, Buis T, Kirklin JW, Blackstone EH, Brom AG. The arterial switch operation. An eight year experience. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1986;92:361-84.
43. Sidi D, Planché C, Kachaner J, Bruniaux J, Villain E, Le Bidois J, Piéchaud JF, Lacour-Gayet F. Anatomic correction of simple transposition of the great arteries in 50 neonates. *Circulation.* 1987;75(2):429-35.
44. Däbritz S, Engelhardt W, von Bernuth G, Messmer BJ. Trial of pulmonary artery banding: a diagnostic criterion for 'one-stage' arterial switch in simple transposition of the great arteries beyond the neonatal period. *Eur J Cardio-Thorac Surg.* 1997;11:112-6.
45. Danford DA, Huhta JC, Gutgesell HP. Left ventricular wall stress and thickness in complete transposition of the great arteries. Implications for surgical intervention. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1985;89:610-5.
46. Kramer HH, Scheewe J, Fischer G, Uebing A, Harding P, Schmiel F, Cremer J. Long term follow-up of left ventricular performance and size of the great arteries before and after one- and two-stage arterial switch operation of simple transposition. *Eur J Cardio-thorac Surg.* 2003;24:898-905.
47. Colan SD, Trowitzsch E, Wernovsky G, Sholler GF, Sanders SP, Castaneda AR. Myocardial performance after arterial switch operation for transposition of the great arteries with intact ventricular septum. *Circulation.* 1988;78:132-41.

- 
48. Jatene AD, Fontes VF, Paulista PP, Souza LCB, Neger F, Galantier M, Sousa JEMR. Anatomic correction of transposition of the great vessels. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1976;72(3):364-70.
  49. Maroto E, Fouron JC, Douste- Blazy MY, Carceller AM, van Doesburg N, Kratz, Davignon A. Influence of age on wall thickness, cavity dimensions and myocardial contractility of the left ventricle in simple transposition of the great arteries. *Circulation.* 1983;67(6):1311-7.
  50. Nakazawa M, Oyama K, Imai Y, Nojima K, Aotsuka H, Satomi G, Kurosawa H, Takao A. Criteria for two- staged arterial switch operation for simple transposition of the great arteries. *Circulation.* 1988;78:124-31.
  51. Jonas RA, Giglia TM, Sanders SP, Wernovsky G, Nadal- Ginard B, Mayer JE, Castaneda AR. Rapid, two- stage arterial switch for transposition of the great arteries and intact ventricular septum beyond the neonatal period. *Circulation.* 1989;80(Suppl I):I-203-I-208.
  52. Boutin C, Wernovsky G, Sanders SP, Jonas RA, Castaneda AR, Colan SD. Rapid two- stage arterial switch operation. Evaluation of left ventricular systolic mechanics late after an acute pressure overload stimulus in infancy. *Circulation.* 1994;90:1294-1303.
  53. Yacoub MH, Radley- Smith R, MacLaurin R. Two- stage operation for anatomical correction of transposition of the great arteries with intact interventricular septum. *The Lancet.* 1977;June 18:1275-8.
  54. Muller WH Jr e Dammann JF Jr. The treatment of certain congenital malformations of the heart by creation of pulmonic stenosis to reduce pulmonary hypertension and excessive pulmonary blood flow. *Surg Gynecol Obstet.* 1952;95:213-9.

- 
55. Takahashi M, Lurie PR, Petry EL, King H. Clinical and hemodynamic effects of pulmonary artery banding. *Am J Cardiol.* 1968;21:174-84.
  56. Yacoub M, Bernhard A, Lange P, Radley-Smith R, Keck E, Stephan E, Heintzen P. Clinical and hemodynamic results of two-stage anatomic correction of simple transposition of the great arteries. *Circulation.* 1980;62(Suppl I):I-190-I-196.
  57. Takahashi Y, Nakano S, Shimazaki Y, Kadoba K, Taniguchi K, Sano T, Nakada T, Tsuchitani Y, Miyamoto K, Matsuda H, Kawashima Y. Echocardiographic comparison of postoperative left ventricular contractile state between one- and two-stage arterial switch operation for simple transposition of the great arteries. *Circulation.* 1991;84(Suppl III):III-180-III-186.
  58. Bing OHL, Matsushita S, Fanburg BL, Levine HJ. Mechanical properties of rat cardiac muscle during experimental hypertrophy. *Circ Res.* 1971;28:234-45.
  59. Simon H, Krayenbuehl HP, Rutishauser W, Preter BO. The contractile state of the hypertrophied left ventricular myocardium in aortic stenosis. *Am Heart J.* 1970;79(5):587-602.
  60. Hon JKF, Steendijk P, Khan H, Wong K, Yacoub M. Acute effects of pulmonary artery banding in sheep on right ventricle pressure-volume relations: relevance to the arterial switch operation. *Acta Physiol Scand.* 2001;172:97-106.
  61. Vince DJ, Culham JAG. A prosthesis for banding the main pulmonary artery, capable of serial dilatation by balloon angioplasty. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1989;97:421-7.

- 
62. Epstein ML, Duncan D, Kanter RJ, O' Brien DJ, Alexander JA. Feasibility of reversible pulmonary artery banding: early results and intermediate- term follow- up. *Ann Thorac Surg.* 1990;50:94-7.
  63. Solis E, Heck CF, Seward JB, Kaye MP. Percutaneously adjustable pulmonary artery band. *Ann Thorac Surg.* 1986;41:65-9.
  64. Lange PE, Nürnberg JH, Sievers HH, Onnasch DGW, Bernhard A, Heintzen PH. Response of the right ventricle to progressive pressure loading in pigs. *Basic Res Cardiol.* 1985;80:436-44.
  65. Muraoka R, Yokota M, Aoshima M, Nomoto S, Kyoku I, Kobayashi A, Nakano H, Ueda K, Saito A. Extrathoracically adjustable pulmonary artery banding. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1983;86:582-6.
  66. Lange PE, Sievers HH, Nürnberg JH, Engler K, Pilarczyk J, Onnasch DGW, Bernhard A, Heintzen PH. A new device for slow progressive narrowing of vessels. *Basic Res Cardiol.* 1985;80:430-5.
  67. Morkin E, Ashford TP. Myocardial DNA synthesis in experimental cardiac hypertrophy. *Am J Physiol.* 1968;215(6):1409-13.
  68. Nair KG, Cutilletta AF, Zak R, Koide T, Rabinowitz M. Biochemical correlates of cardiac hypertrophy. I. Experimental model; changes in heart weight, RNA content, and nuclear polymerase activity. *Circ Res.* 1968;23:451-62.
  69. Koide T, Rabinowitz M. Biochemical correlates of cardiac hypertrophy. II. Increased rate of RNA synthesis in experimental cardiac hypertrophy in the rat. *Circ Res.* 1969;24:9-18.

70. Grove D, Zak R, Nair KG, Aschenbrenner V. Biochemical correlates of cardiac hypertrophy. IV. Observations on the cellular organization of growth during myocardial hypertrophy in the rat. *Circ Res*. 1969;25:473-85.
71. Boutin C, Jonas RA, Sanders SP, Wernovsky G, Mone SM, Colan SD. Rapid two- stage arterial switch operation. Acquisition of left ventricular mass after pulmonary artery banding in infants with transposition of the great arteries. *Circulation*. 1994;90:1304-9.
72. Iyer KS, Sharma R, Kumar K, Bhan A, Kothari SS, Saxena A, Venugopal P. Serial echocardiographic for decision making in rapid two- stage arterial switch operation. *Ann Thorac Surg*. 1995;60:658-64.
73. Lacour- Gayet F, Piot D, Zoghbi J, Serraf A, Gruber P, Macé L, Touchot, Planché C. Surgical management and indication of left ventricular retraining in arterial switch for transposition of the great arteries with intact ventricular septum. *Eur J Cardio- thorac Surg*. 2001;20:824-29.
74. Assad RS, Cardarelli M, Abduch MC, Aiello VD, Maizato M, Barbero- Marcial M, Jatene A. Reversible pulmonary artery banding with a balloon catheter; assessment of rapid pulmonary ventricular hypertrophy. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2000;120:66-72.
75. Bishop SP e Cole CR. Production of externally controlled progressive pulmonic stenosis in the dog. *J Appl Physiol*. 1969;26(5):659-63.
76. Katayama H, Krzeski R, Frantz EG, Ferreiro JI, Lucas CL, Ha B, Henry GW. Induction of right ventricular hypertrophy with obstructing balloon catheter. *Circulation*. 1993;88(4 Pt 1):1765-69.

- 
77. Dias CA, Assad RS, Caneo LF, Abduch MCD, Aiello VD, Dias AR, Barbero- Marcial M, Oliveira SA. Reversible pulmonary trunk banding II. An experimental model for rapid pulmonary ventricular hypertrophy. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2002;124(5):999-1006.
  78. Canêo LF, Dias CA, Assad RS, Abduch MCD, Aiello VD, Moreira LFP, Lourenço Filho DD, Stolf NAG. Preparo do ventrículo subpulmonar através de dois diferentes modelos ajustáveis de bandagem do tronco pulmonar: estudo experimental. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2001;16(1):35-48.
  79. Taquini AC, Feroso JD, Aramendia P. Behavior of the right ventricle following acute constriction of the pulmonary artery. *Circ Res.* 1960;8:315-8.
  80. Di Donato RM, Fujii AM, Jonas RA, Castañeda AR. Age- dependent ventricular response to pressure overload. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1992;104:713-22.
  81. Mehmehl HC, Mazzoni S, Krayenbuehl HP. Contractility of the hypertrophied human left ventricle in chronic pressure and volume overload. *Am Heart J.* 1975;90(2):236-40.
  82. DeMaria AN, Neumann A, Lee G, Fowler W, Mason DT. Alterations in ventricular mass and performance induced by exercise training in man evaluated by echocardiography. *Circulation.* 1978;57(2):237-44.
  83. Anversa P, Levicky V, Beghi C, McDonald SL, Kikkawa Y. Morphometry of exercise- induced right ventricular hypertrophy in the rat. *Circ Res.* 1983;52:57-64.

- 
84. Le Bret E, Lupoglazoff JM, Borenstein N, Fromont G, Laborde F, Bachet J, Vouhé P. Cardiac “fitness” training: an experimental comparative study of three methods of pulmonary artery banding for ventricular training. *Ann Thorac Surg.* 2005;79:198-203.
  85. Dowell RT e McManus RE. Pressure- induced cardiac enlargement in neonatal and adult rats. *Circ Res.* 1978;42(3):303-310.
  86. Korecky B e Rakusan K. Normal and hypertrophic growth of the rat heart: changes in cell dimensions and number. *Am J Physiol.* 1978;234(2):H123-H128.
  87. Soonpaa MH e Field LJ. Assessment of cardiomyocytes DNA synthesis during hypertrophy in adult mice. *Am J Physiol.* 1994;266(35):H1439-H1445.
  88. Anversa P e Kajstura J. Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ Res* 1998;83:1-14.
  89. Korecky B e French IW. Nucleic acid synthesis in enlarged hearts of rats with nutritional anemia. *Circ Res.* 1967;21:635-40.
  90. Overy HR e Priest RE. Mitotic cell division in postnatal cardiac growth. *Lab Invest.* 1966;15(6):1100-3.
  91. Neffgen JF e Korecky B. Cellular hyperplasia and hypertrophy in cardiomegalies induced by anemia in young and adult rats. *Circ Res.* 1972;30:104-13.
  92. Anversa P, Fitzpatrick D, Argani S, Capasso JM. Myocyte mitotic division in the aging mammalian rat heart. *Circ Res.* 1991;69:1159-64.

- 
93. Reiss K, Cheng W, Kajstura J, Sonnenblick EH, Meggs LG, Anversa P. Fibroblast proliferation during myocardial development in rats is regulated by IGF- 1 receptors. *Am J Physiol*. 1995;269:H943-H951.
  94. Cheng W, Reiss K, Kajstura J, Kowal K, Quaini F, Anversa P. Down-regulation of the IGF- 1 system parallels the attenuation in the proliferative capacity of rat ventricular myocytes during postnatal development. *Lab Invest*. 1995;72(6):646-55.
  95. Quaini F, Cigola E, Lagrasta C, Sacconi G, Quaini E, Rossi C, Olivetti G, Anversa P. End- stage cardiac failure in humans coupled with the induction of proliferating cell nuclear antigen and nuclear mitotic division in ventricular myocytes. *Circ Res*. 1994;75:1050-63.
  96. Liu Y, Cigola E, Cheng W, Kajstura J, Olivetti G, Hintze T, Anversa P. Myocyte nuclear mitotic division and programmed myocyte cell death characterize the cardiac myopathy induced by rapid ventricular pacing in dogs. *Lab Invest*. 1995;73(6):771-87.
  97. Reiss K, Kajstura J, Zhang X, Li P, Szoke E, Olivetti G, Anversa P. Acute myocardial infarction leads to upregulation of the IGF- 1 autocrine system, DNA replication, and nuclear mitotic division in the remaining viable cardiac myocytes. *Exp Cell Res*. 1994;213:463-72.
  98. Mann JM, Jennison SH, Moss E, Davies MJ. Assessment of rejection in orthotopic human heart transplantation using proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as an index of cell proliferation. *J Pathol*. 1992;167:385-9.
  99. Kajstura J, Leri A, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Anversa P. Myocyte proliferation in end- stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci*. 1998;95:8801-5.

- 
100. Anversa P, Ricci R, Olivetti G. Quantitative structural analysis of the myocardium during physiologic growth and induced cardiac hypertrophy: a review. *J Am Coll Cardiol*. 1986;7:1140-9.
  101. Olivetti G, Ricci R, Lagrasta C, Maniga E, Sonnenblick EH, Anversa P. Cellular basis of wall remodeling in long- term pressure overload-induced right ventricular hypertrophy in rats. *Circ Res*. 1988;63:648-57.
  102. Borow KM, Arensman FW, Webb C, Radley- Smith R, Yacoub MH. Assessment of left ventricular contractile state after anatomic correction of transposition of the great arteries. *Circulation*. 1984;69:106-12.
  103. Soonpaa MH, Field LJ. Survey of studies examining mammalian cardiomyocytes DNA synthesis. *Circ Res*. 1998;83:15-26.
  104. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 1983;31:13-20.
  105. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation- associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki- 67. *J Immunol*. 1984;133(4):1710-5.
  106. Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of cell proliferation- associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki- 67. *Am J Pathol*. 1991;138(4):867-73.

- 
107. Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MHG, Key G, Flad HD, Gerdes J. The cell proliferation- associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle- maintaining proteins. *J Cell Biol.* 1993;123:513-22.
  108. Scholzen T e Gerdes J. The Ki- 67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000;182:311-22.
  109. Brown DC e Gatter KC. Monoclonal antibody Ki- 67: its use in histopathology. *Histopathology.* 1990;17:489-503.
  110. Arbustini E, Diegoli M, Grasso M, Fasani R, D' Armini A, Martinelli L, Goggi C, Campana C, Gavazzi A, Vigano M. Expression of proliferating cell markers in normal and diseased human hearts. *Am J Cardiol.* 1993;72:608-14.
  111. Behr TM, Spes CH, Pongratz DE, Weiss M, Meiser B, Überfuhr P, Theisen K, Angermann C. Adult human cardiomyocytes Coexpress Vimetin and Ki67 in heart transplant rejection and in dilated cardiomyopathy. *J Heart Lung Transplant.* 1998;17:795-800.
  112. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, Nadal- Ginard B, Silvestri F, Leri A, Beltrami CA, Anversa P. Evidence that human myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2001;344(23):1750-7.
  113. Leri A, Barlucchi L, Limana F, Deptala A, Darzynkiewicz Z, Hintze TH, Kajstura J, Nadal- Ginard B, Anversa P. Telomerase expression and activity are coupled with myocyte proliferation and preservation of telomeric length in the failing heart. *Proc Natl Acad Sci.* 2001;98(15):8626-31.

- 
- 114.** Sarkar S, Chawla- Sarkar M, Young D, Nishiyama K, Rayborn ME, Hollyfield JG, Sen S. Myocardial cell death and regeneration during progression of cardiac hypertrophy to heart failure. *J Biol Chem.* 2004;279(50):52630-42.
- 115.** van Suylen RJ, van Bekkum EEC, Boersma H, de Kok LB, Balk AHMM, Bos E, Bosman FT. Collagen content and distribution in the normal and transplanted human heart: a postmortem quantitative light microscopic analysis. *Cardiovasc Pathol.* 1996;5:61-8.
- 116.** Perdigão C. Fibrose miocárdica – fundamentos teóricos, aspectos clínicos e implicações terapêuticas. *Rev Port Cardiol.* 1993;12(7-8):675-85.
- 117.** Weber KT. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol.* 1989;13(7):1637-52.
- 118.** Fuster V, Danielson MA, Robb RA, Broadbent JC, Brown Jr. AL, Elveback LR. Quantitation of left ventricular myocardial fiber hypertrophy and interstitial tissue in human hearts with chronically increased volume and pressure overload. *Circulation.* 1977;55(3):504-8.
- 119.** Clark JD, Gebhart GF, Gonder JC, Keeling ME, Kohn DF. Special report. The 1996 guide for the care and use of laboratory animals. *ILAR J.* 1997;38(1):41-8.
- 120.** Picard MH. M- mode echocardiography: principles and examination techniques. In: Weyman AE. *Principles and Practice of Echocardiography*. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1994, Cap 14, p.282-301.

- 
- 121.** Vuille C, Weyman A. Left ventricle I: general considerations, assessment of chamber size and function. In: Weyman AE. *Principles and Practice of Echocardiography* . 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1994, Cap 20, p.575-624.
- 122.** Pontes SC Jr, Assef JE, Barretto RB, Chacur P, Moreira DA, Nina VJS, Nunes F, Melani RH, Correia EB, Dinkuisen J, Sousa AM. Estimation of right ventricular mass by two-dimensional echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr*. 2005;18(5):427-34.
- 123.** Fulton RM, Hutchinson EC, Jones M. Ventricular weight in cardiac hypertrophy. *Br Heart J*. 1952;4:13-20.
- 124.** Binotto MA, Higuchi ML, Aiello VD. Left ventricular remodeling in hearts with tricuspid atresia: morphologic observations and possible basis for ventricular dysfunction after surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003;126(4):1026-32.
- 125.** Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*. 1981;29(4):577-80.
- 126.** de Louw AJA, Vles HSH, Freling G, Herpers MJHM, Arends JW, van Kleef M. The morphological effects of a radio frequency lesion adjacent to the dorsal root ganglion (RF- DRG) – an experimental study in the goat. *Eur J Pain*. 2001;5:169-74.
- 127.** Flores JM, Sanchez MA, Nieto A, Sanchez B, Gonzalez M, Garcia P. Detection of estrogen alpha and progesterone receptors and cell proliferation in the uterus during early pregnancy in the goat. *Theriogenology*. 2001;56:341-55.

- 
- 128.** Olivetti G, Melissari M, Balbi T, Quaini F, Sonnenblick EH, Anversa P. Myocyte nuclear and possible cellular hyperplasia contribute to ventricular remodeling in the hypertrophic senescent heart in humans. *J Am Coll Cardiol.* 1994;24:140-9.
- 129.** Anversa P, Palackal T, Sonnenblick EH, Olivetti G, Meggs LG, Capasso JM. Myocyte cell loss and myocyte cellular hyperplasia in the hypertrophied aging rat heart. *Circ Res.* 1990;67:871-85.
- 130.** Alison MR. Assessing cellular proliferation: what's worth measuring? *Hum Exp Toxicol.* 1995;14:935-44.
- 131.** Loud AV, Anversa P. Biology of disease. Morphometric analysis of biologic processes. *Lab Invest.* 1984;50(3):250-61.
- 132.** Rosner B. Analysis of variance. In: Rosner B. *Fundamentals of Biostatistics.* 2<sup>nd</sup> ed. Boston: PWS Publishers, 1986, Cap 12, p.442-8.
- 133.** Timm NH. Multivariate Analysis with Applications in Educations and Psychology. 1<sup>st</sup> ed. Monterrey: CA Brooks/Cole, 1975, p. 1- 687.
- 134.** Helvind MH, McCarthy JF, Imamura M, Prieto L, Sarris GE, Drummond- Webb JJ, Mee RB. Ventriculo- arterial discordance: switching the morphologically left ventricle into the systemic circulation after 3 months of age. *Eur J Cardio- thorac Surg.* 1998;14(2):173-8.
- 135.** Mavroudis C, Backer CL. Arterial switch after failed atrial baffle procedures for transposition of the great arteries. *Ann Thorac Surg.* 2000;69(3):851-7.
- 136.** Corno AE, Hurni M, Payot M, Sekarski N, Tozzi P, von Segesser LK. Adequate left ventricular preparation allows for arterial switch despite late referral. *Cardiol Young.* 2003;13(1):49-52.

- 137.** Oliveira EM, Alves GB, Brum PC, Krieger JE. Aspectos moleculares da hipertrofia dos músculos cardíaco e esquelético após o treinamento físico. In: Negrão CE, Barretto ACP. *Cardiologia do Exercício: do Atleta ao Cardiopata*. 1ª ed. Editora Manole, 2005, Cap 3, p.53-75.
- 138.** Grossman W, Jones D, McLaurin LP. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest*. 1975;56:56-64.
- 139.** Russell B, Motlagh D, Ashley WW. Form follows function: how muscle shape is regulated by work. *J Appl Physiol*. 2000;88:1127-1132.
- 140.** Negrão CE, Matos LDNJ, Alves MJNN, Oliveira EM, Ramires JAF. Cardiologia do esporte. In: Amatuzzi MM, Carazzato JG. *Medicina do Esporte*. 1ª ed. Editora Roca, 2004, Cap 10, p.88-102.
- 141.** Perrino C, Prasad SVN, Mao L, Noma T, Yan Z, Kim H-S, Smithies O, Rockman HA. Intermittent pressure overload triggers hypertrophy-independent cardiac dysfunction and vascular rarefaction. *J Clin Invest*. 2006;116:1547-60.
- 142.** Scheuer J, Penpargkul S, Bhan A. Experimental observations on the effects of physical training upon intrinsic cardiac physiology and biochemistry. *Am J Cardiol*. 1974;33(6):744-51.
- 143.** Ziada AM, Hassan MO, Tahlilkar KI, Inuwa IM. Long-term exercise training and angiotensin-converting enzyme inhibition differentially enhance myocardial capillarization in the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens*. 2005;23(6):1233-40

- 
- 144.** Marino TA, Haldar S, Williamson EC, Beaverson K, Walter RA, Marino DR, Beatty C, Lipson KE. Proliferating cell nuclear antigen in developing and adult rat cardiac muscle cells. *Circ Res.* 1991;69:1353-60.
- 145.** Buccino RA, Harris E, Spann Jr. JF, Sonnenblick EH. Response of myocardial connective tissue to development of experimental hypertrophy. *Am J Physiol.* 1969;216(2):425-28.
- 146.** Medugorac I. Collagen content in different areas of normal and hypertrophied rat myocardium. *Cardiovasc Res.* 1980 Sep;14(9):551-4
- 147.** Caspari PG, Gibson K, Harris P. Changes in myocardial collagen in normal development and after beta blockade. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab.* 1975;7:99-104.
- 148.** Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Tissue renewal and repair: regeneration, healing, and fibrosis. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease.* 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005, Cap 3, p.87-118.
- 149.** Macdonald C, Michael A, Colston K, Mansi J. Heterogeneity of immunostaining for tumour markers in non-small cell lung carcinoma. *Eur J Cancer.* 2004;40:461-6.
- 150.** Pasumarthi KBS, Field LJ. Cardiomyocyte cell cycle regulation. *Circ Res.* 2002;90:1044-54.
- 151.** Olivetti G, Cigola E, Maestri R, Corradi D, Lagrasta C, Gambert SR, Anversa P. Aging, cardiac hypertrophy and ischemic cardiomyopathy do not affect the proportion of mononucleated and multinucleated myocytes in the human heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1996;28:1463-77.

- 152.** MacCallum DE e Hall PA. The biochemical characterization of the DNA binding activity of pKi67. *J Pathol.* 2000;191:286-98.
- 153.** Starborg M, Gell K, Brundell E, Höög C. The murine Ki- 67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. *J Cell Sci.* 1998;109:143-53.
- 154.** Feigenbaum H. Diseases of the myocardium. In: Feigenbaum H. *Echocardiography.* 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986, Cap 9, p.514-47.
- 155.** Boettler P, Claus P, Herbots L, McLaughlin M, D'Hooge J, Bijmens B, Ho SY, Kececioglu D, Sutherland GR. New aspects of the ventricular septum and its function: an echocardiographic study. *Heart.* 2005;91:1343-8.
- 156.** Rakusan K e Poupa O. Differences in capillary supply of hypertrophic and hyperplastic hearts. *Cardiologia.* 1966;49:293-8.
- 157.** Tomanek RJ, Searls JC, Lachenbruch PA. Quantitative changes in the capillary bed during developing, peak, and stabilized cardiac hypertrophy in the spontaneously hypertensive rat. *Circ Res.* 1982;51:295-304.
- 158.** Zorc M, Vraspir- Porenta O, Zorc- Pleskovic R, Radovanovic N, Petrovic D. Apoptosis of myocytes and proliferation markers as prognostic factors in end- stage dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Pathol.* 2003;12:36-9.

- 159.** Metzger M, Higuchi ML, Moreira LF, Chaves MJF, Castelli JB, Silvestre JML, Bocchi E, Stolf N, Ramires JA. Relevance of apoptosis and cell proliferation for survival of patients with dilated cardiomyopathy undergoing partial left ventriculectomy. *Eur J Clin Invest.* 2002;32:394-9.
- 160.** Narula N, Narula J, Zhang PJ, Haider N, Raghunath PN, Brittin R, Gorman III JH, Gorman RC, Tomaszewski JE. Is the myofibrillarlytic myocyte a forme fruste apoptotic myocyte? *Ann Thorac Surg.* 2005;79:1333-7.
- 161.** Chen Z, Ge Y, Kang JX. Down- regulation of the M6P/IGF-II receptor increases cell proliferation and reduces apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes. *BMC Cell Biology.* 2004;5:15-26.
- 162.** Dispersyn GD, Ausma J, Thoné F, Flameng W, Vanoverschelde JLJ, Alessie MA, Ramaekers FCS, Borgers M. Cardiomyocyte remodelling during myocardial hibernation and atrial fibrillation: prelude to apoptosis. *Cardiovasc Res.* 1999;43:947-57.
- 163.** James TN. Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart. *Annu Rev Physiol.* 1998;60:309-25.
- 164.** Kajstura J, Mansukhani M, Cheng W, Reiss K, Krajewski S, Reed JC, Quaini F, Sonnenblick EH, Anversa P. Programmed cell death and expression of the protooncogene bcl- 2 in myocytes during postnatal maturation of the heart. *Exp Cell Res.* 1995;219:110-21.