



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
MESTRADO EM CIRURGIA

MONA ADALGISA SIMÕES

**ESTUDO ANATOMOPATOLÓGICO
PÓS- INFARTO DO MIOCÁRDIO EM RATOS JOVENS
PRÉ-PÚBERES E ADULTOS**

Curitiba
2010

MONA ADALGISA SIMÕES

**ESTUDO ANATOMOPATOLÓGICO
PÓS- INFARTO DO MIOCÁRDIO EM RATOS JOVENS
PRÉ-PÚBERES E ADULTOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Cirurgia, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Itiro Miyague

**Curitiba
2010**

Aos meus pais (Nedson, *in memoriam*, e Ismenia) que me ensinaram, por seus atos, atitudes e carinho, a me posicionar diante da vida.

A meu marido (Francisco) e meus filhos (Francisco e Julia), pela compreensão, pelo companheirismo e carinho dedicados neste momento de finalização de mais um projeto.

Ao meu orientador e Mestre Professor Doutor Nelson Itiro Miyague que, além do incentivo, orientação em cardiologia, me ensinou a gostar de pesquisa. Meu eterno agradecimento.

Agradecimentos

À Professora Doutora Lucia de Noronha, pela gentil colaboração e esclarecimento de dúvidas, levando ao melhor entendimento da Patologia.

À Professora Márcia Olandoski, pelo seu auxílio e ensinamentos em bioestatística.

À Equipe do Laboratório de Patologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, pela colaboração, presteza e desprendimento que foram imprescindíveis na realização deste projeto.

Ao Julio César Francisco, por sua colaboração, presteza e desprendimento.

Ao Doutor Jean Carl Silva por sua amizade, desprendimento e apoio.

A Fabiola F. Santos, por sua disposição, compreensão e orientação que muito me auxiliou durante todo este trajeto.

Ao Professor Doutor Luiz César Guarita Souza, pelo apoio ao projeto.

Aos FUNCIONÁRIOS E DIRETORES da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, por sua colaboração.

Aos Professores das Disciplinas, pelo empenho e dedicação.

A Deus e a todos que, de alguma maneira, mesmo que anônimos, colaboraram ou facilitaram o meu caminho.

LISTA DE ABREVIATURAS e SIGLAS

A	- grupo de ratos adultos
A1	- grupo adulto de ratos infartados
A2	- grupo adulto de ratos controles
CEPA	- Comissão de Ética em Pesquisa com Animais
C57BL/6(B6)	- espécie de rato
DAB	-3,3'diaminobenzidina
DNA	- <i>desoxyribonucleic acid</i> . Ácido desoxirribonucléico
g	-grama (peso)
HCl	-ácido clorídrico
HHF35	-marcador da fração de actina
H&E	-hematoxilina e eosina
IM	-infarto do miocárdio
J	- grupo de ratos jovens
J1	- grupo de ratos jovens infartados
J2	- grupo de ratos jovens controles
ml	- mililitro
MRL	- espécie de ratos
n	- número de amostras analisadas
p	- nível de significância estatística
PCNA	- <i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PLVE	-parede livre do ventrículo esquerdo
PO	-pós-operatório
PUCPR	-Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Tecpar	-Instituto de Tecnologia do Paraná
TMA	- <i>Tissue Microarray Artesanal</i>
VE	-ventrículo esquerdo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Microscópio óptico.....	25
Figura 2: Corte histológico da parede livre do VE	26
Figura 3: Blocos de TMA	27
Figura 4: Corte histológico corado pelo HHF35.....	29
Figura 5: Corte histológico corado pelo PCNA.....	30
Figura 6: Média de espessura do septo ventricular no grupo de ratos adultos pós- infarto e seu controle	33
Figura 7: Média da espessura da PLVE no rato adulto e seu controle.....	33
Figura 8: Média da espessura do septo ventricular no grupo de ratos pré-púbere e seu controle.....	34
Figura 9: Média da espessura da PLVE no grupo de ratos pré-púbere e seu controle	34
Figura 10: Média da espessura do septo ventricular e PLVE em ratos pré-púberes e adultos 60 dias pós-infarto	35
Figura 11: Média da espessura do septo ventricular e PLVE em ratos pré-púbere e adulto controle 60 dias pós cirurgia simulada.....	36
Figura 12: Média do HHF35P e HHF35L no grupo rato adulto e grupo rato Jovem pré-púbere 60 dias pós-infarto.....	37
Tabela 1: Distribuição e comparação do peso corporal e do coração nos grupos adulto e pré-púbere infartados e seus controles	31
Tabela 2: Distribuição e comparação das espessura do septo ventricular e PLVE nos grupos adulto e jovem pré-púbere infartado e seus controles.....	32
Tabela 3: Resultado da análise dos grupos amostrais com anticorpo HHF35 próximo ao infarto	37
Tabela 4: Resultado da análise dos grupos amostrais com anticorpo HHF35 longe do infarto	38
Tabela 5: Resultado da análise dos grupos amostrais com anticorpo PCNA próximo ao infarto	39

Tabela 6: Resultado da análise dos grupos amostrais com anticorpo PCNA longe do infarto	39
---	----

RESUMO

INTRODUÇÃO: Poucas publicações são encontradas sobre infarto do miocárdio (IM) na infância. O rato tem sido usado como modelo para estudo do infarto em jovens. Estudo funcional mostra que a evolução do infarto do miocárdio em ratos jovens pré-púbere é diferente dos ratos adultos. Assim como a evolução funcional, o coração de ratos jovens pré-púberes deve apresentar recuperação anatomopatológica diferente do rato adulto. **OBJETIVO:** Verificar se existe diferença anatomopatológica na evolução pós-infarto do miocárdio entre ratos jovens pré-púberes e ratos adultos. **MÉTODO:** Estudo experimental randomizado em lâminas originadas de blocos parafinados, de fragmentos de corações de ratos pré-púberes e adultos pós-infarto (grupo experimental) e pós-cirurgia simulada (grupo controle) obtidas de necropsias de 7, 30, 60 dias após o infarto. Nestas lâminas foram analisados os seguintes parâmetros: tamanho do infarto na microscopia, espessura da parede livre do ventrículo esquerdo e septo ventricular, e lâminas de fragmentos de coração longe e próximo ao infarto ou cirurgia simulada para reação de imunoistoquímica para anticorpos de investigação do ciclo celular (PCNA) e reação de imunoistoquímica para investigação para proteína contrátil (HHF35). **RESULTADOS:** O grupo de rato jovem pré-púbere infartado apresenta maior espessura da parede livre do ventrículo esquerdo ($p < 0,05$) no momento 60 dias quando comparado ao seu controle e ao grupo de rato adulto pós-infarto. Quanto à reação de imunoistoquímica, encontramos no grupo rato pré-púbere infartado expressão protéica (HHF35) mais intensa no momento sete dias longe do infarto quando comparado ao seu controle ($p=0,008$). E quando comparado ao grupo rato adulto aos 60 dias pós-infarto, o rato pré-púbere apresenta maior expressão protéica próximo ($p=0,042$) e longe $p=0,02$ do infarto. Em relação à atividade proliferativa (PCNA), o rato jovem pré-púbere apresenta proliferação celular aos sete dias próximo ao infarto $p=0,016$ e aos 60 dias próximo $p=0,016$ e longe $p=0,016$ do infarto quando comparado ao controle. O rato adulto pós-infarto, quando comparado ao seu controle, apresenta maior expressão protéica (HHF35) longe do infarto aos sete dias ($p=0,017$) e aos 60 dias ($p=0,022$) e atividade proliferativa (PCNA) próximo ($p=0,014$) e longe ($p=0,014$) do infarto aos 60 dias. **CONCLUSÕES:** O rato jovem pré-púbere infartado apresenta evolução morfológica diferente do rato adulto infartado, com maior expressão protéica na evolução e precocidade na proliferação celular. O rato adulto apresenta maior expressão protéica e proliferação celular quando comparado ao seu controle.

Palavras-chave: Infarto do miocárdio. Rato. Imunoistoquímica. Proliferação celular. Hipertrofia

ABSTRACT

INTRODUCTION: Few publications can be found on myocardial infarction (MI) among children. Mice have been used as a model for the study of MI in young people. The functional study has shown that the evolution of myocardial infarction in young prepubescent mice is different from that in adult mice. As well as the functional evolution, the heart of young prepubescent mice must show anatomopathologic recuperation different from that of adult mice. **OBJECTIVE:** To check if there is anatomopathologic difference in the evolution of post myocardial infarction between prepubescent young mice and adult mice. **METHOD:** Randomized experimental study in slides originated from paraffin blocks with fragments of hearts of prepubescent mice and adult mice (experimental group) and simulated post-surgical (control group) obtained from necropsies corresponding to 7, 30 and 60 days post-infarction. The following parameters were analyzed from the slides: size of infarction in microscopy, thickness of the left ventricular free wall and the ventricular septum, slides with heart fragments close and away from the infarction moment or simulated surgery for immunohistochemical reaction to investigation cell cycle antigens (PCNA) and immunohistochemical reaction to investigation contractile protein antigens (HHF35). **RESULTS:** The group of young prepubescent infarcted mice showed thicker left ventricular free wall ($p < 0.05$) when compared with its control group and with the group of adult mice at 60 days post-infarction. Considering the immunohistochemical reaction, protein expression (HHF35) was more intense in the prepubescent infarcted mice group 7 days away from the infarction moment, when comparing with its control group ($p = 0.008$). And when compared with the adult mice group at 60 days post-infarction, the prepubescent mice show higher protein expression ($p = 0.042$) close to and $p = 0.02$ away from infarction moment. Considering proliferation activity (PCNA), young prepubescent mice show cell proliferation at 7 days post-infarction ($p = 0.016$) and at 60 days post-infarction ($p = 0.016$) close to and $p = 0.016$ away from infarction, when compared with the control group. Post-infarcted adult mice, when compared with its control group, show higher protein expression (HHF35) away from infarction at 7 days ($p = 0.017$) and at 60 days ($p = 0.022$), and proliferation activity (PCNA) close to ($p = 0.014$) and away from ($p = 0.014$) from infarction at 60 days. **CONCLUSIONS:** Young prepubescent infarcted mice show different morphological evolution from that of adult mice, with higher level of protein expression in evolution and early cell proliferation. Adult mice show higher level of protein expression and cell proliferation when compared with its control group.

Key-words: Myocardial infarction. Mice. Immunohistochemical. Cell Proliferation. Hypertrophy.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVO	14
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
3.1 O coração do rato.....	15
3.2 Infarto do miocárdio.....	16
3.3 Remodelamento ventricular.....	17
3.4 O ciclo celular.....	17
3.5 Apoptose.....	18
3.6 Hipertrofia.....	19
3.7 Hiperplasia.....	19
3.8 Regeneração miocárdica.....	20
3.9 Método de pesquisa em células cardíacas.....	20
3.9.1 Investigação da proteína contrátil.....	20
3.9.2 Investigação do ciclo celular.....	21
4 MÉTODO.....	22
4.1 Delineamento do estudo.....	22
4.2 Amostra.....	22
4.3 Logística do estudo.....	22
4.4 Variáveis estudadas.....	24
4.5 Avaliação morfométrica.....	24
4.5 Avaliação imunoistoquímica.....	26
4.5.1 Método de leitura do anticorpo de investigação da proteína contrátil.....	28
4.5.2 Método de leitura do anticorpo de investigação do ciclo celular.....	29
4.6 Análise estatística.....	30
5 RESULTADOS.....	31
5.1 Peso corporal x Peso do coração.....	31
5.2 Tipo de infarto.....	31
5.3 Análise morfométrica.....	32
5.4 Resultado das reações para anticorpo de investigação de proteína contrátil e ciclo celular.....	36
6 DISCUSSÃO.....	40

6.1 Aspectos gerais.....	40
6.2 Resultados morfométrico e imunoistoquímico.....	41
6.3 Limitações desta pesquisa e contribuição ao estudo da regeneração.....	45
7 CONCLUSÕES.....	47
REFERÊNCIAS.....	48
Anexo A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS.....	53
Anexo B – CARTA AUTORIZAÇÃO DO PROFESSOR DOUTOR LUIZ CÉSAR GUARITA SOUZA	56

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

S593e
2010 Simões, Mona Adalgisa
Estudo anatomopatológico pós-infarto do miocárdio em ratos jovens pré-púberes e adultos / Mona Adalgisa Simões ; orientador, Nelson Itiro Miyague. – 2010.
57 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2010
Bibliografia: f. 49-53

1. Coração. 2. Infarto do miocárdio. 3. Rato como animal de laboratório. 4. Imunoistoquímica. 5. Proliferação de células. 6. Hipertrofia. I. Miyague, Nelson Itiro. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia. III. Título.

CDD 20. ed. – 617

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são as principais causas de morte nos países desenvolvidos ou em desenvolvimento. ⁽¹⁾

Nos Estados Unidos da América (EUA), as doenças cardiovasculares representam a causa mais comum de morte, ocorrendo 600.000 óbitos a cada ano. ^(2, 3) Isso é similar no Brasil, onde estas doenças são responsáveis por 32% dos óbitos e constituem a terceira causa de internação hospitalar. ⁽³⁾

O infarto do miocárdio (IM) é considerado raro na infância, porém estudo têm demonstrado ser mais prevalente do que se acredita. ⁽¹⁾

Na população infantil o IM não acontece habitualmente como na idade adulta. As causas mais comuns são embolias, doenças congênitas da artéria coronária, pós-operatório de cardiopatias congênitas e doença de Kawasaki. ⁽¹⁾

Também são causas de infarto do miocárdio nessa faixa etária o uso de cocaína por adolescentes, trauma torácico, transplante cardíaco, miocardite, doença vascular do colágeno, homocisteinúria, síndrome nefrótica, linfoma, infarto do miocárdio subendocárdico idiopático, progeria, pseudoxantoma elástico, mucopolissacaridoses, doença de Fabry, alcaptonúria, síndrome de Huler e doença de Pompe. A dislipidemia familiar, etiologia importante de doença coronariana do adulto, pode levar ao infarto do miocárdio antes dos 20 anos de idade. ⁽¹⁾

No período neonatal pode-se encontrar Infarto do miocárdio por hipoxemia severa, coagulação intravascular disseminada, trombose de artéria renal e sepsis. ⁽¹⁾

Fatores de risco para doenças cardiovasculares estão presentes desde o período fetal e continuam ao longo de todo curso da vida. Quando o ambiente intrauterino é desfavorável, o feto pode apresentar retardo do crescimento ou macrossomia, e estas condições clínicas foram associadas ao desenvolvimento tardio de diabetes, doença cardiovascular, dislipidemia e hipertensão arterial. Além disso, as mudanças de estilo de vida e hábitos alimentares vêm tornando as crianças obesas e sedentárias, levando a maior risco de evento cardiovascular precoce. ⁽⁴⁾

A origem anômala da artéria coronária esquerda do tronco da artéria pulmonar é a doença coronariana congênita mais frequente. A baixa pressão sanguínea na artéria pulmonar e a menor saturação de oxigênio ocasionam isquemia miocárdica e infarto. Após tratamento cirúrgico, as crianças apresentam evolução favorável com recuperação da função ventricular.^{(5),(6)}

O mecanismo da melhora da função cardíaca em jovens ainda não está bem esclarecido na literatura. Anversa, et al. produziram infarto do miocárdio em ratos Wistar com idade de 80 dias, e após estudo morfológico 40 dias após o infarto, observaram que apenas por hipertrofia o coração seria incapaz de retornar à função adequada. Levantaram a hipótese de que o coração sendo submetido a grande estresse pode desencadear a regeneração celular como mecanismo auxiliar de compensação.⁽⁷⁾

Sugere-se na literatura que a evolução do infarto do miocárdio no rato jovem é diferente da do rato adulto, pois foi observado maior infiltrado inflamatório nos ratos jovens, e nos ratos mais velhos o edema persiste por mais tempo e ocorre o acúmulo de substâncias como mucopolissacarídeos.⁽⁸⁾

Pabis, FC, em sua Dissertação de Mestrado na Pontifícia Universidade Católica do Paraná, observou, por meio de estudo ecocardiográfico, melhora da fração de ejeção nos ratos jovens infartados em relação ao grupo controle, piora da fração de ejeção dos ratos adultos em relação aos animais controle, melhora da fração de ejeção dos animais jovens infartados em relação aos adultos infartados.⁽⁹⁾ Nesse estudo, os animais jovens foram analisados com idade inferior a 60 dias.

Na literatura consultada, os ratos considerados jovens nos estudos encontravam-se com idade igual ou maior que 2 meses. Os ratos atingem a puberdade com 50 ± 10 dias, sendo considerados adultos, pois se encontram aptos à reprodução.⁽¹⁰⁾ Portanto, todos os ratos dos estudos consultados, com a denominação de jovem, eram animais adultos, com exceção do trabalho de Pabis et al. em que os animais eram pré-púbere.

Como não existem outros trabalhos de infarto em animais pré-pubescentes na literatura, este estudo foi elaborado para analisar por meio da anatomia patológica os corações dos ratos utilizados no trabalho de Pabis et al. Provavelmente a melhora funcional dos corações de ratos jovens pré-pubescentes

em comparação com os ratos adultos pode estar associada a uma diferenciação anatomopatológica entre estes dois grupos.

2 OBJETIVO

2.1 GERAL

- Analisar alterações anatomopatológicas de corações com infarto do miocárdio em ratos jovens pré-púberes e adultos.

2.2 ESPECÍFICO

- Testar a hipótese de que existe diferença na evolução da hipertrofia e ou hiperplasia do ventrículo esquerdo pós-infarto entre ratos pré-púberes e ratos adultos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O CORAÇÃO DO RATO

O coração do rato cresce por hiperplasia das células no período fetal e apresenta desenvolvimento rápido, com início das contrações na metade do período gestacional. Se for submetido à sobrecarga de volume durante a gestação, apresentará maior número de células ao nascimento. ⁽¹¹⁾

O aumento de células ocorre mais no período fetal e neonatal, com a taxa de proliferação celular cardíaca em torno de 17% no final da gestação, 13% no primeiro dia de vida e 0,2% no adulto. ⁽¹²⁾

Ao nascimento ocorre mudança da anatomia, fisiologia e bioquímica do coração, o que leva à mudança da principal forma de crescimento, passando da forma hiperplásica para hipertrófica. ^{(11),(13),(14)}

Nos primeiros onze dias após o nascimento ocorre grande aumento de miofibrilas, mitocôndrias e sistema retículo endoplasmático com perda da matriz citoplasmática, sendo detectado aumento de 100% de miócitos no ventrículo esquerdo. Os miócitos aumentam em secção transversa e em volume celular por núcleo e dobram em comprimento. Observa-se aumento de 6,2 vezes no peso e apenas 2,7 vezes na espessura da parede. ⁽¹³⁾

A forma hipertrófica leva as células musculares a mudar da orientação longitudinal para transversal, sendo que o tamanho máximo do cardiomiócito é alcançado com a maturidade do animal. ⁽¹⁰⁾ O aumento da massa cardíaca acontece por acúmulo de proteínas contráteis, moléculas de adesão e filamentos intermediários. ⁽¹⁵⁾

Evidências sugerem que em coração de ratos os cardiomiócitos possuem capacidade de replicação e são substituídos lentamente durante toda a vida, porém em taxa menor que as perdas por morte ou apoptose. ⁽¹⁶⁾

3.2 INFARTO DO MIOCÁRDIO

O IM ocorre quando o suprimento sanguíneo é interrompido. ⁽⁷⁾

O coração infartado pode ser dividido em três regiões: a área infartada, a zona de transição e a zona remota. Na área infartada ocorre migração de células inflamatórias, proliferação de fibroblastos com depósito de colágeno e, posteriormente substituição do tecido necrótico por fibrose, levando ao afinamento da parede cardíaca e mudança do formato do ventrículo esquerdo. Dependendo da espécie animal, pode durar dias ou meses, em humanos este processo acontece entre dois e três meses. ⁽¹⁷⁾

Na região não infartada, desenvolve-se hipertrofia compensatória, com aumento do tamanho dos cardiomiócitos. Na zona de transição ocorre o deslizamento dos cardiomiócitos para a zona de necrose. ⁽¹⁷⁾

Estudos em rato, carneiro e cultura de células miocárdicas isoladas demonstram que os cardiomiócitos imaturos mantêm a capacidade de replicação, enquanto os cardiomiócitos em estado adulto teriam apenas na hipertrofia um meio de aumentar a massa cardíaca. ⁽¹⁸⁾

Os cardiomiócitos de ratos adultos não estão totalmente diferenciados, podendo, portanto, o coração de adulto apresentar regeneração ^{(12),(19)} Supõe-se que o coração de mamíferos é constantemente renovado, e a demonstração de 11 núcleos exibindo mitose por milhão de células ou 59.000 núcleos no ventrículo esquerdo de coração em insuficiência cardíaca, indica que a identificação da mitose é difícil, e, de acordo com estimativa, 10% de novos miócitos seriam gerados no período de um ano. ⁽¹²⁾

Após lesão isquêmica no ventrículo direito de camundongos das espécies MRL e C57BL/6 (B6), as dimensões do ventrículo direito retornaram ao normal em três meses e com 60 dias após a injúria, os animais da espécie B6 apresentaram índice mitótico de 1-3% enquanto os da espécie MRL apresentaram 10-20%, demonstrando que o índice mitótico pode ser diferente entre espécies. ⁽¹⁹⁾

Avaliando as conseqüências do infarto do miocárdio seguido de reperfusão em ratos adultos jovens e adultos velhos observou-se que os animais velhos têm diminuição da capacidade oxidativa da mitocôndria e maior fragilidade da membrana celular. ⁽²⁰⁾

Gold et al, observaram que os animais jovens apresentam maior área de infarto após ligadura cirúrgica da artéria coronária esquerda do que os animais adultos, entretanto, na evolução, os animais jovens apresentam menor taxa de insuficiência cardíaca e mortalidade.⁽²¹⁾

3.3 O REMODELAMENTO VENTRICULAR

O remodelamento ventricular é definido como mudança do formato natural do coração, tanto na área afetada como na não afetada pela injúria, causando alterações estruturais e funcionais^{(17), (22),(23),(24)}

É um processo dinâmico e tempo dependente ⁽²⁵⁾, podendo ser consequência do infarto do miocárdio, ou fisiológico como acontece na criança.⁽²²⁾

Na resposta ao infarto do miocárdio ocorre uma sequência de eventos como mudanças estruturais e da composição do coração. Neste processo são envolvidos sinalização hormonal, processo inflamatório, remodelamento da matriz extracelular e processo adaptativo dos cardiomiócitos remanescentes.^{(23),(26)} Em torno de 72 horas após o infarto do miocárdio, o coração como um todo está em remodelação, tendo ocorrido dilatação ventricular com alteração da forma e desencadeamento de hipertrofia das áreas não infartadas.⁽²²⁾

Experimentalmente, a inibição da apoptose e necrose do miócito em modelos de cardiopatia isquêmica atenua a dilatação ventricular e a hipertrofia reativa da parede, demonstrando que a morte celular é crucial no remodelamento ventricular. ⁽²⁷⁾

3.4 O CICLO CELULAR

O ciclo celular é dividido em fase M, em que ocorre a divisão do núcleo, e a interfase, que é o período de atividade celular. A interfase é dividida em três fases G1, S e G2.⁽²⁸⁾

A proliferação da célula é regulada na fase G1, chamada ponto de restrição. Nesta fase o ciclo celular pode ou não seguir em frente na

dependência da presença ou ausência de fatores de crescimento. Se as células ficam bloqueadas entram num estágio inativo denominado G0 em que não ocorre proliferação.⁽²⁹⁾

Na fase S ocorre a síntese de proteínas e na fase G2 continua a síntese de proteínas e há início da mitose.⁽³⁰⁾

Na fase M ocorre ruptura da membrana nuclear, condensação dos cromossomos, alinhamento equatorial, replicação da cromatina, formação de dois núcleos separados e divisão do citoplasma.⁽³⁰⁾

Em camundongos ocorre hiperplasia na vida fetal e imediatamente após o nascimento dá-se a formação dos cardiomiócitos binucleares sem divisão, ocorrendo apenas aumento da massa contrátil.⁽³¹⁾ A binucleação do cardiomiócito é considerada um marcador precoce de crescimento hipertrófico e pode ser resultado da mitose sem citocinese.⁽³²⁾

Em estudos de miocardiopatia dilatada e infarto do miocárdio em ratos observou-se, nos que apresentavam insuficiência cardíaca moderada a grave, replicação de cardiomiócitos.^{(12),(27), (33)}

Os mecanismos do ciclo celular ainda não foram totalmente elucidados, podendo existir mecanismos naturais que impeçam a regeneração miocárdica por inibição de alguma fase do ciclo celular.^{(12),(19),(34)}

3.5 APOPTOSE

É um mecanismo programado para eliminar excesso celular ou células somáticas lesadas, por isso denominado morte celular programada.⁽³⁵⁾

Estudos têm demonstrado que os cardiomiócitos apresentam apoptose na isquemia, sobrecarga hemodinâmica e falha cardíaca. Em resposta à isquemia do miocárdio, a apoptose frequentemente precede a necrose, e a inibição da apoptose por uma variedade de intervenções pode resultar em infarto menor.^{(36),(37)}

Na apoptose o DNA cromossomal está fragmentado, a cromatina condensa e o núcleo se dissolve em pequenos pedaços, a célula diminui de volume e dissolve-se em fragmentos que são fagocitados por histiócitos (macrófago fixo), sendo estas células removidas do tecido sem inflamação. Já na morte celular por injúria ocorre aumento de volume, lise e liberação do

conteúdo celular levando à inflamação. ^{(1),(29)} Estudos sugerem que os cardiomiócitos são substituídos em taxas menores após perda por morte ou apoptose. ^{(12),(38)}

3.6 HIPERTROFIA

Nos ratos a hipertrofia pós-infarto ocorre em grau importante nos três primeiros dias. ⁽²⁴⁾ O aumento de volume dos miócitos pode chegar a 70% no diâmetro transversal, sendo o aumento no comprimento controverso ^{(7),(22),(39),(40)}, bem como o comprimento da fibra, quando comparado com outras dimensões. ⁽²¹⁾

Estudos de morfometria sugerem que o remodelamento ventricular estaria em função principalmente da modificação dos cardiomiócitos e da adição de novos cardiomiócitos em série. ⁽⁴⁰⁾

A perda de células contráteis do coração desencadeia uma série de reações cardíacas, com o intuito de compensar a perda da massa ventricular, o miocárdio fica submetido à sobrecarga de volume e pressão, e este aumento seria o responsável pelo estímulo para a célula reentrar no ciclo celular ⁽⁴¹⁾ e (ou) desencadear a hipertrofia nas áreas não infartadas, dependendo da fase de desenvolvimento em que se encontra o coração. ⁽¹¹⁾

Esse evento levaria à ativação de mecanismo para síntese rápida de elementos contráteis, chegando a aumento de 28% no tamanho dos cardiomiócitos; com esta hipertrofia há diminuição do estresse da parede ventricular. ⁽²⁴⁾

3.7 HIPERPLASIA

No rato a síntese de DNA e divisão mitótica dos cardiomiócitos pós-infarto do miocárdio são aparentes, tendo sido detectada hiperplasia em ratos com hipertensão prolongada. ⁽⁴⁰⁾

Nos ratos, os cardiomiócitos binucleados aumentaram em 34,5 vezes no ventrículo esquerdo e 22,6 vezes no ventrículo direito entre o primeiro e o 11^o dia pós-natal. ⁽¹³⁾

Nos primeiros quatro dias após o nascimento, o crescimento do coração no rato se faz por hiperplasia, ocorrendo transição entre seis a 14 dias e após isto, o crescimento ocorre por hipertrofia.⁽¹¹⁾

No desenvolvimento do coração de ratos, devido a mudanças hemodinâmicas ocorridas ao nascimento, há maior proliferação de miócitos no ventrículo esquerdo, provavelmente pela sobrecarga hemodinâmica imposta a este, levando bom desempenho ao músculo do ventrículo esquerdo.⁽⁴²⁾

Estudos demonstram a ocorrência de hiperplasia após agravo isquêmico, porém com capacidade limitada, não sendo, portanto, suficiente para restaurar a função cardíaca.^{(17),(43),(44),(45)}

3.8 REGENERAÇÃO MIOCÁRDICA

Existem controvérsias sobre regeneração miocárdica, porém tem-se demonstrado que células são continuamente repostas formando jovem população de miócitos, bem como células endoteliais. A questão fundamental é se a regeneração ocorre em adulto ou é restrita à vida pré-natal.⁽⁴⁴⁾

Estudo de proliferação celular com PCNA em doença cardíaca em adultos chegou à conclusão que o miocárdio pode aumentar o DNA e renovar ou reparar-se.⁽³²⁾

Há possibilidade de que exista uma célula multipotente no coração e parece ter habilidade para gerar novo miocárdio independente da função celular, podendo promover a formação de vasculatura coronariana e miócitos funcionalmente competentes.⁽⁴⁴⁾

3.9 MÉTODO DE PESQUISA EM CÉLULAS CARDÍACAS

3.9.1 Investigação das Proteínas Contráteis

O HHF-35 é um marcador policlonal que tem boa atividade em corações de rato. Este marcador cora as frações alfa e gama da actina.

A alfa-actina sarcomérica é uma das precursoras na estrutura das miofibrilas.⁽⁴⁶⁾

Tanto a alfa-actina sarcomérica cardíaca como a esquelética estão presentes no coração de ratos jovens, sendo que no coração de rato adulto predomina a alfa-actina sarcomérica cardíaca.⁽⁴⁶⁾

Durante períodos de rápido crescimento como no crescimento fisiológico e hipertrofia cardíaca, há necessidade da alfa-actina esquelética.⁽⁴⁷⁾

A miofibrilogenese e a reorganização da contratilidade podem ser consideradas processos adaptativos e estes estão presentes na hipertrofia do coração, e a imunistoquímica tem significativa contribuição no esclarecimento do mecanismo celular deste processo.⁽⁴⁶⁾

3.9.2 Investigação do Ciclo Celular

Como os cardiomiócitos perdem sua capacidade de proliferação após o nascimento, a resposta ao crescimento, lesão ou carga de trabalho faz-se por meio da hipertrofia de cardiomiócitos maduros, assim a diferenciação destes os retira permanentemente do ciclo celular. Entretanto, a visão que os cardiomiócitos não podem entrar no ciclo celular tem sido contestada.^{(34),(48),(49)}

Para identificação da atividade mitótica dos cardiomiócitos, dispõe-se de métodos diretos e indiretos para análise da síntese de DNA no ciclo celular. O método do PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) é método indireto, detecta a atividade celular nas fases do ciclo em que ocorre mitose, corando o núcleo das células em proliferação.⁽³⁰⁾ O PCNA é um antígeno da proteína assessória, co-fator da polimerase beta necessária para síntese de DNA, que é vital para a replicação celular nos mamíferos.^{(41),(43),(50)}

O PCNA tem sido usado em pesquisas como a de Anand et al., que demonstrou como a atividade deste diminuiu gradativamente nos corações de ratos da fase gestacional para a neonatal e, ainda mais para a fase adulta, demonstrando uma queda na taxa de proliferação com a idade.⁽⁴¹⁾

4 MÉTODO

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Para a realização desta pesquisa, delineou-se um estudo experimental com corações de ratos jovens pré-púberes e adultos pós-infarto (grupo experimental) e pós cirurgia simulada (grupo controle), para avaliação morfológica e imunoistoquímica.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (registro na CEUA/PUCPR nº 373 com a denominação de “Estudo anatomopatológico comparativo pós infarto do miocárdio em ratos jovens e adultos”).

4.2 AMOSTRA

Foi composta por 68 lâminas originadas de blocos parafinados de fragmentos de corações de ratos jovens pré-púberes e adultos pós-infarto (grupo experimental) e pós cirurgia simulada (grupo controle) e nove lâminas de blocos multiamostrais (TMA) longe e próximo do infarto ou cirurgia simulada para reação de imunoistoquímica.

4.3 LOGÍSTICA DO ESTUDO

As peças anatômicas deste estudo foram obtidas de um projeto experimental original com ratos jovens pré-púberes e adultos submetidos ao infarto do miocárdio por meio de ligadura cirúrgica da artéria coronária esquerda.

Para a realização desse projeto de pesquisa desde o seu início, foram utilizados 168 ratos machos (*Rattus Norvegicus Albinus Rodentia Mammalia*), da linhagem Wistar, provenientes do Instituto de Tecnologia do Paraná .

Os animais foram divididos em dois grupos: o grupo jovem, denominado grupo J, composto por 35 animais com idade inicial de 28 dias, e o grupo adulto, denominado grupo A, composto por 37 animais adultos com idade inicial de 153 dias.

A definição de rato jovem pré-púbere foi a mesma utilizada como rato jovem no estudo de Pabis et al., que consideraram os ratos adultos quando atingem a idade entre 50 a 60 dias, ^{(9),(51)} sendo considerados jovens pré-púberes os animais com idade inferior a 60 dias.

Cada grupo foi subdividido em dois subgrupos: subgrupos infartados, denominados J1 para os ratos jovens e A1 para os ratos adultos. Cada subgrupo foi composto de 22 e 24 animais, respectivamente. Os subgrupos controles, denominados J2 para os ratos jovens e A2 para ratos adultos, foram compostos por 13 ratos cada. Os animais foram identificados adequadamente com um número inscrito na cauda, no dia da realização do ato cirúrgico.

Os animais dos subgrupos J1 e A1 foram submetidos à ligadura cirúrgica da artéria coronária esquerda para indução do infarto do miocárdio com idades de 28 dias e 153 dias, respectivamente. Nos subgrupos controles (subgrupos J2 e A2), os animais foram submetidos a operação simulada (*sham operation*), com abertura do tórax, do pericárdio e posterior fechamento do tórax, sem ligadura da artéria coronária.

Todos os animais foram submetidos a estudo ecocardiográfico para análise da evolução funcional do infarto do miocárdio em ratos jovens e adultos. O estudo ecocardiográfico foi realizado com 7, 30 e 60 dias após o infarto do miocárdio. Nesses períodos do estudo alguns animais foram eutanasiados após seleção por sorteio, os quais constituíram a amostra deste estudo.

Sete dias após a realização do infarto do miocárdio, todos os animais foram submetidos ao estudo ecocardiográfico. Os ratos com fração de ejeção maior que 40% foram excluídos, assim como os animais com anomalias estruturais do coração, morte não programada durante o estudo e problemas de identificação.

Os resultados do estudo ecocardiográfico compuseram a Dissertação de Mestrado do Dr. Francisco Pabis que foi apresentada nesta Instituição.

Todos os animais receberam cuidados em concordância com os “Princípios de Cuidados com Animais de Laboratório”, formulado pela Sociedade Nacional de Pesquisa Médica e Guia de Cuidados com Animais de Laboratório, preparada pela Academia Nacional de Ciências e publicado pelo

Instituto Nacional de Saúde, segundo os princípios do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1999).

4.4 VARIÁVEIS ESTUDADAS

Neste estudo foram analisados os seguintes aspectos: 1) peso coração e relação peso coração/peso corporal (dados previamente coletados); 2) espessura das paredes do ventrículo esquerdo; 3) tamanho do infarto na microscopia que foi classificado em tipo I e II; foi denominado tipo I o que atingia acima de 25% da área total do ventrículo esquerdo, e tipo II quando menor que 25%; 4) Imunohistoquímica para índice proliferativo (PCNA) e proteínas contráteis (HHF-35).

4.5 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA

Todos os animais foram submetidos à eutanásia e seus corações retirados para análise morfométrica .

Cada um dos corações foi seccionado em quatro partes no sentido coronal, sendo uma do ápice, uma da base e duas fatias coronais da porção média. Os quatro fragmentos foram montados em um único bloco de parafina para posterior retirada dos níveis de cortes histológicos.

De cada bloco parafinado foi realizada uma lâmina com os quatro fragmentos já citados, corados com solução de H&E para análise morfométrica.

Os exames foram realizados em microscópio óptico (Olympus®RX50) (figura 20) acoplado a uma câmera de vídeo, que captura a imagem digital a um computador com programa de análise de imagens (digitais Image Pro-plus - Média Cybermetics, Silver Spring, Mayland, USA). Para o estudo dessas lâminas, utilizou-se objetiva de 4x.



Figura 1 - Microscópio óptico Olympus® RX 50 utilizado
Fonte: A Pesquisadora

As lâminas obtidas foram avaliadas pela patologista que verificou o tamanho do infarto pela microscopia, e depois foram realizadas 30 medidas do septo e da parede livre do ventrículo esquerdo em todas as lâminas.

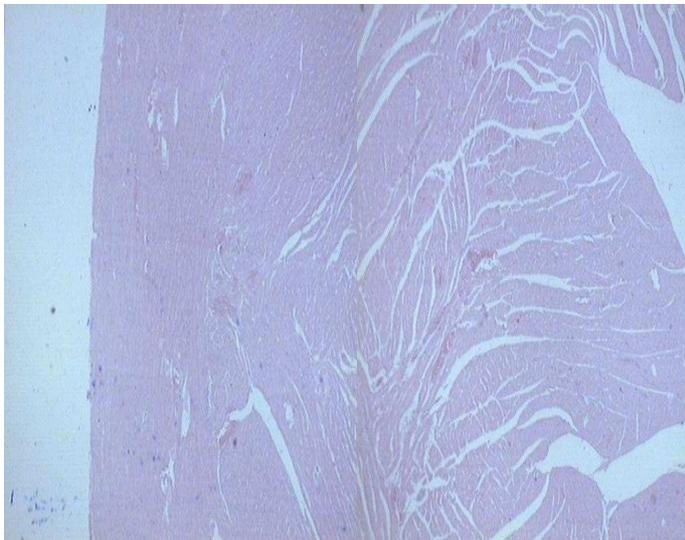


Figura 2 – Corte histológico de parede livre do VE
objetiva quatro vezes
Fonte: A Pesquisadora

4.5 AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUIMICA

Após leitura das lâminas em relação à morfometria, foi dado início à confecção de blocos multiamostrais ou *Tissue Microarray* (TMA). Esta consiste na montagem de blocos de parafina com múltiplas amostras, para confecção de lâminas histológicas a fim de realizar técnicas imunoistoquímicas.

As lâminas já confeccionadas para a morfometria foram dirigidas ao patologista, para observá-las e proceder à localização de regiões representativas do infarto do miocárdio, bem como de regiões distante dele, sendo que estas áreas foram marcadas com caneta de retroprojeção. Por meio do sistema de espelho, a lâmina marcada foi utilizada para localização das mesmas regiões nos blocos de parafina (blocos-doadores).

As áreas marcadas nesses blocos foram puncionadas com *punch* para a construção de blocos multiamostrais (TMA) ou blocos-receptores.

Para que as amostras de TMA fossem posteriormente localizadas no bloco-receptor, conforme sua identificação inicial, foi confeccionado um mapa que serviu de apoio, do tipo plano cartesiano, onde as colunas foram identificadas com as letras A, B,C e D (duas amostras por caso), e as linhas, com números que variaram entre 1 e 4 ou 5, representando os casos do grupo.

Uma vez montado o mapa, os blocos-doadores foram organizados na bancada anexa àquela da confecção do bloco-receptor, conforme o mapa, da forma que foram utilizados em sequência, para montagem do bloco-receptor final.

Esse processo de organização minimizou possíveis erros na localização das amostras durante a montagem do bloco-receptor. Utilizando-se de um *punch* de 3mm pré-aquecido foram retiradas amostras do bloco-doador, que foram inseridas numa caixa identificadora para depois ser montado o bloco-receptor.

As duas amostras retiradas de um bloco-doador foram colocadas no bloco-receptor, conforme este mapa. Foram confeccionadas nove TMAs

denominados M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 com três a dez casos cada; em cada TMA do estudo foram colocadas duas amostras, área infartada e não infartada, para cada caso, conforme figura abaixo

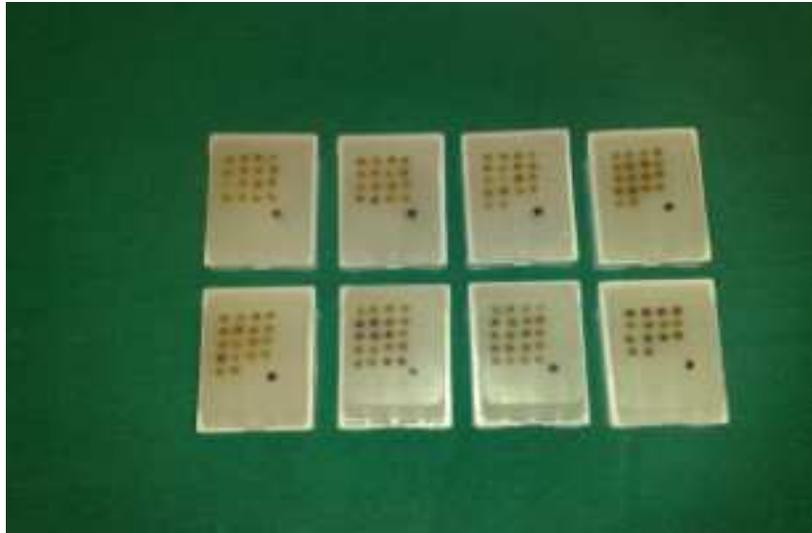


Figura 3 – Blocos de TMA

Fonte: A Pesquisadora

Após a confecção do bloco-receptor foram feitas as lâminas para a realização das provas imunoistoquímicas.

Na técnica padrão da imunoistoquímica foram utilizados os anticorpos primários, seguindo as suas características de análise, conforme segue.

1) Para estudo do ciclo celular:

Antiantígeno nuclear de proliferação celular - PCNA (Dako®): reage com o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), onde cora o núcleo de células proliferativas (em fase de mitose) em todos os tecidos humanos;

2) Na análise de proteína contrátil:

Antiactina muscular - HHF 35 (Dako®): a qual é capaz de marcar a fração gama e alfa da actina em células musculares lisas, estriadas esqueléticas e cardíacas.

Para a leitura das lâminas de imunoistoquímica, tendo em vista que as amostras obtidas por TMA são circulares, estas foram divididas em cinco

campos no caso de HHF-35 e três campos no PCNA, e analisados de maneira quantitativa (simples ou morfométrica).

Tais métodos de leitura levaram em conta a especificidade de cada anticorpo e sua expressão no tecido estudado.

4.5.1 Método de Leitura do Anticorpo de Investigação de Proteína Contrátil

O HHF35 é um marcador citoplasmático que cora a fração alfa e gama da actina, que constitui os sarcômeros musculares.

Para a leitura deste foi realizada a morfometria. Este método detecta a intensidade da cor e a converte numa medida de área, tendo como unidade o micrômetro. Utilizou-se a microscopia óptica, objetiva com aumento de 200 vezes, microscópio binocular marca Olympus® modelo BX50, acoplado a um computador marca DELL® onde se encontra instalado o *software* Image Pro Plus® para realização da análise.

A partir da digitalização da imagem do campo o *software*, tendo como referência uma cor padronizada pelo observador, que no caso da imunistoquímica é o castanho, calcula a área da amostra, que apresenta aquela cor referente. Esta fase da pesquisa foi realizada por um observador, que analisou cada lâmina sem o conhecimento do grupo amostral e do anticorpo utilizado.

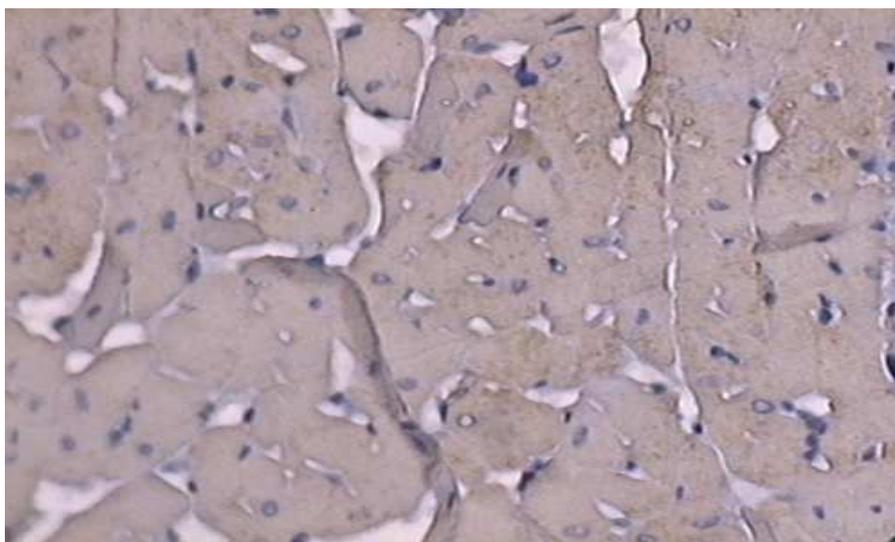


Figura 5 – Corte histológico do anticorpo HHF35
Aumento 20 vezes
Fonte: A Pesquisadora

4.5.2 Método de Leitura do Anticorpo de Investigação do Ciclo Celular

As lâminas do anticorpo PCNA foram analisadas por meio do método quantitativo simples, tendo em vista as suas características. O PCNA é um anticorpo, cujo sítio marcador é o núcleo celular e sua função é corar células proliferativas em fase de mitose, por isso realizou-se a contagem dos núcleos com muito cuidado observando as características do cardiomiócito. Utilizou-se a microscopia óptica, objetiva com aumento de 400 vezes, microscópio binocular marca Olympus® modelo BX50, acoplado a um computador marca DELL® onde se encontra instalado o *software* Image Pro Plus® para realização da análise.

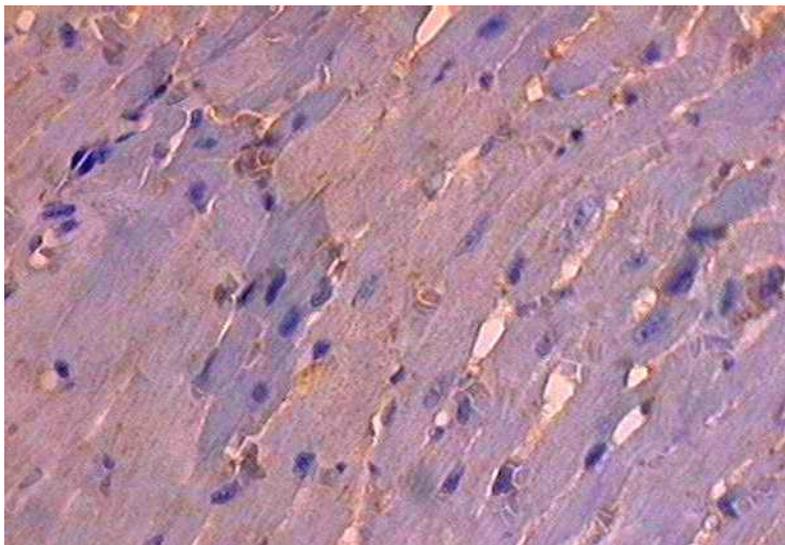


Figura 4 – Corte histológico do anticorpo PCNA
Aumento 40 vezes
Fonte: A Pesquisadora

4.6 ANÁLISE ESTÁTISTICA

Os resultados obtidos no estudo foram expressos por médias, medianas, valores mínimos e máximos e desvios padrão.

Para a comparação de grupos independentes foi usado o teste *t de Student* para amostras independentes, levando-se em consideração a homogeneidade das variâncias, ou para a comparação de dois grupos em relação às variáveis do estudo, foi considerado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Para a comparação de três grupos foi usado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística.

Os dados foram organizados em planilha *Excel* e analisados com o programa computacional *Statistica v.8.0*.

5 RESULTADOS

Foram utilizados 68 corações de ratos, sendo 33 corações de ratos pré-púberes que iniciaram o estudo com idade de 28 dias e 35 corações de ratos adultos que iniciaram o estudo com idade de 153 dias.

Compuseram o grupo pré-púbere 20 corações infartados e 13 corações controle e o grupo adulto 23 corações infartados e 12 corações controle.

5.1 PESO CORPORAL X PESO DO CORAÇÃO

Observou-se diferença no peso corporal no grupo pré-púbere infartado 30 dias em relação ao seu controle $p=0,003$ e peso do coração no grupo pré-púbere infartado sete dias quando comparado ao seu controle $p=0,048$, demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1- Distribuição e comparação do peso corporal e do peso do coração em gramas nos grupos adulto e pré-pubere infartados e seus controles

	n	Infartados	n	Controles	P*	
<i>Peso corporal – pré-púbere</i>	7 dias	8	176,49±37,74	4	206,44±22,66	0,283
	30 dias	9	265,34±8,72	4	312,33±17,37	0,003
	60 dias	5	314,92±35,82	5	332,6±28,32	0,421
Peso corporal - adulto	7 dias	9	335,92±21,39	3	365,99±20,71	0,100
	30 dias	8	357,56±19,31	3	381,81±23,69	0,194
	60 dias	7	388,46±27,46	7	355,62±48,19	0,128
Peso coração – pré-púbere	7 dias	8	0,96±0,15	4	1,34±0,45	0,048
	30 dias	9	1,1±0,14	4	1,15±0,09	0,604
	60 dias	5	1,34±0,1	5	1,38±0,37	0,310
Peso coração - adulto	7 dias	9	1,34±0,21	3	1,16±0,12	0,145
	30 dias	8	1,49±0,23	3	1,29±0,1	0,085
	60 dias	7	1,37±0,18	7	1,18±0,27	0,209

Legenda: (g): grama

(*) Teste não-paramétrico de Mann-Whitney, $p<0,05$.

5.2 TIPO DE INFARTO DO MIOCÁRDIO

O infarto foi classificado por meio da microscopia em tipo I e tipo II. No grupo adulto e pré-púbere sete dias pós-infarto, a incidência foi de 25% de infarto tipo I (ambos com dois casos) e tipo II 75% (ambos com seis casos). No

grupo adulto e pré-púbere 30 dias pós-infarto, 12,5% de infarto tipo I (ambos com um caso) e 87,5% de infarto tipo II (ambos sete casos). No grupo adulto e pré-púbere 60 dias pós-infarto, 100% de infarto tipo II (sete e quatro casos respectivamente).

5.3. ANÁLISE MORFOMÉTRICA

As análises da espessura do septo ventricular e parede livre do ventrículo esquerdo dos ratos pré-púbere e adulto infartado, bem como seus controles estão demonstradas na tabela 2.

Tabela 2 - Distribuição e comparação das espessuras do septo ventricular e da parede livre do ventrículo esquerdo em micrômetros nos grupos adulto e jovem infartado e seus controles

		n	Infartado	n	Controle	P*
Septo interventricular – pré-púbere	7 dias	8	1809,84±279,18	4	2209,81±280,40	0,073
	30 dias	8	2286,70±569,87	4	1984,65±613,34	0,368
	60 dias	4	2862,54±81,20	5	2470,45±479,47	0,413
Septo interventricular - adulto	7 dias	8	2930,49±842,84	3	2318,93±933,22	0,497
	30 dias	8	2367,51±528,98	4	2831,96±263,13	0,154
	60 dias	7	2056,44±855,26	5	2582,84±810,89	0,530
PLVE- pré-púbere	7 dias	6	2320,23±666,46	4	2848,11±718,98	0,476
	30 dias	7	2485,43±613,34	4	2572,14±706,20	1
	60 dias	4	4555,79±646,83	5	3006,11±406,05	0,016
PLVE- adulto	7 dias	6	3345,72±884,60	3	3577,91±1184,47	0,905
	30 dias	6	3049,64±689,42	4	3541,60±187,07	0,171
	60 dias	6	2642,41±855,26	5	3119,390±850,63	0,429

(*) Teste não-paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0,05$

Legenda: PLVE- parede livre do ventrículo esquerdo

Não se encontra diferença entre o grupo adulto infartado e seus respectivos controles com sete, 30 ou 60 dias pós-infarto. Quanto ao grupo pré-púbere, observa-se aumento da espessura da parede livre do ventrículo esquerdo 60 dias pós-infarto quando comparado ao seu controle.

As evoluções das espessuras do septo interventricular e da parede livre do ventrículo esquerdo do grupo adulto em relação ao seu controle estão demonstradas na Figura 6 e 7.

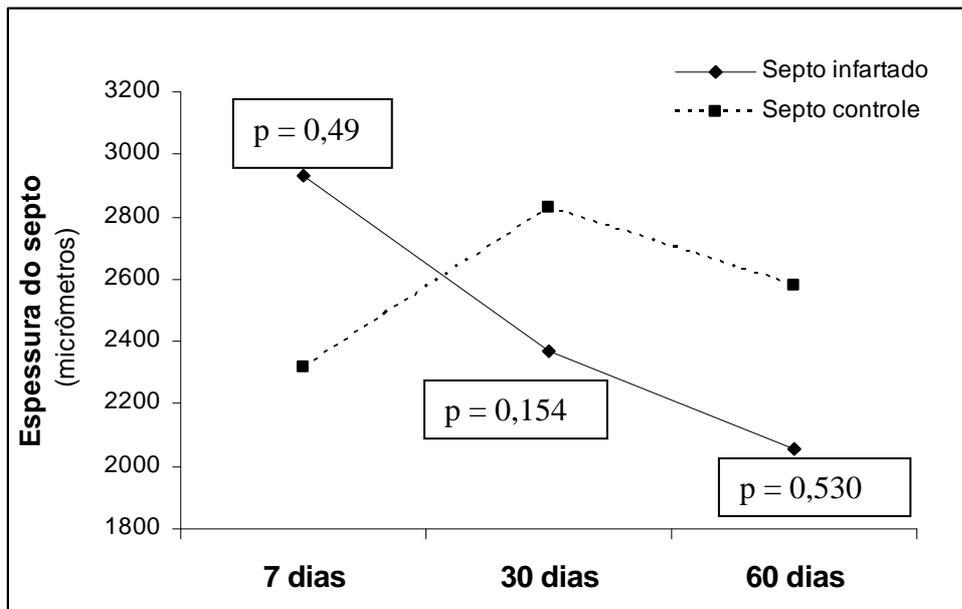
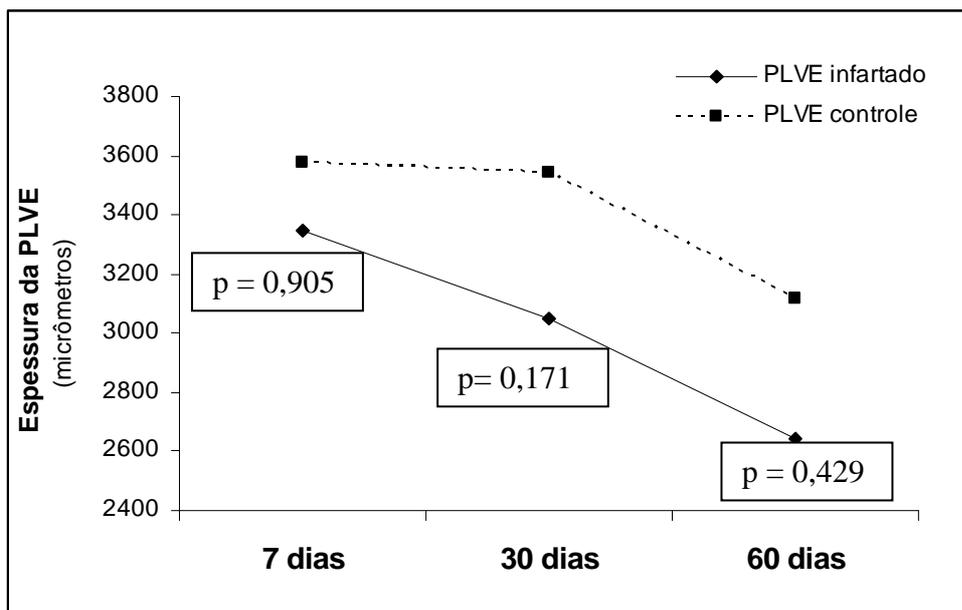


Figura 6- Média da espessura do septo ventricular em micrômetros no grupo rato adulto pós-infarto e seu controle.



Legenda: PLVE- parede livre do ventrículo esquerdo.

Figura 7- Média da espessura da parede livre do ventrículo esquerdo em micrômetro no grupo rato adulto pós-infarto e seu controle.

As evoluções das espessuras do septo ventricular e da parede livre do ventrículo esquerdo no grupo rato pré-púbere pós-infarto e seu controle estão demonstradas nas figuras 8 e 9.

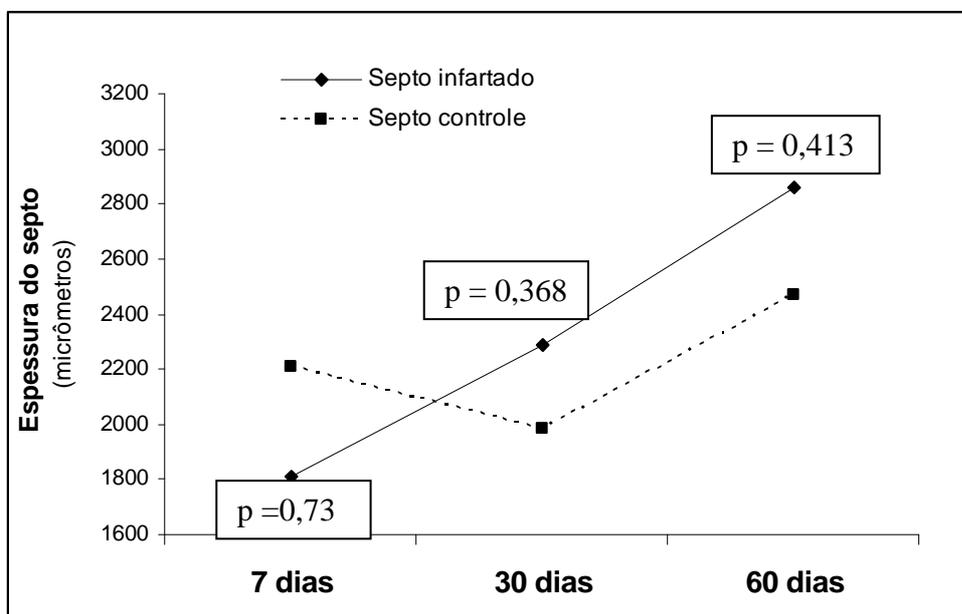
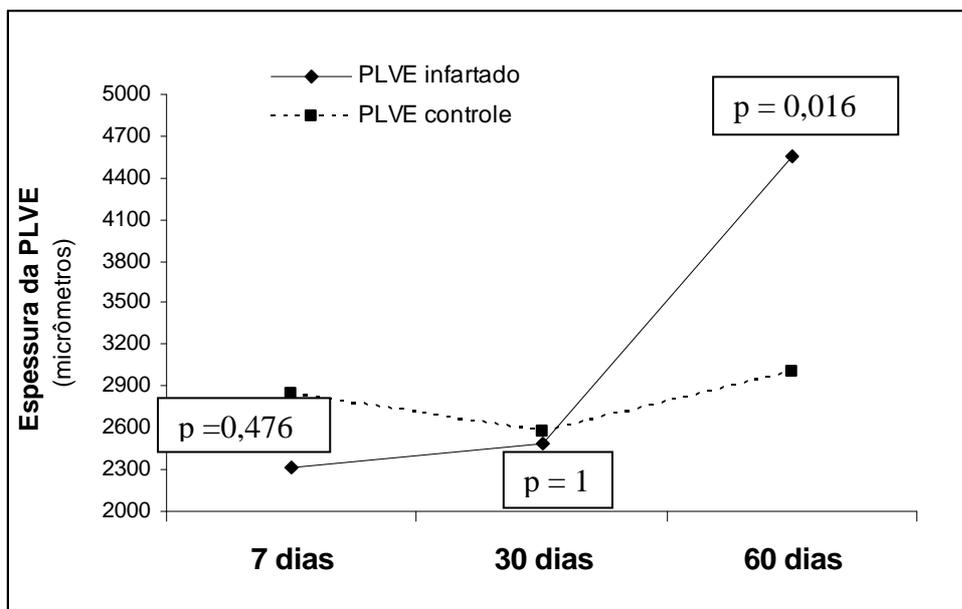


Figura 8- Média da espessura do septo ventricular em micrômetros no grupo rato pré-púbere e seu controle.

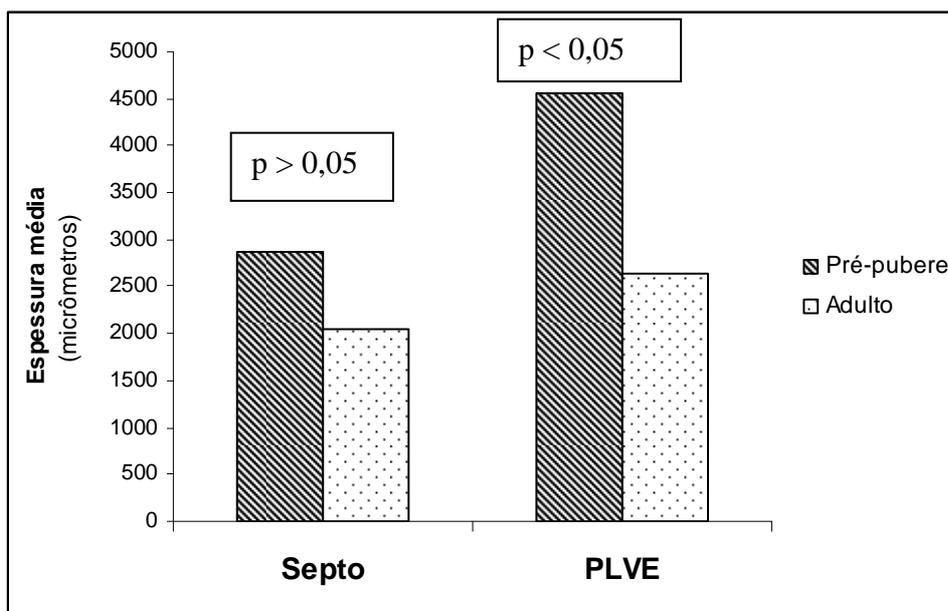


Legenda: PLVE - parede livre do ventrículo esquerdo

Figura 9- Média da espessura da parede livre do ventrículo esquerdo em micrômetro no grupo rato pré-púbere e seu controle

No grupo pré-púbere 60 dias pós-infarto, ocorreu maior espessura da parede livre do ventrículo esquerdo no subgrupo infartado $p < 0,05$.

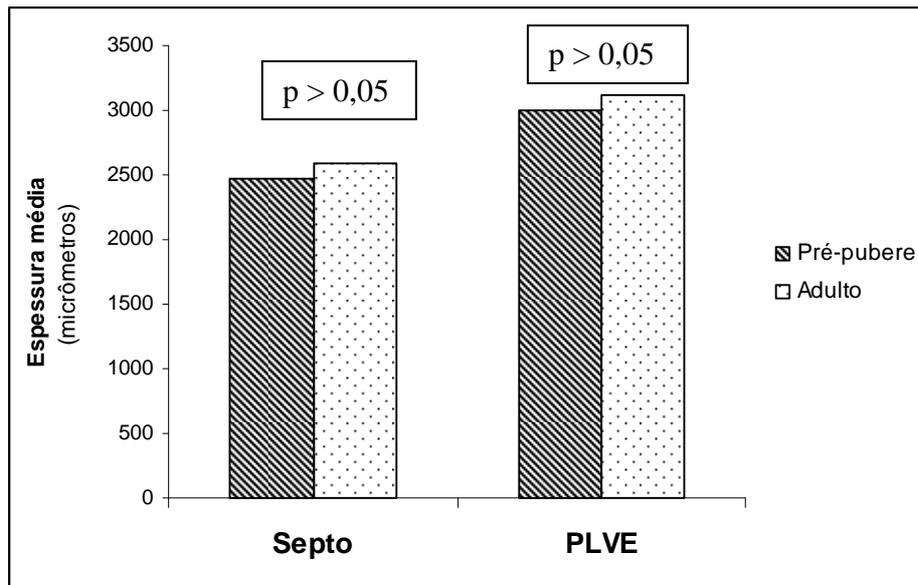
Quando se compara o subgrupo pré-púbere com o adulto 60 dias pós-infarto, o subgrupo pré-púbere apresenta maior espessura de parede livre do ventrículo esquerdo $p < 0,05$. (Figura 10)



Legenda: PLVE- parede livre do ventrículo esquerdo

Figura 10- Média de espessura do septo ventricular e parede livre do ventrículo esquerdo em micrômetros em ratos pré-púberes e adultos 60 dias pós-infarto.

Comparando-se o controle adulto e pré-púbere com 60 dias pós cirurgia simulada, não se verificou diferença na espessura do septo ventricular e na parede livre do ventrículo esquerdo. (Figura 11)



Legenda: PLVE - parede livre do ventrículo esquerdo

Figura 11– Média de espessura do septo ventricular e parede livre do ventrículo esquerdo em micrômetros em ratos pré-púberes e adultos controles 60 dias pós cirurgia simulada.

5.4 RESULTADO DA REAÇÃO PARA ANTICORPO DE INVESTIGAÇÃO DE PROTEINA CONTRÁTIL E CICLO CELULAR.

Comparando o grupo de ratos adultos e jovens pré-púberes infartados no que se refere aos marcadores imunoistoquímicos utilizados (HHF35 e PCNA), encontrou-se diferença no HHF35 tanto próximo ($p=0,04$) quanto longe ($p= 0,02$) do infarto entre o grupo jovem pré-pubere e adulto com 60 dias. Estes dados estão demonstrados na Figura 12.

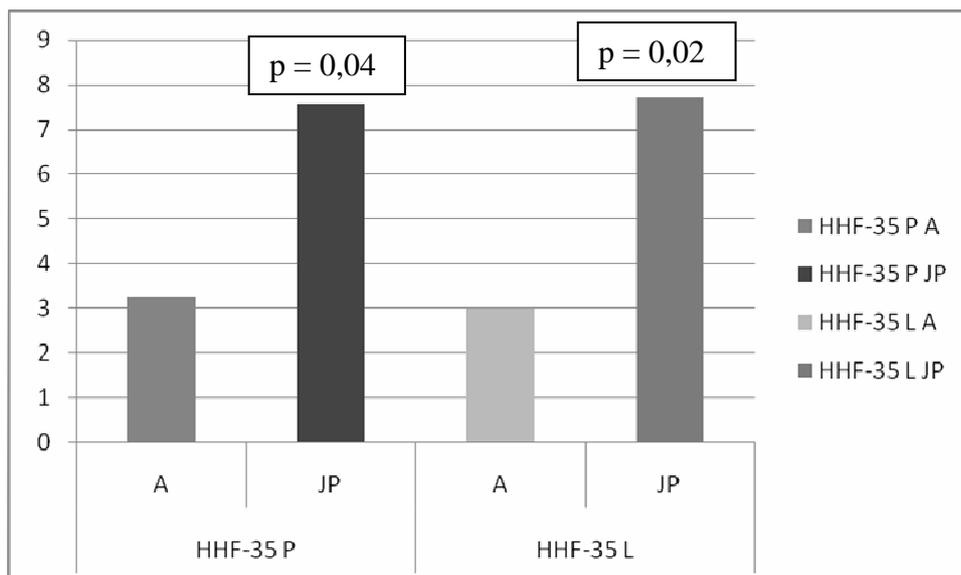


Figura 12 – Média do HHF35P e HHF35L no grupo rato adulto e grupo rato Jovem pré-púbere 60 dias pós-infarto.

Legenda: HHF35P- marcador próximo do infarto
HHF35L- marcador longe do infarto

Não se observou diferença entre o grupo adulto em relação ao seu controle, nem do grupo jovem pré-púbere em relação ao seu controle referente ao HHF35 próximo ao infarto

Tabela 3- Resultado da análise dos grupos amostrais com o anticorpo HHF35 próximo ao infarto

Dia	Idade	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p* (estudo x controle)
7 dias	Jovem	Estudo	8	210244	212751	178930	222117	13450	
		Controle	4	4515527	217488	206756	17420375	8603234	0,461
	Adulto	Estudo	7	205374	214151	148000	224101	26347	
		Controle	3	184386	185977	172570	194611	11106	0,117
30 dias	Jovem	Estudo	9	199860	207214	147509	224854	27064	
		Controle	4	220291	222160	213008	223837	5033	0,330
	Adulto	Estudo	8	211188	215342	184759	222664	13358	
		Controle	4	5723518	204016	184306	22301733	11052156	1
60 dias	Jovem	Estudo	4	192384	195188	166524	212635	19967	
		Controle	5	216853	222850	191600	224413	14137	0,063
	Adulto	Estudo	7	216478	220986	196768	222782	9418	
		Controle	6	210305	213439	194201	222577	12216	0,295

* Teste não-paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0,05$

Na análise do grupo adulto infartado sete e 60 dias em relação ao seu controle observou-se significativo aumento da concentração de HHF-35 longe do infarto, com $p=0,017$ e $p=0,022$, respectivamente.

No grupo jovem pré-púbere sete dias pós-infarto em relação ao seu controle observou-se aumento da concentração de HHF35, com $p=0,008$.

Estes resultados demonstraram que em ambos os grupos experimentais ocorreram maior atividade protéica nestes intervalos de tempo na área longe do infarto.

Tabela 4 - Resultado da análise dos grupos amostrais com o anticorpo HHF35 longe do infarto

Dia	Idade	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p* (estudo x controle)
7 dias	Jovem	Estudo	8	220020	221530	209956	224474	4806	
		Controle	4	202067	203331	188656	212949	10142	0,008
	Adulto	Estudo	7	224629	223300	220075	235593	5051	
		Controle	3	183143	177865	164578	206985	21691	0,017
30 dias	Jovem	Estudo	9	216310	217017	202490	225321	9188	
		Controle	4	214833	215380	204285	224288	10581	0,604
	Adulto	Estudo	8	218624	221310	202241	223846	7081	
		Controle	4	197110	196468	172989	222516	21696	0,109
60 dias	Jovem	Estudo	4	217713	218006	213169	221670	3876	
		Controle	5	215210	216679	206377	220028	5238	0,556
	Adulto	Estudo	7	222776	222999	220248	224990	1765	
		Controle	6	183931	187140	143191	223849	27071	0,022

* Teste não-paramétrico de Mann-Whitney, $p<0,05$

Comparando o grupo jovem pré-púbere infartado ao seu controle no momento sete dias e 60 dias pós-infarto, verificou-se diferença no PCNA, $p=0,016$, próximo a lesão nestes dois momentos, o que denota atividade proliferativa. No grupo rato adulto infartado observou-se que o PCNA foi significativo, $p=0,014$, no momento de 60 dias. Constatou-se, então, que o rato jovem inicia a proliferação próxima ao infarto mais precocemente do que o rato adulto.

Tabela 5- Resultado da análise dos grupos amostrais com o anticorpo PCNA próximo do infarto

Dia	Idade	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p* (estudo x controle)
7 dias	Jovem	Estudo	8	7,3	5,5	1,0	18,0	5,1	
		Controle	4	1,3	1,0	1,0	2,0	0,5	0,016
	Adulto	Estudo	7	5,4	4,0	0,0	13,0	4,3	
		Controle	3	0,3	0,0	0,0	1,0	0,6	0,067
30 dias	Jovem	Estudo	9	5,6	3,0	0,0	26,0	8,1	
		Controle	4	0,5	0,5	0,0	1,0	0,6	0,0503
	Adulto	Estudo	8	4,0	3,5	1,0	10,0	3,1	
		Controle	4	1,3	1,0	1,0	2,0	0,5	0,109
60 dias	Jovem	Estudo	4	4,5	4,0	1,0	9,0	3,3	
		Controle	5	0,2	0,0	0,0	1,0	0,4	0,016
	Adulto	Estudo	7	4,7	3,0	1,0	9,0	3,5	
		Controle	6	1,0	1,0	0,0	2,0	0,6	0,014

* Teste não-paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0,05$

A atividade proliferativa (PCNA) longe do infarto aconteceu apenas no momento 60 dias para ambos os grupos, $p = 0,01$. Demonstrando que ambos apresentam proliferação longe do infarto.

Tabela 6- Resultado da análise dos grupos amostrais com o Anticorpo PCNA longe do infarto

Dia	Idade	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p* (estudo x controle)
7 dias	Jovem	Estudo	8	9,3	8,0	3,0	18,0	5,4	
		Controle	4	3,5	4,0	0,0	6,0	3,0	0,073
	Adulto	Estudo	7	4,7	6,0	1,0	8,0	2,7	
		Controle	3	0,7	1,0	0,0	1,0	0,6	0,067
30 dias	Jovem	Estudo	9	5,2	6,0	1,0	12,0	3,9	
		Controle	4	1,3	1,0	1,0	2,0	0,5	0,076
	Adulto	Estudo	8	4,9	4,5	0,0	10,0	3,7	
		Controle	4	1,0	1,0	0,0	2,0	0,8	0,073
60 dias	Jovem	Estudo	4	5,8	6,0	4,0	7,0	1,5	
		Controle	5	2,0	1,0	1,0	4,0	1,4	0,016
	Adulto	Estudo	7	4,1	5,0	0,0	6,0	2,3	
		Controle	6	0,5	0,0	0,0	2,0	0,8	0,014

* Teste não-paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0,05$

6 DISCUSSÃO

6.1 ASPECTOS GERAIS

Encontram-se na literatura médica muitos estudos com modelos de isquemia miocárdica em ratos adultos, porém são raros os experimentos realizados em ratos jovens pré-púbere. O entendimento da resposta do miocárdio ao agravo nesta faixa etária poderá contribuir nos estudos sobre a capacidade regenerativa do miocárdio.

Crianças com doenças coronárias congênita, como origem anômala de coronária esquerda da artéria pulmonar, ou adquirida, como a doença de Kawasaki, podem desenvolver quadros isquêmicos importantes, porém após o tratamento há importante recuperação.⁽⁵⁾

No estudo de Azhar et al., que pesquisaram a influência da idade após período de isquemia miocárdica com subsequente reperfusão em ratos adultos jovens e adultos, observou que os animais adultos jovens tinham áreas de infarto substancialmente menor, sugerindo que os ratos mais velhos teriam menor capacidade de recuperação.⁽²⁰⁾

O presente estudo foi delineado para comparar a recuperação miocárdica pós-operatória de ratos Wistar macho, jovem pré-pubere e adulto, submetidos ao infarto do miocárdio por ligadura cirúrgica da artéria coronária esquerda. A escolha deste modelo animal deve-se à experiência acumulada no laboratório de pesquisa animal da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, onde vários trabalhos foram realizados utilizando esta metodologia.⁽⁵²⁾

Vários estudos fazem referência ao peso dos animais. O peso de ratos adultos da linhagem Wistar submetidos à cirurgia simulada (*sham operation*) mostra-se significativamente maior do que o peso dos ratos infartados com insuficiência cardíaca.^{(38),(53)} Estes dados contrapõem este estudo, pois os grupos de ratos adultos mostram pesos similares em todos os períodos analisados, denotando um ganho ponderal semelhante nos grupos casos e controles. Provavelmente estes animais não apresentavam insuficiência cardíaca significativa. Os ratos pré-púbere mostram aumento progressivo do peso, atingindo com 60 dias de pós-operatório valores semelhantes ao grupo

adulto, com diferença significativa somente entre o grupo infartado e controle aos 30 dias pós-infarto.

Os pesos dos corações dos ratos pré-púbere infartado apresentaram aumentos similares aos controles trinta dias após o infarto. Com 60 dias, os corações dos ratos infartados e controles, tanto jovens como adultos, apresentaram-se sem diferenças significativas. Os valores encontrados neste período são similares aos descritos na literatura.^{(38),(53)} Não encontramos dados semelhantes em relação ao peso do coração do rato pré-púbere aos sete dias pós-infarto.

Estudos corroboram com estes dados ao demonstrar que após infarto do miocárdio ocorre hipertrofia das áreas remanescentes, aumento da fibrose e hipertrofia do ventrículo direito. Isso aumenta a massa e melhora a função cardíaca, e explica assim a manutenção do peso do coração. A manutenção do peso coração também poder ser explicada pela substituição do tecido necrosado por colágeno na zona não infartada.^{(23),(38),(39),(53), (54)}

Nos ratos jovens, outros mecanismos podem estar envolvidos na manutenção do peso do coração. A divisão celular virtualmente cessa com seis a sete dias de idade, muito embora por métodos de marcação do ciclo celular sejam identificados cardiomiócitos em progressão. A célula cardíaca poderia reentrar no ciclo celular para compensar a perda de células da zona infartada.

6.2 RESULTADOS MORFOMÉTRICO E IMUNOISTOQUIMICO

O coração do rato cresce principalmente por hiperplasia das células aumentando a massa cardíaca durante o período fetal. Após o nascimento, ocorre a mudança da forma de crescimento hiperplásico para hipertrófico, que é acompanhada por mudanças da anatomia, fisiologia e bioquímica, semelhante ao ser humano.^{(11),(13),(14)}

Observou-se no estudo que evolutivamente os ratos adultos pós-infarto e controles apresentaram menor espessura do septo e parede livre do ventrículo esquerdo.

O rato adulto infartado ou não apresenta os efeitos do envelhecimento fisiológico do coração.

Sabe-se hoje da existência destes efeitos. O miocárdio com o envelhecimento apresenta menor número de miócitos, aumento na quantidade de colágeno levando a diminuição do tamanho da cavidade do ventrículo esquerdo.(55))

Estudos pós-infarto do miocárdio em ratos adultos dão sustentação aos resultados encontrados, pois se observou que após infarto do miocárdio ocorre perda do tecido de sustentação, necrose das miofibrilas e desintegração do colágeno interfibrilar levando ao afinamento da parede cardíaca e à alteração no formato do ventrículo esquerdo.^{(22),(51)},

Segundo Weissman, que estudou o mecanismo celular da expansão do infarto do miocárdio, a menor espessura da parede está relacionada à diminuição do número de células observadas com a expansão do infarto; isso ocorre pela modificação dos cardiomiócitos e da adição de novos cardiomiócitos em série.⁽²⁵⁾

Outra explicação é a existência de apoptose, pois pesquisa sobre morte celular, crescimento e regeneração após falência e insuficiência cardíaca demonstrou que esta forma de morte celular promove a reorganização no ventrículo resultando em menor espessura da parede e aumento do volume da câmara.⁽⁵⁶⁾

Field, estudando a modulação do ciclo celular do cardiomiócito em animais alterados geneticamente, concluiu que nos mamíferos adultos a renovação celular do cardiomiócito parece ser baixo sugerindo que os cardiomiócitos adultos não possuem bom índice proliferativo.⁽¹⁵⁾

Sabe-se que as crianças pré-púberes apresentam mecanismos fisiológicos para maximizar seu crescimento nesta fase, bem como o rato, e o coração está incluído neste processo.⁽⁵⁷⁾

Nos ratos infartados pré-púbere observou-se que evolutivamente ocorreu aumento da espessura do septo interventricular e parede livre do ventrículo esquerdo em relação aos controles. E aos 60 dias pós-infarto, quando comparados aos ratos adultos, os pré-púberes apresentam maior espessura da parede livre do ventrículo esquerdo, não acontecendo o mesmo quando comparado os seus controles.

Não existem na literatura dados em relação ao jovem pré-púbere. Encontramos apenas relatos de animais adultos jovens.^{(8),(9),(21)}

Autores citam que após infarto do miocárdio em ratos adultos jovens ocorrem hipertrofia compensatória e dilatação ventricular, aspectos relacionados à remodelação ventricular. O estresse a qual é submetida à parede ventricular poderia ser um estímulo a hipertrofia e proliferação celular e a diferença na resposta entre ratos jovens e adultos pode estar relacionada à capacidade de recuperação do miocárdio jovem. A renovação dos cardiomiócitos pode ser uma causa, pois ela ocorre em taxas maiores nos ratos jovens.^{(39), (58),(59)}

Estudos sobre diferenciação, morte, crescimento e regeneração de cardiomiócitos citam que o infarto do miocárdio pode ser o estímulo para o cardiomiócito reentrar no ciclo celular, sendo que os ratos jovens apresentam maior atividade de síntese de proteínas necessárias para a progressão do ciclo celular, e na replicação dos cardiomiócitos, levando a restaurar a função cardíaca.^{(12),(56)}

Outros estudos referem que em alguns corações a hipertrofia pode justificar o melhor desempenho e a recuperação da fração de ejeção do ventrículo esquerdo, pois a hipertrofia leva a um menor estresse da parede e conseqüentemente ao melhor desempenho cardíaco.^{(39),(58)}

Autores como Nadal-Ginard et al, Naseem et al, Schulze e Lee demonstram diferenças evolutivas entre o miocárdio adulto jovem e adulto. Segundo eles, miócitos pequenos são jovens e têm habilidade para dividir e crescer, enquanto miócitos grandes perdem o potencial para hipertrofia e proliferação celular e estes estão mais presentes com a idade. O coração adulto não pode ser considerado um órgão pós-mitótico. Em embriões, o processo proliferativo é dominante, ocorre pouca fibrose, e em ratos adultos supõe-se que dependendo do grau de injúria ocorre maior grau de fibrose não havendo completa recuperação.^{(59),(60),(56, 61)} Estes dados fundamentam os achados no grupo rato pré-púbere

O aumento da espessura da parede livre do ventrículo esquerdo nos ratos pré-púbere não permite concluir se houve hipertrofia, proliferação celular ou ambas. Os marcadores imunoistoquímicos podem ajudar no entendimento deste processo.

Para estudar as mudanças fenotípicas dos cardiomiócitos foi utilizado um anticorpo primário, sendo este ligado à diferenciação (HHF35) e uma

proliferação celular (PCNA). A escolha deste anticorpo primário foi realizada com base na diferença entre a forma hipertrófica ou proliferativa. ^{(14),(62),(63)}

Neste estudo encontrou-se HHF35 que denota maior expressão proteica longe do infarto no grupo rato adulto aos sete e sessenta dias pós-infarto quando comparado ao seu controle.

No grupo rato jovem pré-púbere o HHF35 longe do infarto mostrou maior expressão proteica aos sete dias pós-infarto quando comparado ao controle e aos 60 dias pós-infarto quando comparado ao grupo rato adulto infartado.

Este dado que o rato jovem pré-púbere apresenta diferença no HHF35 aos 60 dias pós-infarto quando comparado ao grupo adulto coincide com o dado encontrado na morfometria, que é o aumento da espessura da parede livre do ventrículo esquerdo, demonstrando ter o grupo jovem pré-púbere mais expressão proteica sugerindo atividade hipertrófica e evolução pós-infarto diferente do grupo rato adulto.

Dados de pesquisas publicadas fundamentam estes achados demonstrando que a hipertrofia miocárdica acompanha o infarto para compensar a perda do tecido.⁽⁶⁴⁾ A perda de células contráteis do coração desencadeia uma série de reações na musculatura cardíaca como fatores hemodinâmicos, neuro-hormonais e genéticos, e essas reações podem levar ao aumento de volume dos miócitos. ^{(13),(39),(40)}

Abbate et al. usaram em seu estudo pós-infarto do miocárdio o HHF35 e demonstraram que existe um delicado balanço entre as células que morrem e sobrevivem, acontecendo o mesmo entre a apoptose e a hipertrofia.⁽⁶⁵⁾

Nadal-Ginard et al. referem que a perda segmentar do miocárdio por isquemia ativa a regeneração e a hipertrofia do miócito ou ambas contribuem para formação de nova massa cardíaca, porém miócitos grandes que são considerados velhos perdem potencial para hipertrofia e proliferação, e estas alterações aumentam com a idade.⁽⁵⁶⁾

Em relação à proliferação celular, tanto o rato adulto quanto o rato jovem pré-púbere infartado apresentaram diferença no PCNA quanto ao seu controle demonstrando atividade proliferativa pós-infarto nos dois grupos. Observa-se que o rato jovem inicia a atividade proliferativa mais precocemente. Não

podemos afirmar que a atividade proliferativa leve à recuperação do infarto tanto no rato jovem como no adulto.

Pesquisas referem a ocorrência de proliferação celular após isquemia.^{(43),(44),(17)} Estudo utilizando o marcador PCNA concluiu que o miocárdio de adulto após doença cardíaca pode renovar-se ou reparar-se.⁽³²⁾

Proteínas capazes de identificar o ciclo celular como o PCNA detectam a proliferação do miócito documentando que estes são hábeis em reentrar no ciclo celular. Este marcador de ciclo celular tem identificado proliferação de miócito em miocárdio viável após infarto.⁽⁵⁶⁾

Os cardiomiócitos pós-infarto em rato adulto podem dividir-se, porém não o suficiente para reparar eficientemente os danos do coração.⁽⁶⁶⁾

Após infarto do miocárdio em rato, ocorre divisão nuclear após dois dias, aumento do número de células na borda isquêmica que gradualmente decresce com o tempo, concluindo que a mitose de cardiomiócito está presente em coração de rato adulto, mas espacialmente e temporariamente restrita.⁽⁶⁷⁾

Este estudo sugere haver maior expressão proteica e atividade hiperplásica tanto no rato adulto como no rato pré-púbere, porém com maior expressão protéica, sugerindo atividade hipertrófica, evolutivamente maior no grupo de rato pré-púbere.

6.3 LIMITAÇÕES DESTA PESQUISA E CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA REGENERAÇÃO

Algumas medidas de espessura devido ao tamanho tiveram de ser realizadas com mais de uma fotografia, o que pode acarretar perda no tamanho da espessura.

O PCNA marca qualquer célula proliferativa; por isso, teve-se muito cuidado em observar o cardiomiócito, podendo com isso a contagem ser menor que a real. Portanto, especulamos que com o uso de outros marcadores o resultado de proliferação celular poderia ter sido diferente.

Outros mecanismos como proliferação de vasos e mudanças no colágeno podem estar envolvidos nesta diferença, e há necessidade de novas pesquisas para melhor elucidação.

Este estudo aumenta a compreensão em relação à resposta e aos agravos isquêmicos na infância e na adolescência, alterações frequentes e cada vez mais precoces. Demonstra também que neste período de máximo funcionamento do mecanismo fisiológico de crescimento, o coração, quando agredido, responde exacerbando ainda mais este estado natural de crescimento celular.

7 CONCLUSÕES

1. Este estudo demonstra que a evolução anatomopatológica pós-infarto do miocárdio é diferente no rato jovem pré-púbere quando comparado ao rato adulto.
2. Há maior espessura da parede livre do ventrículo esquerdo e maior expressão proteica no rato jovem pré-púbere quando comparado a seu controle e ao rato adulto infartado.
3. O rato jovem pré-púbere apresenta atividade proliferativa pós-infarto mais precoce quando comparado ao grupo adulto. O rato adulto e o rato jovem pré-púbere infartado apresentam proliferação celular quando comparados ao seu controle.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Reich JD, Campbell R. Myocardial infarction in children. *Am J Emerg Med* 1998 May;16(3):296-303.
2. <http://www.americanheart.org>. capturado em 07/2004 [database on the Internet]2004.
3. <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?db2003/c08.def.In>. 2004 [maio, 2004].
4. I Diretriz de Prevenção da Aterosclerose na Infância e na Adolescência. *Arq Bras Cardiol*. 2005.
5. Birk E, Stamler A, Katz J, Berant M, Dagan O, Matitiau A, et al. Anomalous origin of the left coronary artery from the pulmonary artery: diagnosis and postoperative follow up. *Isr Med Assoc J* 2000 Feb;2(2):111-4.
6. Saker DM, Walsh-Sukys M, Spector M, Zahka KG. Cardiac recovery and survival after neonatal myocardial infarction. *Pediatr Cardiol* 1997 Mar-Apr;18(2):139-42.
7. Anversa P, Beghi C, Kikkawa Y, Olivetti G. Myocardial infarction in rats. Infarct size, myocyte hypertrophy, and capillary growth. *Circ Res*. 1986 Jan:26-37.
8. Wexler BC. Myocardial infarction in young vs old male rats: pathophysiologic changes. *Am Heart J* 1978 Jul;96(1):70-80.
9. Pabis FC, Miyague NI, Francisco JC, Woitowicz V, Carvalho KA, Faria-Neto JR, et al. Echocardiographic assessment of myocardial infarction evolution in young and adult rats. *Arq Bras Cardiol* 2008 Nov;91(5):321-6.
10. Tarnavski O, McMullen JR, Schinke M, Nie Q, Kong S, Izumo S. Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies. *Physiol Genomics* 2004 Feb 13;16(3):349-60.
11. Bishop SP. The myocardial cell: normal growth, cardiac hypertrophy and response to injury. *Toxicol Pathol*. 1990:438-53.
12. Anversa P, Kajstura J. Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ Res*. 1998 Jul 13:1-14.
13. 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 Apr:495-502.

14. Corstius HB, Zimanyi MA, Maka N, Herath T, Thomas W, van der Laarse A, et al. Effect of intrauterine growth restriction on the number of cardiomyocytes in rat hearts. *Pediatr Res*2005 Jun;57(6):796-800.
15. Field LJ. Modulation of the cardiomyocyte cell cycle in genetically altered animals. *Ann N Y Acad Sci*2004 May;1015:160-70.
16. Wulfsohn D, Nyengaard JR, Tang Y. Postnatal growth of cardiomyocytes in the left ventricle of the rat. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2004 Mar:236-47.
17. Zornoff LA, Spadaro J. [Ventricular remodeling after acute myocardial infarction. Concepts, pathophysiology and therapeutic approach]. *Arq Bras Cardiol.* 1997 Jun:453-60.
18. Gingell RL. Developmental biology of mammalian myocardium. In: Freedom R, editor. *Neonatal Heart Disease.* 1 ed ed. Toronto: Springer-Verlag; 1992. p. 35-44.
19. Lefterovich JM, Bedelbaeva K, Samulewicz S, Zhang XM, Zwas D, Lankford EB, et al. Heart regeneration in adult MRL mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Aug 14:9830-5.
20. Azhar G, Gao W, Liu L, Wei JY. Ischemia-reperfusion in the adult mouse heart influence of age. *Exp Gerontol.* 1999 Aug:699-714.
21. Gould KE, Taffet GE, Michael LH, Christie RM, Konkol DL, Pocius JS, et al. Heart failure and greater infarct expansion in middle-aged mice: a relevant model for postinfarction failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*2002 Feb;282(2):H615-21.
22. Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation.* 2000 Jun 27:2981-8.
23. Epifanio HB, Zornoff LA, Matsubara BB, de Paiva SA, Inoue RM, Matsubara LS. [Myocardial remodeling after experimental acute myocardial infarction in rats. Effect of renin-angiotensin-aldosterone blockade]. *Arq Bras Cardiol.* 2005 Jan:10-4.
24. Grossman W, Lorell BH. Adaptive and maladaptive processes: hemodynamic aspects of left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circ.* 1993 Jun:VII28-VII30.
25. Weisman HF, Bush DE, Mannisi JA, Weisfeldt ML, Healy B. Cellular mechanisms of myocardial infarct expansion. *Circulation.* 1988 Jul:186-201.
26. Broberg CS, Pantely GA, Barber BJ, Mack GK, Lee K, Thigpen T, et al. Validation of the myocardial performance index by echocardiography in mice: a noninvasive measure of left ventricular function. *J Am Soc Echocardiogr*2003 Aug;16(8):814-23.
27. Anversa P. Myocyte death in the pathological heart. *Circ Res.* 2000 Feb 4:121-4.

28. Alberts BB, D; Johnson, A et al. . Fundamentos da biologia celular. 2 ed. Porto Alegre: ArtMed; 2006.
29. Cooper G. A Célula: uma abordagem molecular. 3ed. Porto Alegre2007.
30. Dowell JD, Field LJ, Pasumarthi KB. Cell cycle regulation to repair the infarcted myocardium. *Heart Fail Rev*. 2003 Jul:293-303.
31. Soopaaan MK, MM et al. Cardiomyocytes DNA synthesis and binucleation during mutine development. *Am J Physiol*1996;271:2183-89.
32. Arbustini E, Diegoli M, Grasso M, Fasani R, D'Armini A, Martinelli L, et al. Expression of proliferating cell markers in normal and diseased human hearts. *Am J Cardiol*1993 Sep 1;72(7):608-14.
33. Kajstura J, Leri A, Castaldo C, Nadal-Ginard B, Anversa P. Myocyte growth in the failing heart. *Surg Clin North Am*. 2004 Feb:161-77.
34. Tamamori-Adachi M, Ito H, Sumrejkanchanakij P, Adachi S, Hiroe M, Shimizu M, et al. Critical role of cyclin D1 nuclear import in cardiomyocyte proliferation. *Circ Res*. 2003 Jan 10:e12-9.
35. 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 Biol*2004 Apr 28;5:15.
36. Chen Z, Chua CC, Ho YS, Hamdy RC, Chua BH. Overexpression of Bcl-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial I/R injury in transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*2001 May;280(5):H2313-20.
37. Brocheriou V, Hagege AA, Oubenaissa A, Lambert M, Mallet VO, Duriez M, et al. Cardiac functional improvement by a human Bcl-2 transgene in a mouse model of ischemia/reperfusion injury. *J Gene Med*2000 Sep-Oct;2(5):326-33.
38. Raya TE, Gaballa M, Anderson P, Goldman S. Left ventricular function and remodeling after myocardial infarction in aging rats. *Am J Physiol*1997 Dec;273(6 Pt 2):H2652-8.
39. Anversa P, Capasso JM, Puntillo E, Sonnenblick EH, Olivetti G. Morphometric analysis of the infarcted heart. *Pathol Res Pract*. 1989 Nov:544-50.
40. Anand IS, Liu D, Chugh SS, Prahash AJ, Gupta S, John R, et al. Isolated myocyte contractile function is normal in postinfarct remodeled rat heart with systolic dysfunction. *Circulation*. 1997 Dec 2:3974-84.
41. Marino TA, Haldar S, Williamson EC, Beaverson K, Walter RA, Marino DR, et al. Proliferating cell nuclear antigen in developing and adult rat cardiac muscle cells. *Circ Res*. 1991 Nov:1353-60.

42. Olivetti G, Anversa P, Loud AV. Morphometric study of early postnatal development in the left and right ventricular myocardium of the rat. II. Tissue composition, capillary growth, and sarcoplasmic alterations. *Circ Res.* 1980 Apr;503-12.
43. Cayli S, Ustunel I, Celik-Ozenci C, Korgun ET, Demir R. Distribution patterns of PCNA and ANP in perinatal stages of the developing rat heart. *Acta Histochem.* 2002;271-7.
44. Anversa P, Leri A, Kajstura J. Cardiac regeneration. *J Am Coll Cardiol*2006 May 2;47(9):1769-76.
45. Von Harsdorf R. Can cardiomyocytes divide? *Heart.* 2001 Nov:481-2.
46. Borisov AB. Myofibrillogenesis and reversible disassembly of myofibrils as adaptive reactions of cardiac muscle cells. *Acta Physiol Scand Suppl*1991;599:71-80.
47. Carrier L, Boheler KR, Chassagne C, de la Bastie D, Wisnewsky C, Lakatta EG, et al. Expression of the sarcomeric actin isogenes in the rat heart with development and senescence. *Circ Res*1992 May;70(5):999-1005.
48. Johnatty SE, Dyck JR, Michael LH, Olson EN, Abdellatif M. Identification of genes regulated during mechanical load-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*2000 May;32(5):805-15.
49. Tam SK, Gu W, Mahdavi V, Nadal-Ginard B. Cardiac myocyte terminal differentiation. Potential for cardiac regeneration. *Ann N Y Acad Sci*1995 Mar 27;752:72-9.
50. Marino TA, Cao W, Lee J, Courtney R. Localization of proliferating cell nuclear antigen in the developing and mature rat heart cell. *Anat Rec.* 1996 Aug:677-84.
51. Sharp PE, la Regina MC. Experimental methodology. In: Suckow MA, editor. *The Laboratory Rat.* 1 ed. Boston1998. p. 17.
52. Guarita-Souza LC, Carvalho KA, Voitowicz V, Rebelatto C, Senegaglia A, Hansen P, et al. Simultaneous autologous transplantation of cocultured mesenchymal stem cells and skeletal myoblasts improves ventricular function in a murine model of Chagas disease. *Circulation*2006 Jul 4;114(1 Suppl):I120-4.
53. Litwin SE, Katz SE, Morgan JP, Douglas PS. Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat. *Circulation.* 1994 Jan:345-54.
54. Yang F, Liu YH, Yang XP, Xu J, Kapke A, Carretero OA. Myocardial infarction and cardiac remodelling in mice. *Exp Physiol.* 2002 Sep:547-55.
55. Shoen F. O Coração. In: Kumar A, Fausto, editor. *Patologia - Bases Patoológicas das Doenças* 7ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. p. 583-650.

56. Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res.* 2003 Feb 7:139-50.
57. Camargo EA, Ferrari RA. [Adolescents: knowledge about sexuality before and after participating in prevention workshops]. *Cien Saude Colet*2009 May-Jun;14(3):937-46.
58. Rubin SA, Fishbein MC, Swan HJ. Compensatory hypertrophy in the heart after myocardial infarction in the rat. *J Am Coll Cardiol*1983 Jun;1(6):1435-41.
59. Anversa P, Fitzpatrick D, Argani S, Capasso JM. Myocyte mitotic division in the aging mammalian rat heart. *Circ Res.* 1991 Oct:1159-64.
60. Naseem RH, Meeson AP, Michael Dimaio J, White MD, Kallhoff J, Humphries C, et al. Reparative myocardial mechanisms in adult C57BL/6 and MRL mice following injury. *Physiol Genomics*2007 Jun 19;30(1):44-52.
61. Schulze PC, Lee RT. Macrophage-mediated cardiac fibrosis. *Circ Res.* 2004 Sep 17:552-3.
62. Maclellan RS, MD. Genetic dissection of cardiac growth control pathways. *Annu Rev Physiol*2000;62:289-319.
63. Pasumarthi KB, Field LJ. Cardiomyocyte cell cycle regulation. *Circ Res*2002 May 31;90(10):1044-54.
64. Stanley AF, MC; Swan, HJC; Rabines, A. Compensatory hypertrophy in the heart after myocardial infarction in the rat. *J Am Coll Cardiol*1983;1(6):1435-41.
65. Abbate A, Bussani R, Sinagra G, Barresi E, Pivetta A, Perkan A, et al. Right ventricular cardiomyocyte apoptosis in patients with acute myocardial infarction of the left ventricular wall. *Am J Cardiol*2008 Sep 15;102(6):658-62.
66. von Harsdorf R, Poole-Wilson PA, Dietz R. Regenerative capacity of the myocardium: implications for treatment of heart failure. *Lancet.* 2004 Apr 17:1306-13.
67. Yuasa S, Fukuda K, Tomita Y, Fujita J, Ieda M, Tahara S, et al. Cardiomyocytes undergo cells division following myocardial infarction is a spatially and temporally restricted event in rats. *Mol Cell Biochem.* 2004 Apr:177-81.

9 ANEXOS

Anexo A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS ANIMAL



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Curitiba, 12 de Novembro de 2004.
PARECER N. 26/04/CEPA-PUCPR

Prezado (a) Pesquisador (es),

Venho por meio desta informar a Vossa Senhoria que o Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da PUCRPR, em reunião realizada no dia 25 de outubro do corrente ano avaliou o Projeto Intitulado "Análise do Comportamento Evolutivo do Remodelamento Ventricular em Ratos de Diferentes Idades, Submetidos a Infarto do Miocárdio", sob o registro no CEPA /PUCPR nº 21.

O experimento classificado como de categoria D será realizado com o número de 60 Ratos Wistar, os quais após o experimento serão eutanasiados.

O colegiado do CEPA entendeu que o projeto avaliado está de acordo com as normas éticas vigentes no país e por isso emite o seguinte parecer:

APROVADO

Lembramos o senhor (a) pesquisador (a) que é obrigatório encaminhar relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEPA.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Paulo Henrique Couto Souza
Secretário do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da PUCPR

Ilmo Sr. Francisco César Pabis



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

NÚCLEO DE BIOÉTICA
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Registro do projeto no CEUA: 373

Data do parecer: 19/08/2008

Título do Projeto:

Estudo anatomopatológico comparativo pós infarto do miocárdio em ratos jovens e adultos.

Pesquisador responsável:

Mora Adalgisa Simões

Equipe da pesquisa:

Nelson Itiro Miyague

Instituição:

PUCPR

Categoria do Experimento - A

Espécie de Animal	Sexo	Idade ou peso	Quantidade
Ratos Wistar	Indet.	Indet.	60

O colegiado do CEUA em reunião extraordinária no dia 19/08/2008, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

Neste projeto estarão sendo utilizados o material anatomopatológico obtido em pesquisa anterior intitulada "Remodelamento ventricular pós-infarto do miocárdio em ratos jovens e adultos" com o parecer deste CEUA nº28/04.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEUA-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

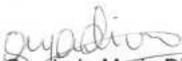
Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do

pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.

Lembramos ao senhor pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Curitiba, 19 de Agosto de 2008.

Atenciosamente


Profa. Grazianda Maria D'Almeida e Oliveira
Coordenadora do CEUA
PUC PR



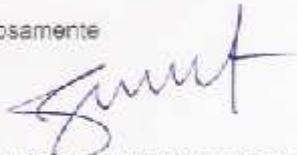
Anexo B – CARTA AUTORIZAÇÃO DO PROFESSOR DOUTOR LUIZ CÉSAR GUARITA SOUZA.

Curitiba, 16 de julho de 2008

Ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Venho através deste, esclarecer que encontro - me ciente que a mostranda Mona Adalgisa Simões e o Professor Doutor Nelson Itiro Miyague darão continuidade a pesquisa aprovada CEPA/PUC-PR No. 21 com o título "Análise do Comportamento Evolutivo do Remodelamento Ventricular em Ratos de Diferentes Idades, Submetidos a Infarto do Miocárdio".

Atenciosamente



Professor Doutor Luiz César Guarita Souza