

CARLOS ALBERTO PALMEIRA SARMENTO

**Estimativa do número de cardiomiócitos do
ventrículo esquerdo em suínos (*Sus scrofa*)**

São Paulo

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

CARLOS ALBERTO PALMEIRA SARMENTO

**Estimativa do número de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo em suínos
(*Sus scrofa*)**

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

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Maria Angélica Miglino

São Paulo

2009

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2145
FMVZ

Sarmiento, Carlos Alberto Palmeira

Estimativa do número de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo em suínos (*Sus scrofa*) / Carlos Alberto Palmeira Sarmiento. – São Paulo : C. A. P. Sarmiento, 2009.
59 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Maria Angélica Miglino.

1. Ventrículo esquerdo. 2. Estereologia. 3. Disector. 4. Suíno.
5. Nucleator. I. Título.



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estimativa do número de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo em suínos", protocolado sob o nº1602/2009, utilizando 03 (três) suínos, sob a responsabilidade da Profa Dra Maria Angélica Miglino, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 22/04/09.

We certify that the Research "Swine left ventricle cardiomyocytes number estimation", utilizing 03 (three) swine, protocol number 1602/2009, under the responsibility Profa Dra Maria Angélica Miglino, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 04/22/09.

São Paulo, 23 de abril de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Vice-Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SARMENTO, Carlos Alberto Palmeira

Título: Estimativa do número de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo em suínos
(*Sus scrofa*)

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS E DEDICATORIA

Finalmente chego ao fim de mais uma jornada, e a certeza e o sentimento de dever cumprido não poderia ser maior, outro sentimento que não poderia de forma nenhuma deixar de ser citado, é a gratidão, sentimento esse que vou guardar comigo pelo resto da vida.

Primeiramente eu gostaria de agradecer a DEUS pelo dom da vida e por colocar em meu caminho tantas pessoas maravilhosas, pessoas essas com quem tive a oportunidade de aprender tanto no sentido profissional, como no sentido pessoal.

Agradeço a meu pai Carlos Sarmiento, por ser um exemplo a ser seguido em todos os sentidos, um homem que me orgulha cada vez mais de poder chamar de pai, a minha mãe Sálvia Maria pela extrema preocupação com o “filhinho” que estava longe dela, pelas orações que sem sombra de dúvida me seguraram nas horas mais difíceis, e pelo incentivo constante em continuar mesmo sentindo muito minha falta. Amos vocês demais.

As minhas irmãs Salvyana e Polyana, por simplesmente serem as melhores irmãs do mundo, cada uma com suas qualidades e defeitos que fazem delas únicas e especiais.

As minhas três princesinhas Ana Leticia, Ana Beatriz e Luana pelo carinho imenso, pelos sorrisos mais confortadores do mundo, o dindo ama vocês demais.

Aos meus tios e primos, em especial ao meu tio Arnaldo, grande responsável por eu estar nessa universidade e grande incentivador para a realização desse mestrado, tio não tenho palavras pra agradecer, a minha tia Silvia pela preocupação sempre presente, e a meu querido tio Dito pelas palavras de otimismo.

Aos meus amigos de Aracaju que apesar da distância e do convívio diminuído consideravelmente, nunca me esqueceram, sempre me apoiaram e procuraram ajudar mesmo estando tão longe: Alan, Andinho, Mickey, Naldson, Ronaldinho, Guilherme, Vinicius, Denilton, Rodrigo, Rafael, Luciano, Bubu, Exson, Diego, Ditão, Passarinho, Guel. Aos amigos de Aracaju que por ventura do destino vieram morar em São Paulo e viveram comigo as dificuldades de se morar longe de casa: Marcel, Geraldinho, Zezinho, Tadeu, Rodrigo, Raul e Julinho que apesar de nos conhecermos a muito tempo, foi aqui em “sampa” que nos tornamos grandes amigos.

A minha namorada Renata pelas palavras de apoio, por compreender minha ausência, pela paciência nos meus momentos de total estresse com as coisas da dissertação, e pelo amor a mim dado nos últimos dois anos, e a toda sua família por me dar tanto carinho.

Ao grande amigo Anderson e sua família por serem meu porto seguro em São Paulo, por realmente terem me acolhido em sua casa como filho na época mais difícil que passei aqui. Meu eterno agradecimento.

Logo que cheguei a São Paulo, pensei que iria ser difícil fazer amizades, mas graças a DEUS me enganei completamente, além de vários colegas, hoje tenho a certeza que fiz amigos de verdade que vou levar comigo pro resto de minha vida.

Gostaria de agradecer a professora Maria Angélica Miglino, por ter aberto as portas da Pós Graduação, por ter aberto as portas de sua casa, por ter depositado em mim uma confiança muito grande, confiança essa que me fez criar forças em horas muito difíceis nessa jornada. Agradeço por ser minha orientadora, e não medir esforços para que esse sonho pudesse ser realizado.

Ao grupo de Terapia Celular ou grupo do “porco” como é conhecido, nas pessoas de: Erika Branco, Emerson Fioretto, Guilherme Buzon, Walkiria Ferreira, Rosa Cabral e José Guilherme, por terem me aceitado em seu grupo de braços abertos e não terem medido esforços para que todos os trabalhos pudessem ser realizados, obrigado de coração, essa vitória também é de vocês. Os três primeiros realmente passaram a ser muito mais colegas de grupo, passaram a fazer parte da minha vida como grandes amigos.

Erika, sempre me defendeu com unhas e dentes dentro do departamento, ensinou-me a dar os primeiros passos na vida científica, me mostrou um exemplo de superação de adversidades, tem por mim um carinho enorme, mesmo longe sempre se preocupa com o andamento de minhas coisas, enfim, não é a toa que a chamava de mãe dentro do departamento, você é especial viu.

Emerson sem palavras pra agradecer o respeito, carinho, dedicação, abdicação de alguns fins de semana, e de vários horários seus para que esse sonho pudesse ser realizado, muito obrigado também pela confiança que depositou em mim durante todo esse período que trabalhamos juntos, enfim é difícil expressar a gratidão e admiração que tenho por você com palavras, mas você sabe disso melhor que ninguém. Obrigado gordinho, você é fera.

Ao grande amigo Guilherme Buzon, um dos maiores corações que eu conheci em São Paulo, profissional de extrema competência, e uma pessoa melhor ainda, obrigado pelos ensinamentos, pelas palavras de apoio, pelo afinho com que realizava todos os experimentos, enfim obrigado por fazer parte do meu círculo de bons amigos e a sua esposa Leandra por fazer os exames dos meus animais da melhor forma possível, sacrificando seu tempo e por nunca ter me cobrado nada por isso.

Gostaria de agradecer a minha família aqui em São Paulo, Thiago Aloia e Evander Bueno por abrirem as portas de sua casa e me tornarem parte de um república tão especial, por me ensinarem a viver em conjunto, respeitando os defeitos e unindo as qualidades, como esquecer das festas que fizemos, das conversas que tivemos, das ajudas que nos demos, de como riamos e chorávamos juntos, enfim obrigado por me darem em São Paulo o sentido da palavra família.

Agradeço ao pessoal do pensionato aconchego minha morada durante os primeiros anos aqui em São Paulo, e que me deu a oportunidade de fazer grandes amigos, em especial Marcello (Costeleta), Fernanda, Cris, Rodolfo, e Vinicius (Bozão), e é claro a minha primeira mãe aqui em São Paulo, Dona Jô, que com certeza vai me deixar saudades.

Ao meu grande amigo e capitão, Caio Biasi (Fêmea), por realmente se mostrar meu amigo em todas as vezes que precisei, pela companhia, pelos conselhos, pelas risadas e brincadeiras.

Aos meus companheiros da “sala da chefe” Adriana, Daniele, Caju, Joãozinho, Phelipe (Apoptose), André, Tatiana, Rose, Ricardo, Karla (Satisfação), Juliana, Miryan e Alvaro.

Ao pessoal do canil Marina (Galega), Angélica, Dilayla, Carol, Renata, Ana Luiza pessoas maravilhosas.

As minhas queridas amigas Marininha, Cristiane e Patrícia, vocês são especiais, e com certeza muito importantes nessa caminhada.

Aos amigos Matheus e Flavio (Maranhão) pelas conversas, pela ajuda, pelos conselhos e pela amizade a mim dada durante esse período e ao amigo Leandro (Fodel) por sempre me ajudar quando solicitado e por compartilhar uma experiência única que foi a viagem pra Alemanha, onde essa amizade se fortaleceu ainda mais.

Aos orientados do Pedro, em especial Camila, Fernanda, Alexandre e Muller.

Aos orientados do professor Francisco: Elisângela e Paula.

Aos orientados do professor José Roberto: Thaisinha, Rose, Jana e em especial a Ana Rita que sempre me auxiliou em tudo que precisei com paciência e serenidade.

Aos Pós Graduandos que não fazem mais parte do departamento, em especial Juliana e Joel.

Aos amigos do futebol, formados por alunos e pelo pessoal da zeladoria, por me conceder o prazer de fazer uma das coisas que mais gosto que é jogar futebol e ainda poder conquistar o título de campeão.

Agradeço aos professores do departamento Pedro Bombonato, Paula Papa, José Roberto, Francisco Javier e Patrícia Beltrão, por sempre me cederem os laboratórios, aos

técnicos Ronaldo e Índio por sempre serem solícitos aos meus pedidos, e ao técnico Diogo Nader Palermo, pela enorme ajuda na confecção das laminas, captura das fotos, dicas e por várias vezes deixar de fazer suas coisas pra me auxiliar com as minhas.

A Marcos Ivo, e Leandro Garcia pelos convites pra ministrar palestras, enriquecendo assim o meu currículo.

Ao professor Eduardo Birguel por sempre ajudar quando solicitado, não deixando de atender em hora nenhuma nossos pedidos de espaço para guardar os animais, e a todos os funcionários que cuidaram desses animais com grande zelo e responsabilidade.

Aos secretários da Pós Graduação e da Anatomia: Joana, Dayse, Carlos, Jack e Maicow por sempre resolverem as pendências burocráticas da melhor maneira possível.

Ao pessoal do Genoma Humano pela oportunidade de estágio nas pessoas da Pós Graduanda Daniele Ayube e da Dra. Mariz pelos ensinamentos e disponibilidade de tempo.

Aos médicos do INCOR nas pessoas dos doutores, Pedro Lemos, Carlos Campos, Celso Takimura e Ramires que juntamente com os funcionários Dário Ribeiro, Anderson de O. Brisquilhari, Renato Gomes, Vicente Ribeiro, Pedro Noiri, Nelson Domingues, Henrique Vieira e Leonora Loppnow pessoa maravilhosa que tive o privilégio de trabalhar durante esse período.

Dedico essa vitória ao meu avô *Sebastião Palmeira* que hoje se encontra fragilizado pela idade, mas sempre foi um exemplo de vida seguido por toda a família.

RESUMO

SARMENTO, C. A. P. **Estimativa do número de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo em suínos normais (*Sus scrofa*)**. [Estimation of the cardiomyocytes number in the left ventricle in swine (*Sus scrofa*)]. 2009. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Os estudos relacionados ao coração têm sido realizados ao longo dos anos de forma bastante comum, tendo em vista a grande importância que este órgão tem na medicina. Problemas relacionados ao mesmo são uma das principais causas de mortes e internações no Brasil e no mundo, por causa disso, avanços no que diz respeito a inovações tecnológicas e novas metodologias de estudo tem sido propostas cada vez com mais frequência, e, o suíno tem se mostrado um modelo bastante útil, pois apresenta diversas similaridades em relação ao ser humano. O uso da estereologia se encaixa nesta nova busca, pois através de suas ferramentas nos proporciona excelentes resultados a níveis de mensuração, e quantificação de estruturas microscópicas. O objetivo desse estudo foi obter valores referentes à quantificação de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo em suínos normais. Utilizaram-se 3 suínos fêmeas pesando em torno de 25kg, os quais após serem eutanasiados tiveram o coração retirado e suas câmaras separadas. Em seguida lâminas referentes a esse material foram preparadas e fotografadas, para serem analisadas utilizando-se o disector e o nucleator como ferramentas estereológicas. Os resultados nos mostram que a média de peso do ventrículo esquerdo dos animais foi de 660 mg, o volume médio dos cardiomiócitos foi de $16.32 \mu\text{m}^3$, a média do número de cardiomiócitos foi de $3,91 \times 10^8$, enquanto que a média do volume de cardiomiócitos que ocupam o ventrículo esquerdo foi de $3,32 \times 10^6$.

Palavras-chave: Ventrículo esquerdo. Estereologia. Disector. Suíno. Nucleator.

ABSTRACT

SARMENTO, C. A. P. **Estimation of the cardiomyocytes number in the left ventricle in swine (*Sus scrofa*)**. [Estimativa do número de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo em suínos normais (*Sus scrofa*)]. 2009. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Investigations involving the heart have been largely carried out all over the years due to its importance in medicine. Heart diseases are the one of the major causes of deaths and hospitalizations in Brazil and worldwide. In this context, technological innovations and progresses in methodological investigation have been frequently proposed; Swine has been shown as a useful model due to similarities to human. The application of stereological tools for investigations in the morphology of the heart has been intensely applied based on the reliability on the results for measuring and quantification. This study aimed to evaluate morphological and quantitative aspects of cardiomyocytes in the left ventricle in healthy swine. Three female swine, averaging 25 kg were euthanasiated and have the hearth chambers separated. Left ventricles were fixed and slides obtained. Images were acquired and analyzed by dissector and nucleator. The results showed us that the average weight of the left ventricle of the animals was 660 mg, the mean volume of cardiomyocytes was 16:32 μm^3 , the average number of cardiomyocytes was 3.91 x10⁸, while the average volume of cardiomyocytes that occupy the left ventricle was 3.32 x10⁶.

Keywords: Left ventricle. Stereology. Disector. Swine. Nucleator.

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 – Principais diferenças entre Morfometria X Estereologia	24
---	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Animais alojados em baias apropriadas, na FMVZ/USP34
- Figura 2 - Veia auricular canulada, para injeção dos medicamentos.....35
- Figura 3 - Fotomontagem de cortes seriados de miocárdio de ventrículo esquerdo de suínos normais. As cabeças de setas cheias (▲) indicam núcleos de cardiomiócitos selecionados pela área de inclusão para aplicação subsequente da técnica do nucleator. As setas pretas (→) representam cardiomiócitos desconsiderados por atingirem a linha de exclusão nas frames dos cortes *reference*. Nota-se na figura, dois sentidos de aplicação do *disector*. Na montagem superior, o sentido do *disector* é 21-25, observando-se que o corte 21 é considerado, o corte *reference* com aplicação das frames contendo linhas de inclusão e exclusão enquanto que o corte 25 foi considerado o corte *look-up* com frames de linhas abertas. Na montagem inferior o sentido do *disector* é 25-21 no qual observa-se as mesmas réguas de aplicação de frames38
- Figura 4 - Régua de Classes do *Nucleator*39
- Figura 5 - Fotomicrografia do corte 21 analisado pelo método do *disector*, o qual selecionou quatro núcleos de cardiomiócitos. Sobre esses núcleos foi disposta a régua de classe do *nucleator* à sexta angulação, medindo-se assim os limites dos cardiomiócitos selecionados40
- Figura 6 - Fotografia do coração de suíno, demonstrando aspecto normal de formação dos ventrículos e porção basal, bem como da posição dos vasos principais43
- Figura 7 - Fotomicrografia do ventrículo esquerdo de suínos saudáveis demonstrando a presença de cardiomiócitos bem definidos pela membrana celular formando agrupamentos celulares delimitados por perimísio. Os cardiomiócitos apresentavam núcleo e nucléolos evidentes. Observa-se a presença de vasos sanguíneos entre os agrupamentos musculares. Escala de Barra: 60 µm, Coloração: Hematoxilina-fluxina44

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Tabela demonstrando os resultados obtidos com avaliação de cardiomiocitos do ventrículo esquerdo de coração de suínos normais pelas técnicas do *disector* e do *nucleator* associadas - São Paulo, SP – 2009.....46
- Tabela 2 - Tabela demonstrando os resultados e as médias obtidos com a aplicação de associação dos métodos do *disector* e do *nucleator* na análise de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo do coração de suínos normais - São Paulo, SP – 2009.....46

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	CORAÇÃO.....	19
2.1.1	Aspectos macroscópicos	19
2.1.2	Aspectos microscópicos	21
2.2	IMPORTÂNCIA CLÍNICA DO CORAÇÃO	22
2.3	TERAPIA CELULAR NA CLÍNICA CARDIOLÓGICA	22
2.4	ESTEREOLOGIA.....	23
2.4.1	Disector	26
2.4.2	Fractionator	27
2.4.3	Nucleator	28
2.5	SIMILARIDADES ENTRE O CORAÇÃO SUÍNO E O HUMANO: O PORQUE DO MODELO EXPERIMENTAL ANIMAL	28
3	OBJETIVOS	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	TÉCNICAS ANESTÉSICAS E EUTANÁSIA DOS ANIMAIS.....	34
4.2	COLETA DE MATERIAL E AMOSTRAGEM	35
4.2.1	Coleta de Material	35
4.2.2	Amostragem	36
4.3	ANÁLISE ESTEREOLÓGICA	37
4.4	MÉTODO DISECTOR FÍSICO.....	37
4.5	MÉTODO DO NUCLEATOR.....	39
4.5.1	Estimativa do volume médio e da área de secção do cardiomiócito ...40	
4.5.2	Coeficiente de variância e coeficiente de erro	41
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
5	RESULTADOS	43
5.1	ANÁLISE MACROSCÓPICA	43
5.2	ANÁLISE MICROSCÓPICA.....	44
5.3	ANÁLISE ESTEROLÓGICA	45
6	DISCUSSÃO	48
7	CONCLUSÕES	51
	REFERÊNCIAS	53

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Desde os primórdios, o coração tem despertado o interesse da humanidade devido a sua magnitude e importância fisiológica no organismo; Hoje em dia, a atenção sobre o coração se dá pelo crescente aumento no número de doenças cardíacas e mortes subsequentes. O estudo do órgão serve como ferramenta para a busca de meios que possam diminuir essa alta taxa de mortalidade.

Esses estudos são realizados em animais de laboratório visando aprimorar as técnicas e, os resultados obtidos, como no caso de teste de terapias, poderá ser extrapolado para o ser humano, seguindo as devidas proporções e obedecendo aos critérios de bio-segurança. Dentre estes modelos, a espécie suína tem sido utilizada de forma expressiva, por apresentar características bastante semelhantes à humana, no que tange algumas características fisiológicas, anatômicas ou patológicas de diversos órgãos e tecidos. Particularmente o coração apresenta semelhanças muito evidentes (BLOOR; WHITE; ROTH, 1992).

O estudo morfométrico cardíaco dispõe hoje de vários meios para que se possa conhecer, e estudar suas características a níveis macro, meso e microscópico. Dentre elas encontramos a estereologia que é um método aleatório, porém sistemático, baseado em formulas e estatística, e, que confere maior confiabilidade aos resultados encontrados (WEIBEL, 1979; JENSEN, 1998). A aplicação dos métodos esteriológicos, tais como o “*disector*” tem demonstrado crescente e significativa aplicação na mensuração e contagem de partículas biológicas nos últimos dez anos (MAYHEW; GUNDERSEN, 1996).

Devido à escassez de dados atuais sobre a quantificação dos cardiomiócitos de suínos julga-se adequado utilizar a espécie como modelo animal experimental, além de vislumbrar a aplicação de técnicas estereológicas para pesquisar esse assunto.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

As fontes consultadas para o desenvolvimento desta dissertação são percorridas de acordo com os subtemas de interesse.

2.1 CORAÇÃO

Os dados relevantes ao coração e que serviram de embasamento para a confecção desta dissertação são descritos a seguir.

2.1.1 Aspectos macroscópicos

Apesar de não ser a primeira estrutura a ser delineada na formação do organismo, o sistema circulatório é o primeiro sistema orgânico a chegar a um “estado de funcionalidade”. O coração é o órgão central desse sistema, o qual por meio de contração rítmica bombeia o sangue continuamente através dos vasos sanguíneos. É um órgão quase totalmente revestido por uma camada serosa chamada pericárdio, a qual adapta-se totalmente a ele e se encontra-se diretamente relacionado às estruturas adjacentes. O coração é uma estrutura oca, situado no mediastino, limitado pelas pleuras do mediastino médio e, recoberto dorsal e lateralmente pelos pulmões. Nos animais domésticos, possui um formato cônico e está localizado assimetricamente no tórax, com sua maior parte voltada à esquerda do plano mediano, sua base é direcionada dorsalmente ou craniodorsalmente e está fixada a outras estruturas torácicas por grandes artérias, por veias e pelo saco pericárdico. O ápice do coração está direcionado ventralmente e totalmente livre dentro do pericárdio. No suíno, o coração fica coberto pelo braço e pelo músculo tríceps braquial, mas pode ser acessado deslocando-se o membro torácico cranialmente em estação. A face direita do coração está localizada no antímero direito do corpo orientada mais cranialmente (DYCE; SACK; WENSIWG, 2004; FRANDSON; LEE WILKE; FAILS, 2005).

Anatomicamente a parede do coração é constituída por três túnicas: a interna ou endocárdio, a média ou miocárdio e a externa ou epicárdio. Além disso, o músculo cardíaco e as válvulas cardíacas são sustentados por um esqueleto de tecido conjuntivo denso, formando o esqueleto cardíaco. O endocárdio é constituído por endotélio que, por sua vez, fica apoiado sobre uma cama subendotelial composta de tecido conjuntivo frouxo, por onde passam vasos, nervos e ramos do sistema condutor de estímulos do coração. O miocárdio é constituído por fibras musculares cardíacas que envolvem as cavidades cardíacas de um modo complexo e espiralado. O coração apresenta-se externamente coberto por um epitélio pavimentoso simples apoiado em delgada cama conjuntiva, que constituem o epicárdio, que por sua vez, corresponde a cama visceral do pericárdio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A base do coração é formada pelos átrios, os quais se encontram nitidamente separados dos ventrículos por um sulco coronário circulante. Os ventrículos formam a maior parte do coração, o qual possui consistência mais firme devido à espessura de suas paredes. Estas se fundem externamente em direção ao ápice. A musculatura atrial é fina, enquanto que a musculatura ventricular é muito espessa, e se dispõem em feixes superficiais e profundos (DYCE; SACK; WENSIWG, 2004). No entanto, Gardner, Gray e O'Rahilly (1971), afirmam que a espessura da camada miocárdica é proporcional ao volume de trabalho executado pelo coração.

O miocárdio é um tecido modificado para as funções de contração e condução. A capacidade na geração e condução de impulsos através de toda a massa miocárdica é devido a um sistema especializado que possibilita a formação adequada de impulsos e a posterior seqüência adequada de contrações atriais e ventriculares.

O sistema gerador e condutor do ritmo cardíaco é formado pelo nódulo sinoatrial, localizado na parede do átrio direito; nódulo atrioventricular e pelo feixe atrioventricular, localizados próximo aos ventrículos. Estes estendendo-se ventralmente e cranialmente pelo triângulo fibroso para o interior do septo membranáceo, e dividindo-se nos ramos direito e esquerdo do feixe. As células do nódulo sinoatrial devido a sua freqüência de despolarização e repolarização mais rápida assumem uma função de marcapasso do coração evitando assim que os focos secundários assumam esta função. A dispersão da excitação inicial dada pela musculatura atrial permite a contração desta musculatura para promover o preenchimento sanguíneo dos ventrículos. O retardamento que ocorre no nódulo atrioventricular facilita o preenchimento máximo de sangue dos ventrículos antes do início da contração. Os feixes atrioventriculares aceleram os impulsos no sentido do ápice, permitindo que a “onda” de contração muscular volte do ápice para a base do coração. Esta seqüência de contração

representa um meio eficiente de ejetar o sangue dos ventrículos para a circulação aórtica e pulmonar

O coração é ricamente irrigado pelas suas artérias coronárias. Uma característica óbvia da massa miocárdica é a extensa rede capilar espalhada por toda musculatura. Em relação ao sistema linfático os vasos desse sistema estão presentes em todas as camadas do coração. Já, inervação do coração se faz por numerosas fibras nervosas do sistema autônomo que inervam a massa miocárdica, os nódulos de geração e condução dos impulsos elétricos e o músculo liso dos vasos coronarianos (FRANDSON; LEE WILKE; FAILS, 2005). Segundo Nickel, Schummer e Seiferre (1981), o rico suprimento sanguíneo do músculo cardíaco é considerável conforme o grande aporte de trabalho.

O suprimento sanguíneo generoso é essencial porque a maior parte do ATP produzido depende do metabolismo aeróbico. Em seres humanos, a interrupção do suprimento sanguíneo para o músculo cardíaco resulta rapidamente em isquemia miocárdica e nos sintomas de ataque cardíaco, o músculo cardíaco também pode sofrer necrose se a perda do suprimento sanguíneo for prolongada ou extremamente grave (FRANDSON; LEE WILKE; FAILS, 2005).

2.1.2 Aspectos microscópicos

O músculo cardíaco possui muitas características semelhantes às das fibras musculares esqueléticas estriadas, embora as estrias sejam mais fracas do que no músculo esquelético. Ambos os tipos de músculo consistem amplamente em sarcoplasma, miofibrilas, retículo sarcoplasmático, túbulos transversos, núcleo e sarcolema. A diferença mais marcante é a tendência das fibras musculares cardíacas em ramificar-se e juntar-se, formando uma rede.

O coração é composto de células que são entidades separadas; entretanto, estruturas singulares, onde o músculo cardíaco se agrupa terminação-a-terminação, são os discos intercalados. Esses discos podem ser observados ao microscópio óptico e ficam interpostos entre células musculares. Os discos representam membranas celulares apostas e sinapses. As sinapses conferem ligação mecânica entre as células e permitem transmissão elétrica de uma célula muscular cardíaca para a célula seguinte, potenciais de ação podem disseminar-se de uma célula a outra, fazendo o músculo cardíaco atuar elétrica e mecanicamente como um

sincício funcional, como se fosse massa muscular única (FRANDSON; LEE WILKE; FAILS, 2005).

2.2 IMPORTÂNCIA CLÍNICA DO CORAÇÃO

O infarto do miocárdio ocorre devido a um bloqueio do suprimento sanguíneo, o qual rapidamente desencadeia um processo de necrose das bandas de contração do miocárdio (DENGLER; KATUS, 2002). Esse processo inicia imediatamente após o infarto e, caso o fluxo sanguíneo não seja prontamente restaurado, ocorre uma remodelação ventricular patológica, de forma que os cardiomiócitos lesados são substituídos por tecido fibroso não contrátil. Isso leva à perda progressiva das funções ventriculares, acarretando aumento na carga de trabalho dos miocárdios saudáveis. Quando a área atingida é muito grande, ocorre uma deterioração generalizada do coração (TAYLOR, 2004), resultando em falhas no bombeamento sanguíneo e eventual morte dos pacientes (OLIVARES et al., 2004; PITTENGER; MARTIN, 2004).

2.3 TERAPIA CELULAR NA CLÍNICA CARDIOLÓGICA

À primeira vista, os cardiomiócitos adultos parecem ser as células mais indicadas para a cardiomioplastia celular. Porém, vários obstáculos inviabilizam seu uso nas terapias de reparo do coração, tais como a grande dificuldade em obter essas células, devido seu baixo potencial proliferativo “in vivo” e “in vitro” e a necessidade de um suprimento sanguíneo maior do que o disponível após o transplante (CHACHQUES et al., 2004).

Estudos experimentais, realizados com cardiomiócitos fetais ou neonatais, demonstraram que, ao contrário dos cardiomiócitos adultos, a capacidade proliferativa in vitro é mantida, permitindo que elas sejam multiplicadas em quantidades suficientes para serem transplantadas. A formação de discos intercalares e a presença da conexina, um marcador das junções comunicantes (gap junctions), responsável pela ligação elétrica das células, são os indicadores de sucesso do enxerto após o transplante. A proliferação dessas células na área do

enxerto leva a uma melhora nas funções do miocárdio, prevenindo uma remodelação patológica e contribui para o desenvolvimento das forças ventriculares sistólicas e diastólicas (REINECKE et al., 1999; YOO et al., 2000).

Apesar do grande potencial terapêutico das Células Tronco (CT) fetais e neonatais, a principal limitação ainda é a questão ética que pode impedir seu uso clínico. Outro fator desfavorável é a quantidade limitada de células que requer a multiplicação *in vitro* para o transplante (LEE; LILL; MAKKAR, 2004).

Embora alguns pesquisadores tenham obtido sucesso no transplante de cardiomiócitos fetais ou neonatais, outros grupos questionam a extensão da diferenciação desses cardiomiócitos após transplante. Segundo eles, essas células permanecem no local de injeção e mantêm o fenótipo de células fetais em uma área isolada, mesmo após longo período. Isso parece ser o resultado de um processo lento e contínuo de rejeição imunológica e de um procedimento imunossupressor crônico (LEOR et al., 1996; SCORSIN et al., 1996).

Foi também demonstrado que, após transplante, os cardiomiócitos fetais alogênicos sobrevivem por apenas um curto período de tempo e então, são gradativamente eliminados em resposta um processo de imunorejeição (LI et al., 1997).

Todos esses fatores limitantes, associados às descobertas de novos tipos celulares, principalmente células autólogas com grande potencial proliferativo e de diferenciação, parece limitar cada vez mais o uso de cardiomiócitos fetais ou neonatais na cardiomioplastia (LEE; LILL; MAKKAR, 2004).

2.4 ESTEREOLOGIA

Morfologistas são tradicionalmente interessados em formas e composição de estruturas nos níveis macro, meso, micro e ultra-estruturais. Recentemente, o emprego de técnicas genéticas e moleculares beneficia o aprimoramento das pesquisas médicas e biológicas. No entanto, as questões que dizem respeito a alterações quantitativas de tecidos, células ou organelas celulares, assim como uma melhor correlação entre morfologia e função, requerem uma abordagem quantitativa específica para serem melhor compreendidas (WEIBEL, 1989; MAYHEW, 1992; ROBERTS; PUDDEPHAT; MCNULTY, 2000; ANDERSEN; PAKKENBERG, 2003). O desenvolvimento de plataformas quantitativas para a biologia

experimental, incluindo a variabilidade dos tamanhos moleculares à organismos tem sido contemplado por uma série de novas e melhores abordagens quantitativas nos últimos anos (BOLENDER, 1992).

O desafio da estereologia é interpretar o arranjo estrutural tridimensional interno baseado na análise de fragmentos de estruturas que fornecem somente informações bidimensionais. Para tal os princípios estereológicos levam em consideração a geometria e a probabilidade estatística (WEIBEL, 1979; JENSEN, 1998). A respeito do argumento sobre nomenclatura - morfometria e estereologia podem denominar o mesmo método (AHERNE; DUNNILL, 1982). Vários autores consideram morfometria um método quantitativo bidimensional. Ao contrário, a estereologia usa um sistema teste normalmente composto de pontos ou linhas sobre uma frame (área teste) e analisa as imagens no âmbito tridimensional a partir das imagens bidimensionais. As principais diferenças entre a morfometria e a estereologia foram descritas na literatura ao longo dos anos, um quadro-resumo, foi apresentado por Mandarin-de-Lacerda (1999) quadro 1.

Características	Morfometria	Estereologia
Níveis macro, meso, e micro	Sim	Sim
Mensuração no plano 3-D	Sim	Não
Paquímetro	Sim	Não
Sistema Teste	Não	Sim
Fatia da Estrutura	Não necessariamente	Sim
Formulas	Simples	Complexas
Probabilidade Estatística	Não	Sim
Unidade	mm	mm/mm ³

Fonte: Mandarin-de-Lacerda (1999)

Quadro 1 – Principais diferenças entre Morfometria X Estereologia

A morfometria determina comprimento, perímetro, área, e benefícios de programas que facilitam a análise de imagens. A estereologia determina densidade; a mais interessante é a densidade por volume: densidade de volume (Vv), densidade de comprimento (Sv), e densidade numérica (Nv). A densidade de área pode também ser estimada: densidade de área

(Aa) e densidade numérica por área (Na ou Qa) são as mais comumente estimadas (PEREIRA; MANDARIM-DE-LACERDA, 2002).

Todos os índices são estimados através da aplicação de fórmulas específicas. No entanto, a acurácia dos cálculos é baseada nos princípios estatísticos (tamanho da amostra, randomização, e isotropia). O objetivo da amostragem para a estereologia é obter o máximo de informações quantitativas estruturais em um único momento. Em geral, a variação entre diferentes indivíduos (variação biológica) é o maior determinante da eficiência ao passo que a variação entre os padrões microscópicos não é tão importante. No entanto, gastar tempo e/ou dinheiro com o intuito de melhorar a precisão nas mensurações individuais é irracional na maioria dos estudos que enfatizam resultados biológicos.

Nos últimos 50 anos, estudos esteriológicos têm sido crescentemente publicados, os primeiros estudos foram baseados em descrições pioneiras (CHALKLEY, 1943; ABERCROMBIE, 1946; CHALKLEY; CORNFIELD; PARK, 1949; WEIBEL; GOMEZ, 1962; WEIBEL; KISTER; SCHERLE, 1966). A chamada “nova estereologia” foi desenvolvida no século XX na década de oitenta, tornando-se fácil e confiável (STERIO, 1984; GUNDERSEN et al., 1988a). Na realidade as questões de confiabilidade e estereologia ainda estão em discussão, deste modo, o desenvolvimento contínuo de novas técnicas tornam a estereologia mais consistente. A estereologia é dinâmica e cheia de perspectivas para o futuro, novas soluções para dúvidas antigas continuam estimulando os estereologistas a testar possibilidades (GUNDERSEN et al., 1988a).

Do ponto de vista do processamento do material biológico para análise, a estereologia nos faz levar em conta os seus efeitos tais como a compressão e o encolhimento. Deste modo, deve ser considerado que a parafina ou outros materiais utilizados no emblocamento do material, como o Paraplast ou Paraplast Plus, causam uma distorção intrínseca das estruturas. O encolhimento pode ser causado pela fixação, desidratação e infiltração de parafina, enquanto que a compressão pode estar relacionada à ação da superfície do bloco contra a lâmina do micrótomo (WEIBEL, 1979). Em material emblocado em parafina o encolhimento é em torno de 25% e compressão em torno de 10% em relação ao material fresco (MANDARIM-DE-LACERDA, 1991). É fácil de entender como a morfometria e/ou estereologia podem ser úteis em estudos relacionados ao desenvolvimento (MANDARIM-DE-LACERDA, 1991; ALMEIDA; MANDARIM-DE-LACERDA, 2002), processo de envelhecimento (DUFFELL; SOAMES; GUNBY, 2000; AGUILA; MANDARIM-DE-LACERDA, 2001; PAKKENBERG et al., 2003), e diagnósticos patológicos (ELIAS et al., 1981; COLLAN, 1985; HAMILTON; ALLEN, 1995; COLLAN, 1997; HOF et al., 2003).

Patologistas fizeram um esforço para estabelecer uma nova e acurada classificação para diagnósticos patológicos ambíguos, permitindo uma determinação de prognóstico (HANSEN et al., 1998; LADEKARL, 1998).

Estudos estereológicos têm vantagens científicas em relação a estudos qualitativos. Primeiro, os resultados são numéricos (não subjetivos), são reproduzíveis e podem ser facilmente verificados qualquer hora em diferentes laboratórios. Segundo, a comparação entre diferentes grupos (idades, espécies, ação de drogas, manipulação, etc.) são divididos mais facilmente; e esses métodos são particularmente aplicados nessa situação. Em terceiro lugar trabalhos exaustivos comumente associados à quantificação praticamente desaparecem com o uso de uma amostragem restrita e com o auxílio do computador na estereologia moderna. Por outro lado um suporte teórico bem estabelecido torna o método bastante confiável. De outra parte a necessidade de pouco tempo de treinamento para os cientistas é evidente, e finalmente a necessidade de equipamentos não muito dispendiosos facilitam o trabalho (BOLENDER, 1981; GUNDERSEN et al., 1999; BJARKAM; PEDERSEN; SORENSEN, 2001; KUBINOVA; JANACEK, 2001; KUBINOVA et al., 2001; PEREIRA; MANDARIM-DE-LACERDA, 2002; CHARLESTON et al., 2003; DAVEY et al., 2003).

2.4.1 Disector

A contagem de partículas em microscopia tem sido o principal objetivo de pesquisadores desde o início da era moderna. Sempre que uma nova estrutura morfológica é descrita ou qualquer novo formato é evidenciado quer seja por variação ou patologia, os pesquisadores se perguntam se há a possibilidade de se quantificar o objeto observado. Entretanto, observa-se que a quantificação morfológica é sujeita às armadilhas decorrentes da complexidade morfológica dos tecidos biológicos. O princípio do “*disector*” foi publicado primariamente em 1984 por Sterio no qual se descreveu a regra de quantificação tridimensional livre de suposições para estimativa do número de partículas. A seleção das partículas para contagem obedece às regras de inclusão e exclusão aplicadas pelas áreas teste dispostas aleatoriamente sobre a secção O “*disector*” permite a composição das estruturas em três dimensões utilizando um sistema teste com uma área (a) conhecida, número de pontos (p), e um plano paralelo com uma altura (h) (STERIO, 1984). E permite contar partículas independentemente do tamanho, forma, distribuição ou orientação, em um volume conhecido,

utilizando pares de secções provenientes de cortes seriados (PAKKENBERG; GUNDERSEN, 1988; COGGESHALL, 1991; COGGESHALL; LEKAN, 1996).

Cada “*disector*” é constituído por duas secções idênticas separadas por uma altura conhecida, sendo estas secções denominadas de “reference-section” e “look-up section”, e as partículas encontradas na “reference-section” mas não na “look – up section” são chamadas de “transects” (GAGLIARDO, 2003).

Basicamente, o “*disector*” destaca-se por ser uma ferramenta simples para contagem de estruturas em uma área determinada, por meio da comparação entre duas secções subseqüentes nas quais se observa a ausência do perfil estrutural observado na primeira secção em relação à segunda secção (COGGESHALL, 1991). O “*disector*” é um método tridimensional simples e sem viés. A área teste estudada é formada obedecendo critérios que asseguram que todos os objetos são contados com a mesma probabilidade. O “*disector*” é livre do efeito de sobreposição (efeito Holmes) e do viés de “perda de calotas” quando são cortadas estruturas esféricas (MAYHEW, 1991).

2.4.2 Fractionator

O método estereológico do “*fractionator*” é considerado a ferramenta e a técnica mais simples de ser aplicada para o estabelecimento de uma amostragem livre de suposições. Exceto por consciente e deliberada ação na seleção do material para a aplicação do “*fractionator*” não é possível observar-se viés em uma amostragem baseada corretamente no método. O princípio do “*fractionator*” envolve a amostragem de partículas de modo uniforme e aleatório em uma probabilidade conhecida e predeterminada, derivando-se, então, o número total da amostra a partir da probabilidade de amostra. O órgão contendo a estrutura de interesse é cortado em inúmeros pedaços de forma e tamanho aleatórios seguindo-se uma amostragem sistemática com início aleatório. Devido a toda partícula deter todos os segmentos da amostra, observa-se que todas as partículas apresentam a probabilidade de fazer parte da amostragem. Este tipo de amostragem pode ser aplicado em todos os níveis de amostragem e processamento durante a investigação (GUNDERSEN, 1986; GUNDERSEN et al., 1988b).

2.4.3 Nucleator

O “*nucleator*” é claramente um princípio o qual se aplica especialmente bem a observações em secções através de partícula abundante biologicamente, células eucarióticas com um núcleo ou mais eficientemente a células com um nucléolo, o mesmo oferece pela primeira vez a chance de obter estimativas sem viés sobre a média do volume celular e área de superfície com ampla possibilidade de reconhecer tipos específicos de células em um conglomerado de outros tipos de células. O “*nucleator*” é também muito mais eficiente do que o procedimento baseado na amostragem de interceptação de comprimento cúbico com pontos uniformes (GUNDERSEN et al., 1988b).

O “*nucleator*” nos proporciona a estimativa verdadeira, sobre o volume da partícula apesar do fato que amostras desprovidas de núcleos nunca serem estudadas, não existem requisitos a respeito das células nem o núcleo deve estar em uma posição específica da célula, a única condição indispensável para a realização do método em secções é a necessidade de reconhecimento e da presença de um único e identificável núcleo (GUNDERSEN et al., 1988b).

2.5 SIMILARIDADES ENTRE O CORAÇÃO SUÍNO E O HUMANO: O PORQUE DO MODELO EXPERIMENTAL ANIMAL

O suíno tem sido bastante utilizado em pesquisas biomédicas e os modelos mais relevantes têm sido relatados em uma série de procedimentos técnicos e livros nas últimas duas décadas (SWINDLE, 1983; STANTON; MERSMANN, 1986; TUMBLESON, 1986; SWINDLE; ADAMS, 1988; SWINDLE, 1992; TUMBLESON; SCHOOK, 1996; SWINDLE, 1998).

O coração do suíno é anatomicamente similar ao humano, com uma notável exceção sendo a presença da veia azigus direita, a qual drena o sistema intercostal no seio coronário (SWINDLE; ADAMS, 1988). O sistema coronário é semelhante a 90% da população humana em função e anatomia, não há a preexistência de vasos colaterais no miocárdio (BLOOR; WHITE; ROTH, 1992). O coração de um mini-pig de 40 a 50kg é aproximadamente do

mesmo tamanho do coração de um humano adulto. O coração de um mini-pig sexualmente maduro pesa aproximadamente 0,5% do peso corporal, diferenças no peso do coração entre as espécies de minipig tem sido notados como o Yucatan que tem um aumento no tamanho do coração significativo quando comparado com o Hanford da mesma idade (SWINDLE; ADAMS, 1988; SMITH; SPINALE; SWINDLE, 1990). O suplemento sanguíneo do sistema de condução origina-se do septo arterial posterior e é predominantemente direito como no homem (GARDNER; JOHNSON, 1988).

A aorta do suíno possui uma “vaso vasorum” assim como o humano e também tem uma anatomia histológica semelhante; no entanto vasos sanguíneos e o átrio em suínos tendem a ser mais friáveis que outras espécies, especialmente nos neonatos. Os vasos sanguíneos também são mais susceptíveis a espasmos quando manipulados. A veia jugular externa e sua bainha estão aproximadamente na mesma profundidade em relação à superfície ventral da vértebra cervical. O sulco da jugular pode ser visualizado desde o ramo da mandíbula ao ponto de inserção do membro anterior junto ao ombro. Muitos dos vasos periféricos estão localizados relativamente profundos quando comparados com outras espécies, no entanto a cateterização dos vasos é obtida com agulhas padrão nas veias cefálica, jugular externa e interna, auricular, anterior abdominal, safena e femoral. Todos esses vasos bem como as abdominais e torácicas internas podem ser cateterizadas cirurgicamente por longo prazo (SWINDLE, 1983; SWINDLE; ADAMS, 1988; SWINDLE, 1998).

Hemodinamicamente falando o suíno tem demonstrado ser parecido com o humano no que diz respeito à função cardíaca. Existem variações entre raças e idade dos animais que devem ser levados em conta, temos como exemplo o mini-pig da raça Youcatan que tem um aumento significativo na resistência vascular pulmonar quando comparado com o Hanford. Este por sua vez possui uma alta pressão sistólica quando comparado com o Youcatan nas mesmas condições. Por isso quando estudos laboratoriais são feitos deve-se ter o cuidado na comparação das funções hemodinâmicas em diferentes raças (SMITH; SPINALE; SWINDLE, 1990).

No suíno, o desenvolvimento da aterosclerose ocorre tanto espontânea quanto através de indução experimental em suíno submetido à dieta aterogênica. O metabolismo de lipoproteínas é similar ao humano. Danos endoteliais com cateter balão podem ser utilizados para localizar o sítio de desenvolvimento da placa de aterosclerose, no entanto, a distribuição das placas de aterosclerose será similar a dos humanos em desenvolvimento espontâneo. A histologia e patogenia das placas parecem ser similares a dos humanos também (GAL; ISNER, 1992; WHITE et al., 1992).

Os suínos também apresentam outras anomalias cardiovasculares congênicas incluindo: defeito no septo ventricular (VSD), defeito no septo atrial, persistência do forame oval, persistência do ducto arterioso e displasia de tricúspide. Cardiomiopatia hipertrófica também ocorre espontaneamente em algumas raças de suínos (SWINDLE, 1992). O modelo de VSD em suínos tem sido desenvolvido geneticamente e demonstra ser análogo ao desenvolvimento da doença em crianças. "Shunts" congênicos podem ser também criados pela técnica de angioplastia com balão. Se o "shunt" for reaberto por cateter balão em neonatos, eles permanecerão abertos e desenvolverão hipertrofia por excesso de volume. Também desenvolverão sobrecarga de pressão hipertrófica nos grandes vasos do coração, como em outras espécies (SWINDLE, 1998).

A maioria dos modelos cardiovasculares suínos (STANTON; MERSMANN, 1986; SWINDLE, 1998) está relacionado com desenvolvimento de catéteres intervencionistas (GAL; ISNER, 1992; SWINDLE, 1998), aterosclerose (WHITE et al., 1992), infarto do miocárdio (GARDNER; JOHNSON, 1988; BLOOR; WHITE; ROTH, 1992), fluxo sanguíneo coronário (GARDNER; JOHNSON, 1988; BLOOR; WHITE; ROTH, 1992), eletrofisiologia intracardiaca (BROWNLEE et al., 1997) e cirurgia cardiovascular (SWINDLE, 1986; SWINDLE, 1998), predominantemente com a implementação de dispositivos biomecânicos (MEHRAN et al., 1991; GAL; ISNER, 1992).

As características que levaram o suíno a superar outras espécies para o desenvolvimento desse modelo estão relacionadas com a anatomia e fisiologia descritas acima. O modelo suíno desenvolve um padrão de infarto semelhante ao humano e desenvolve também atividade arritmogênica com reperfusão. Para cicatrização intravascular, pode ser necessária a utilização de vários modelos, pois nenhum é exatamente análogo ao humano. O suíno tem a vantagem do tamanho previsível e função plaquetária, ao contrário do cão. Nem mesmo o modelo primata é exatamente análogo, os modelos de cicatrização do miocárdio, geralmente são suínos, cães ou ovelhas. O modelo de cicatrização do miocárdio suíno tem mais similaridades em analogia do que o modelo ovino, uma vez que o processo de cicatrização dos ruminantes se dá pela formação de deposição de colágeno (MEHRAN et al., 1991).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Neste estudo, buscamos a caracterização do número total, o volume, e a densidade de cardiomiócitos presentes no ventrículo esquerdo de corações de suínos saudáveis, com o intuito de obter dados para uma futura comparação entre animais saudáveis e animais infartados submetidos a tratamento com terapia celular. Sendo assim, os seguintes aspectos serão avaliados:

- Densidade de cardiomiócitos.
- Número total de cardiomiócitos.
- Tamanho de cardiomiócitos.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 3 suínos, fêmeas, com peso médio de 25Kg, saudáveis, oriundos da granja J.A. agropecuária localizada na cidade de Holambra-SP. Os animais foram alojados em baias apropriadas (Figura 1) localizadas no Departamento de Clínica Médica (VCM) na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP).



Figura 1- Animais alojados em baias apropriadas, na FMVZ/USP

4.1 TÉCNICAS ANESTÉSICAS E EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Ainda nas baias, os animais foram pré-anestesiados com Cloridrato de Quetamina¹ (Dopalen[®] - Vetbrand) na dose de 3 mg/Kg associada a Midazolan² (Dormire[®] - Cristália) na dose de 0,5mg/Kg via intramuscular (IM). Posteriormente os animais foram transportados para o Setor de Anatomia, onde tiveram uma veia auricular canulada (Figura 2), através da qual receberam uma injeção com dose letal de KCl (cloreto de potássio).

¹ Dopalen[®] Vetbrands: Avenida Perimetral Norte Q95,3483 It 625, Goiânia-GO

² Dormire[®] Cristália: Av. Paoletti, 363 - Nova Itapira

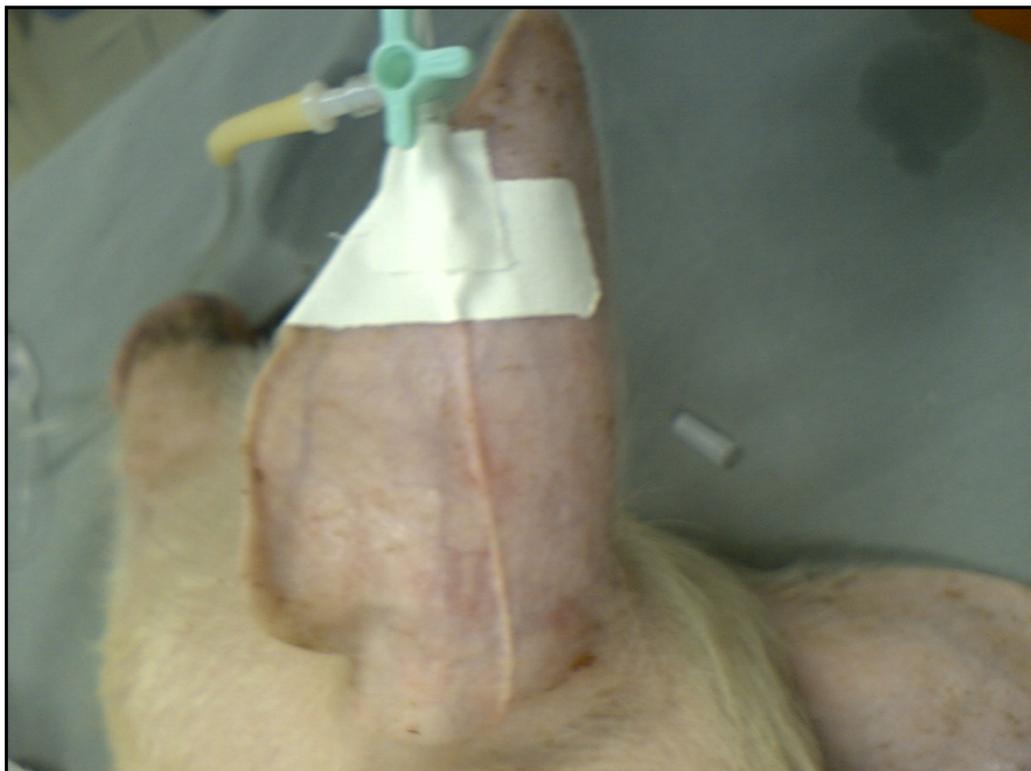


Figura 2 - Veia auricular canulada, para injeção dos medicamentos

4.2 COLETA DE MATERIAL E AMOSTRAGEM

As técnicas empregadas para coleta e amostragem do material de interesse são descritas a seguir.

4.2.1 Coleta de Material

Após constatado o óbito a cavidade torácica foi exposta pela incisão nas articulações costo-vertebrais proporcionando a localização dos principais vasos arteriais e venosos do tórax. Após isolamento da parte torácica da aorta, foi introduzida em sua luz, uma cânula com calibre compatível ao diâmetro do vaso, a qual foi fixada com fio de sutura, para que em seguida ocorresse a secção das veias cavaudal e cranial. A perfusão pela aorta foi feita com Tampão fosfato (PBS) a 0,1M e pH 7,4 e heparina a 2% tendo a função de lavagem dos sistema arterial e venoso. Para a fixação, foi perfundido pela aorta a solução fixadora de Karnovsky modificada, constituída por glutaraldeído 5% e formaldeído a 1% em tampão cacodilato de sódio a 0,125M e pH 7,4.

4.2.2 Amostragem

Após esse procedimento, o coração foi retirado e pesado em balança (Filizola[®]), em seguida as câmaras cardíacas foram dissecadas e separadas seguindo-se a pesagem de cada umas delas individualmente.

O ventrículo esquerdo foi então colocado em uma superfície plana. Em um sistema teste composto por 900 aberturas (36 X 25) com 0,4mm de diâmetro distanciados 0,3mm entre si, foi colocado sobre o ventrículo esquerdo para amostragem. A amostragem foi realizada de modo aleatório e sistemático com o auxílio de um trocater (Brasmed[®])³, sendo que para tal um numero aleatório entre 1 e n foi escolhido para o inicio da amostragem e uma fração de 1/n também foi aplicada. Um total de 12 amostras por ventrículo esquerdo de cada animal foi obtida. Essas amostras foram mantidas e fixadas em solução de Karnovski 3:1 por período de 24h em temperatura ambiente, para então serem processadas para microscopia de luz. Apenas uma fração de ½ das amostras foram submetidas ao processamento histológico. A segunda metade foi mantida como “*back up*” em solução fixadora.

Após fixação, o material foi submetido à desidratação, em séries crescentes de álcool 70%-90%, álcool90%+ resina e resina. Esse material foi então separado e colocado em tubos separados, esses tubos foram preenchidos com uma solução de álcool 70% feita com 70 ml de álcool e 30 ml de água, permanecendo nessa solução por um período de 2horas, após esse período, o álcool 70% foi substituído por uma solução de álcool 95% onde permaneceu também por 2 horas. Passado esse tempo uma solução composta de álcool 95° mais Resina (Leica[®]), na proporção de 1:1, foi utilizada no material e deixada agindo por 4 horas, decorrida mais essa etapa o material foi colocado em formas separas e identificadas, onde as mesmas foram preenchidas com resina e deixadas em repouso “*overnight*”.

Após esse período as amostras com tamanho aproximado de 5 mm foram retiradas cuidadosamente dos tubos. Com o intuito de se obter blocos de tecido com orientação isotrópica, o material foi rolado aleatoriamente sobre uma superfície plana. Serão então posicionados, na mesma posição após o rolamento, em fôrmas próprias para emblocamento, sendo, então, emblocados com solução composta de 15 ml de resina (Leica[®])⁴ mais 1 ml do Endurecedor (Hardener[®])⁵. Em seguida, as formas foram cobertas com filme plástico, e seguiram para a estufa à 37°C onde permaneceram por 24 horas, até o total endurecimento

³ Brasmed[®]: Rua Augusta, 1372 - Jardim América - Sao Paulo – SP

⁴ Leica[®]: Rua Lorenzo Ghibert, 184 Jaguaré, São Paulo 05329010, SP

⁵ Hardner[®]: Rua Lorenzo Ghibert, 184 Jaguaré, São Paulo 05329010, SP.

dos blocos. Os blocos foram trimados para evidenciar as regiões de interesse e seccionados seriadamente com 2 μ m de espessura, com o auxílio do ultra-micrótomo MT-XL[®] equipado com um contador de secções e utilizando navalha de vidro. As secções foram coletadas sobre lâminas e secas em placa térmica (Leica[®])⁶, e em seguida coradas com uma solução de hematoxilina e fluxina. Posteriormente foram cobertas com uma gota de araldite (502 Polyscience Inc.[®]) e montadas sob lamínula. A observação do material e a captura da imagem foram realizadas com o auxílio do microscópio Olympus[®] BX 60 e de uma câmera digital AxioCam HPC Zeiss[®], na qual a imagem da “reference section” e da “look –up section” foi capturada e transferida para o software Photoshop[®].

4.3 ANÁLISE ESTEREOLOGICA

O objetivo da estereologia é determinar parâmetros quantitativos tridimensionais de estruturas anatômicas a partir de cortes bidimensionais, valendo-se da geometria e da estatística (MANDARIM-DE-LACERDA, 1994). Para tanto neste projeto foram utilizados o método do “*nucleator*” em associação a amostragem realizada pelo método do “*doubled-disector*” físico.

4.4 MÉTODO DISECTOR FÍSICO

A amostragem dos cardiomiócitos no ventrículo esquerdo do coração dos suínos foi realizada utilizando o método estereológico do “*disector*” físico. Cada “*disector*” é constituído por duas secções consecutivas e similares separadas por uma altura conhecida, sendo estas secções denominadas de “*reference-section*” e “*look-up section*”. Os perfis celulares de cada cardiomiócito em ambas são denominadas de “*transects*”. A quantificação dos “*transects*” é feita pela comparação entre as secções, sendo considerados apenas os “*transects*” presentes na “*reference-section*” e que estejam ausentes na “*look-up section*” (GAGLIARDO, 2003). Para melhor acurácia dos resultados, empregamos uma modificação do “*disector*” físico denominado de “*doubled-disector*”.

As imagens adquiridas foram montadas seqüencialmente utilizando-se a ferramenta de camadas do software citado acima. Deste modo uma área teste composta por 9 frames e linhas

⁶ Leica[®]: Rua Lorenzo Ghibert, 184 Jaguaré, São Paulo 05329010, SP.

de inclusão e exclusão foi sobreposta sobre as “*reference sections*”, buscando-se assim amostrar os cardiomiócitos presentes no campo. A altura do “*disector*” será de 12,5 μm . Os cardiomiócitos contendo nucléolo presente nas “*reference sections*” e ausentes nas seções “*look-up*” foram então considerados (Figura 3), para mensuração pelo método do “*nucleator*”.

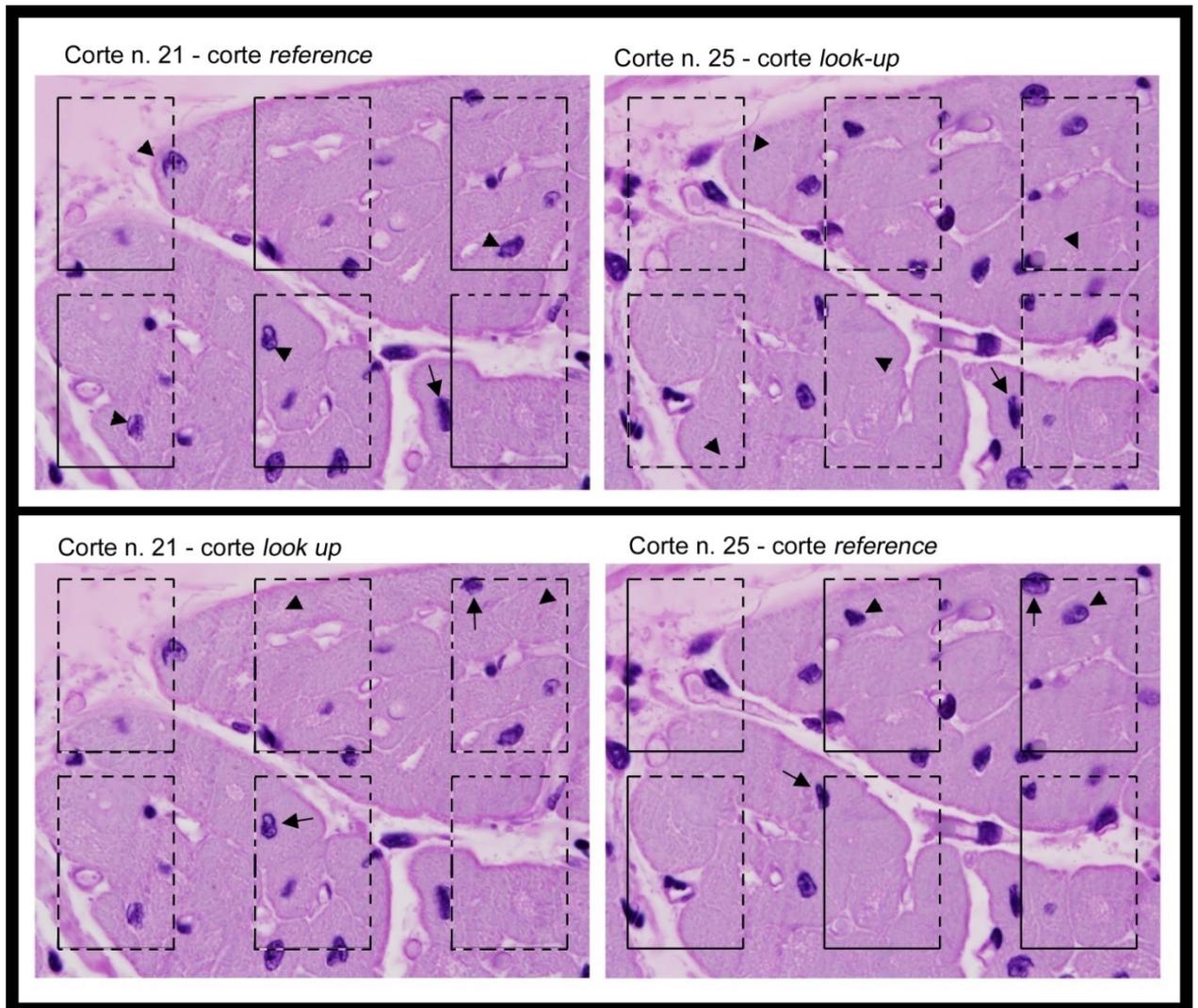


Figura 3 - Fotomontagem de cortes seriados de miocárdio de ventrículo esquerdo de suínos normais. As cabeças de setas cheias (\blacktriangle) indicam núcleos de cardiomiócitos selecionados pela área de inclusão para aplicação subsequente da técnica do nucleator. As setas pretas (\rightarrow) representam cardiomiócitos desconsiderados por atingirem a linha de exclusão nas frames dos cortes *reference*. Nota-se na figura, dois sentidos de aplicação do *disector*. Na montagem superior, o sentido do *disector* é 21-25, observando-se que o corte 21 é considerado, o corte *reference* com aplicação das frames contendo linhas de inclusão e exclusão enquanto que o corte 25 foi considerado o corte *look-up* com frames de linhas abertas. Na montagem inferior o sentido do *disector* é 25-21 no qual observa-se as mesmas réguas de aplicação de frames

4.5 MÉTODO DO NUCLEATOR

O método do “nucleator” baseia-se na classificação das células, a partir do seu núcleo, utilizando-se uma régua de classes (Figura 4). A régua de classes será orientada aleatoriamente sobre a gride de orientação. A angulação obtida com a régua de classes foi sobreposta sobre o nucléolo do cardiomiócito (Figura 5) a fim de se obter as classes de distância do núcleo a membrana celular. A partir das classes calculamos a densidade, o número e o volume de cardiomiócitos.

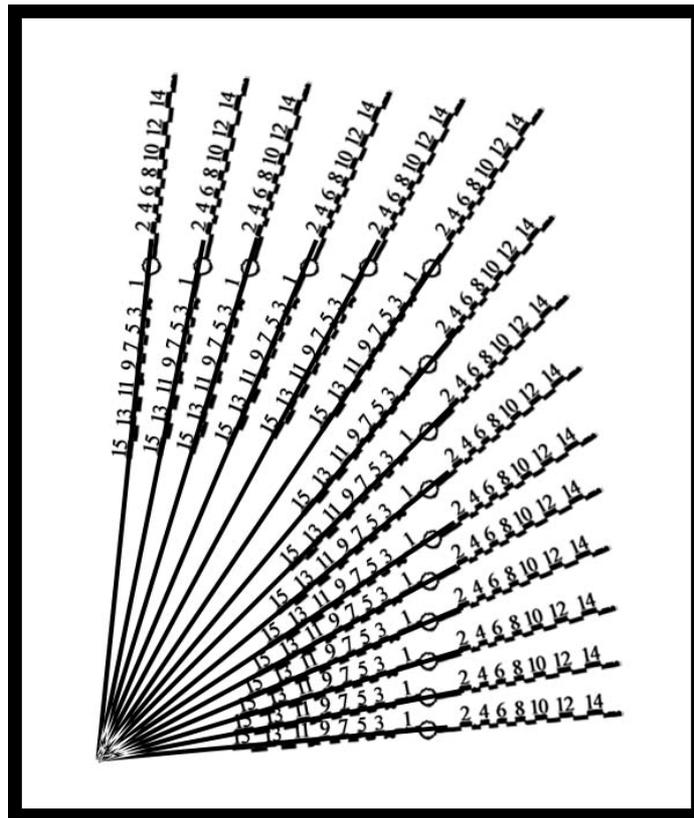


Figura 4 - Régua de Classes do *Nucleator*

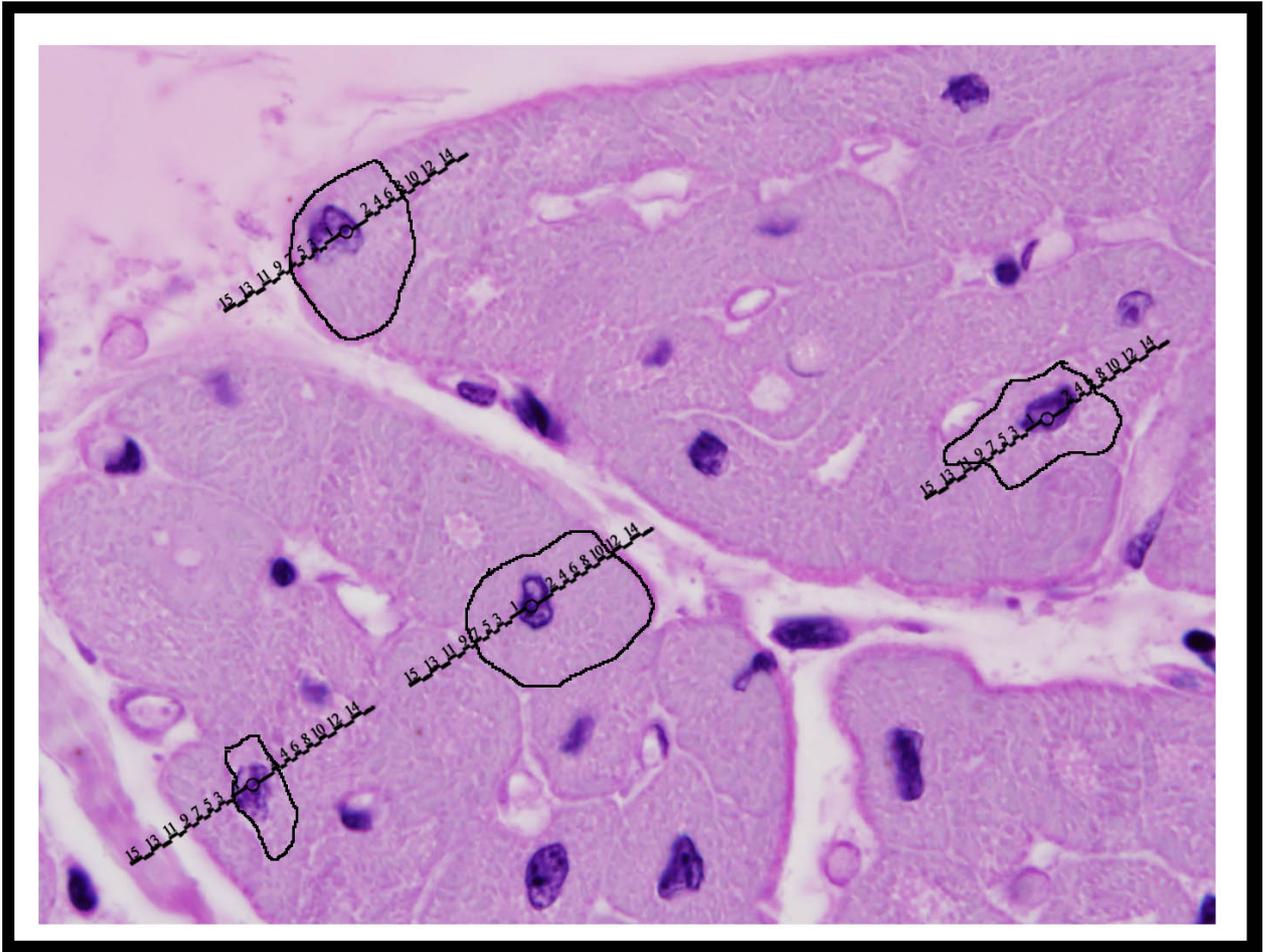


Figura 5- Fotomicrografia do corte 21 analisado pelo método do *disector*, o qual selecionou quatro núcleos de cardiomiócitos. Sobre esses núcleos foi disposta a régua de classe do *nucleator* à sexta angulação, medindo-se assim os limites dos cardiomiócitos selecionados

4.5.1 Estimativa do volume médio e da área de secção do cardiomiócito

O volume médio foi calculado aplicando-se a seguinte fórmula:

$$\bar{v}(\text{myocyte}) := \frac{V(\text{myocyte}, \text{LV})}{N(\text{myocyte}, \text{LV})}$$

Nesta fórmula $V(\text{myocyte}, \text{LV})$ é o volume total de cardiomiócitos, e $N(\text{myocyte}, \text{LV})$ é o número total de núcleos de cardiomiócitos. A área seccional dos cardiomiócitos será calculada pela fórmula:

$$\bar{a}(\text{myocyte}) := \frac{V_v(\text{myocyte})}{L_v(\text{myocyte})}$$

Onde, $V_v(\text{myocyte})$ é a densidade de volume total de cardiomiócitos e $L_v(\text{myocyte})$ é o comprimento do cardiomiócito.

4.5.2 Coeficiente de variância e coeficiente de erro

O coeficiente de variância foi calculado através da divisão entre o desvio padrão e a média. O coeficiente de erro foi calculado pela razão entre a estimativa da densidade numérica de núcleos de cardiomiócitos, e pela média do número de núcleos por cardiomiócito.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados da mensuração e quantificação de cardiomiócitos foram expressos com média \pm erro padrão da média e plotados em histogramas, utilizando o programa computacional Microsoft “*Excel*”.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos a partir das técnicas empregadas são discorridos a seguir.

5.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA

A análise macroscópica foi realizada após abertura da cavidade torácica e exposição do coração ainda na sua posição anatômica normal. Isso nos mostrou normalidade quanto à localização do coração em relação aos outros órgãos da cavidade torácica, após a retirada do mesmo. Pode-se observar integridade do órgão não se mostrando evidente nenhum tipo de anomalia em relação a sua forma, ou até mesmo em relação à posição dos vasos basais, pericárdio ou qualquer tipo de aderência patológica (Figura 6).

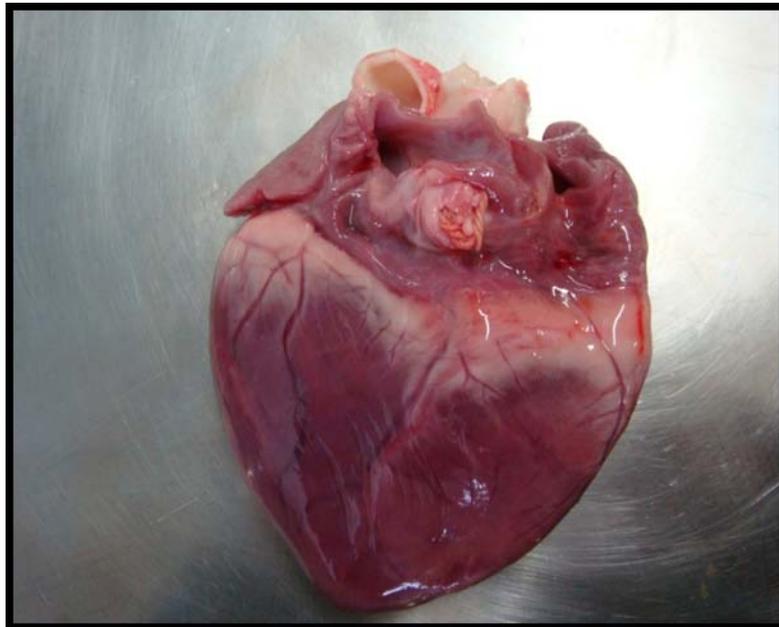


Figura 6 - Fotografia do coração de suíno, demonstrando aspecto normal de formação dos ventrículos e porção basal, bem como da posição dos vasos principais

5.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA

Após análise das lâminas em microscopia de luz, não foram observadas alterações. Cardiomiócitos, fibroblastos, vasos sanguíneos e fibras cardíacas, demonstrando normalidade nos padrões microscópicos observados no órgão. Observou-se que os cardiomiócitos eram células bem definidas e delimitadas pelas membranas celulares justapostas umas às outras. Os cardiomiócitos encontravam-se dispostos em agrupamentos formando feixes musculares definidos pelo perimísio. Entre os agrupamentos musculares foi possível a identificação de vasos sanguíneos (Figura 7).

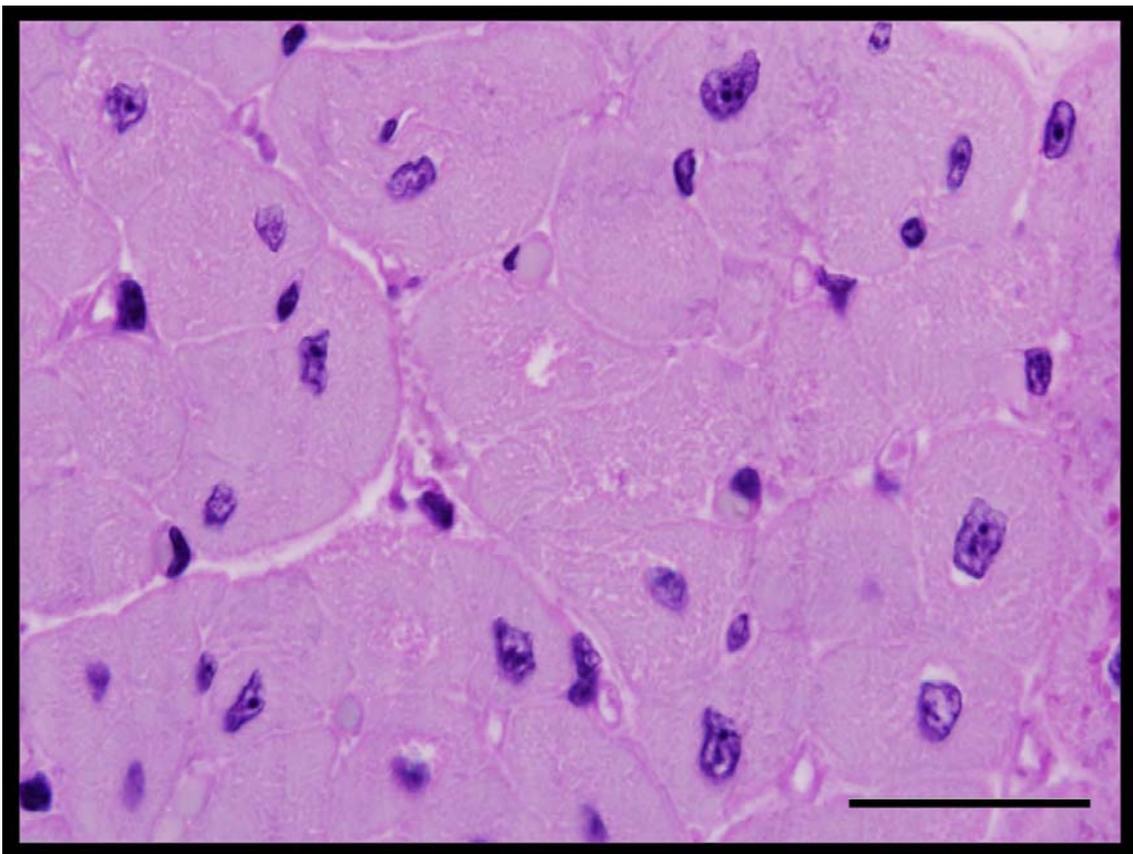


Figura 7 - Fotomicrografia do ventrículo esquerdo de suínos saudáveis demonstrando a presença de cardiomiócitos bem definidos pela membrana celular formando agrupamentos celulares delimitados por perimísio. Os cardiomiócitos apresentavam núcleo e nucléolos evidentes. Observa-se a presença de vasos sanguíneos entre os agrupamentos musculares. Escala de Barra: 60 µm, Coloração: Hematoxilina-fluxina

5.3 ANÁLISE ESTEROLÓGICA

O peso do ventrículo esquerdo dos animais (P) foi mensurado e obtiveram-se os seguintes valores: Animal 1- 640 mg, Animal 2- 660 mg, Animal 3- 680 mg. A média de peso foi de 660mg

Após a obtenção desses valores de P multiplicou-se pelo fator 1.06 (Princípio de Arquimedes), obtendo-se o Volume (Nv), sendo para o animal 1, Nv-603,77 cm³, Animal 2, Nv- 622,64 cm³, e animal 3, Nv- 641,51 cm³. A média do grupo foi de 622.64 cm³.

Utilizando-se as régua de classe do Nucleator foi possível obter o volume médio de cada cardiomiócito sendo para o animal 1 de 17,15 μm³, animal 2 de 15,15 μm³, animal 3 de 16,66 μm³, com média para o grupo de 16.32 μm³, desvio padrão (DP) de 1,04, e coeficiente de variância (CV) de 0,06.

O numero total de cardiomiócitos obtidos foi: animal 1 de 3,62x10⁸, animal 2 de 4,11x10⁸, e, animal 3- 4,00x10⁸. A média do grupo foi de 3,91x10⁸, desvio padrão (DP) de 0,63, e coeficiente de variância (CV) de 0,13.

O volume de cardiomiócitos que ocupam o ventrículo esquerdo foi de 3,35x10⁶ para o animal 1, animal 2 de 3,28x10⁶, e animal 3 de 3,35x10⁶, com média grupal de 3,32 x10⁶, desvio padrão (DP) de 0,04 e coeficiente de variância (CV) de 0,01. Os resultados encontrados após a análise estereológica foram compilados de forma resumida na tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Tabela demonstrando os resultados obtidos com avaliação de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo de coração de suínos normais pelas técnicas do *disector* e do *nucleator* associadas - São Paulo, SP – 2009

Animais	Peso do ventrículo esquerdo (mg)	Número Total de Cardiomiócitos	Volume médio de Cardiomiócitos (μm^3)	Volume (Nv) (cm^3)	Estimativa do volume médio de cardiomiócitos no ventrículo esquerdo
Animal 1	640 mg	3.62×10^8	$17.15 \mu\text{m}^3$	603.77 cm^3	3.35×10^6
Animal 2	660 mg	4.11×10^8	$15.15 \mu\text{m}^3$	622.64 cm^3	3.28×10^6
Animal 3	680 mg	4.00×10^8	$16.66 \mu\text{m}^3$	641.51 cm^3	3.35×10^6

Tabela 2 - Tabela demonstrando os resultados e as médias obtidos com a aplicação de associação dos métodos do *disector* e do *nucleator* na análise de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo do coração de suínos normais - São Paulo, SP - 2009

	Número Total de Cardiomiócitos	Volume médio de Cardiomiócitos (μm^3)	Estimativa do volume médio de cardiomiócitos no ventrículo esquerdo
Animal 1	$3,62 \times 10^8$	$17,15 \mu\text{m}^3$	$3,35 \times 10^6$
Animal 2	$4,11 \times 10^8$	$15,15 \mu\text{m}^3$	$3,28 \times 10^6$
Animal 3	$4,00 \times 10^8$	$16,66 \mu\text{m}^3$	$3,35 \times 10^6$
Média	$3,91 \times 10^8$	$16,32 \mu\text{m}^3$	$3,32 \times 10^6$
Desvio Padrão (DP)	0,63	1,04	0,04
Erro Padrão (CV)	0,13	0,06	0,01

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O estudo da morfometria do ventrículo esquerdo em suínos é de extrema importância, pois a espécie representa o modelo ideal para estudos em humanos. O coração sempre foi alvo de inúmeros estudos em humanos devido à alta casuística de problemas relacionados ao mesmo. Estes problemas ultimamente têm aumentado consideravelmente em decorrência do estilo de vida sedentário, altos níveis de estresse, fumo e obesidade observados em boa parte da população.

A escolha do modelo suíno se mostra bastante vantajosa em relação a outros modelos animais usados comumente, entre as principais vantagens destacamos as similaridades existentes entre o coração humano e o coração do suíno tais como o tamanho de um suíno de 40 a 50 kg ser do tamanho do coração de um humano adulto (SWIDLE, 1998; SMITH; SPINALE; SWIDLE, 1990). Outro fator que nos levou a escolher essa espécie foi o fato de que a maioria dos modelos cardiovasculares suínos têm sido utilizadas para infarto do miocárdio (GARDNER; JOHNSON, 1988; BLOOR; WHITE; ROTH, 1992). Este modelo se encaixa perfeitamente nas perspectivas desse trabalho, o qual serve como base para estudos futuros em animais submetidos a infarto, e posteriormente em animais infartados e possivelmente tratados com terapia celular, tendo em vista que hoje em dia já existem alguns trabalhos que abrangem essa técnica (BRANCO et al., 2009)¹.

O coração de suínos é descrito na literatura como ocupando o tórax nos espaços da segunda e da quinta costela abrangendo mais do que a metade ventral do espaço torácico disponível, no animal em estação, fica coberto pelo braço e pelos tríceps, mas pode-se tornar acessível levantando-se o membro para frente. A incisura cardíaca direita é maior que a esquerda permitindo ao coração um contato maior com a parede torácica desse lado (DYCE; SACK; WENSIWG, 2004).

Descrivem-se na literatura que os cardiomiócitos são as maiores células encontradas no miocárdio e ocupam 75% de seu espaço estrutural, no entanto constituem somente 1/3 da população celular de um miocárdio adulto. As outras células remanescentes estão no interstício cardíaco, que é constituído principalmente por fibroblastos e células mesenquimais

¹ BRANCO, E.; FIORETO E. T.; CABRAL, R.; SARMENTO, C. A. P.; GREGORES, G. B.; STOPIGLIA, A. J.; MAIORKA, P. C.; LEMOS, P. A.; TAKIMURA, C.; CAMPOS, C. A.; RAMIREZ, J. A. F.; MIGLINO, M. A. Myocardial homing after intrapericardial infusion of bone marrow mononuclear cells. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, 2009. (in press).

mas também possui macrófagos e outros tipos celulares (WEIBEL, 1989). Descreve-se ainda que os cardiomiócitos dispõem-se em malha ligados por uma matriz de tecido colágeno fibroso. A avaliação subjetiva dos cortes histológicos do ventrículo esquerdo de suínos hígidos realizada neste trabalho demonstram ampla ocupação do tecido por cardiomiócitos dispostos de modo a formarem feixes, entremeando ainda, o tecido colágeno e vasos sanguíneos conforme descrito na literatura.

No que tange a descrição de modo geral sobre a distribuição e ocupação de cardiomiócitos no miocárdio, conforme já descrito acima, há referência de que os cardiomiócitos ocupam cerca de 1/3 da população celular total presente no miocárdio. Em nosso estudo, a avaliação quantitativa de cardiomiócitos empregando-se métodos estereológicos demonstrou que os cardiomiócitos preenchem em média 76% do espaço estrutural do ventrículo esquerdo. Ressaltamos que neste trabalho, empregou-se ferramentas estereológicas, as quais demonstram maior confiabilidade aos resultados quando comparados com os dados de literatura que foram obtidos por técnicas simples de amostragem como a avaliação única ou múltipla, porém assistemático, de cortes bidimensionais, inferindo-se o seu resultado ao plano tridimensional de construção do órgão com a aplicação de fatores de correção. Por outro lado, as ferramentas estereológicas apesar de também avaliarem cortes seccionais bidimensionais, o fazem de modo, consecutivo e sistemático, permitindo-se assim avaliar-se a amostra como um todo, e deste modo, os cálculos dos resultados para o plano tridimensional são mais confiáveis.

O uso do “*disector*” como ferramenta de mensuração de cardiomiócitos é uma metodologia bastante utilizada por vários pesquisadores sempre com resultados fidedignos, pois o mesmo permite contar partículas independentemente do tamanho, forma, distribuição ou orientação, em um volume conhecido, utilizando pares de secções provenientes de cortes seriados (PAKKENBERG; GUNDERSEN, 1988; COGGESHALL, 1991; COGGESHALL; LEKAN, 1996). No presente trabalho a utilização de uma modificação do “*disector*” físico denominada “*double-disector*” juntamente com outra ferramenta estereológica o “*nucleator*” foram as escolhidas, pois as mesmas se encaixam perfeitamente no tipo de mensuração proposto, uma vez que o “*double-disector*” analisa não só um sentido da imagem, e sim ambos os sentidos, tornando essa mensuração a mais confiável possível e o “*nucleator*” devido ao fato dos cardiomiócitos apresentarem nucléolos bem definidos o que possibilita que as mensurações sejam feitas também de forma confiável.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Com a finalização do trabalho, podemos concluir que:

A estereologia através de seus métodos mostrou-se uma ferramenta confiável na quantificação dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo de suínos uma vez que tornou possível o cumprimento dos objetivos propostos.

Tendo sido encontrados: O Volume (Nv), sendo para o animal 1, Nv-603,77 cm³, Animal 2, Nv- 622,64 cm³, e animal 3, Nv- 641,51 cm³. A média do grupo foi de 622.64 cm³.

Através da utilização das régua de classe do Nucleator foi possível obter o volume médio de cada cardiomiócito, sendo para o animal 1 de 17,15 μm³, animal 2 de 15,15 μm³, animal 3 de 16,66 μm³, com média para o grupo de 16.32 μm³, desvio padrão (DP) de 1,04, e coeficiente de variância (CV) de 0,06.

O número total de cardiomiócitos obtidos foi: animal 1 de 3,62x10⁸, animal 2 de 4,11x10⁸, e, animal 3- 4,00x10⁸. A média do grupo foi de 3,91x10⁸, desvio padrão (DP) de 0,63, e coeficiente de variância (CV) de 0,13.

O volume de cardiomiócitos que ocupam o ventrículo esquerdo foi de 3,35x10⁶ para o animal 1, animal 2 de 3,28x10⁶, e animal 3 de 3,35x10⁶, com média grupal de 3,32 x10⁶, desvio padrão (DP) de 0,04 e coeficiente de variância (CV) de 0,01

O suíno é realmente o modelo animal que mais se assemelha ao humano no que diz respeito a estudos relacionados ao coração.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear population from microtomic sections. **Anatomical Records**, v. 94, p. 239-247, 1946.
- AGUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Blood pressure, ventricular volume and number of cardiomyocyte nuclei in rats fed for 12 months on diets differing in fat composition. **Mechanisms of Ageing Development**, v. 122, p. 77-88, 2001.
- AGUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.; APFEL M. I. R. Estereologia do miocárdio de ratos jovens e idosos. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 70, n. 2, p. 105-109, 1998.
- AHERNE, W. A.; DUNNILL, M. S. **Morphometry**. London: Edward Arnold, 1982. 205 p.
- ALMEIDA, J. R.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Quantitative study of the comma-shaped body, Sshapedbody and vascularized glomerulus in the second and third human gestational trimesters. **Early Human Development**, v. 69, n. 1-2, p. 1-13, 2002.
- ANDERSEN, B. B.; PAKKENBER, G. B. Stereological quantitation in cerebella from people with schizophrenia. **Brasilian Journal of Psychiatry**, v. 182, p. 354-361, 2003.
- BJARKAM, C. R.; PEDERSEN, M.; SORENSEN, J. C. New strategies for embedding, orientation and sectioning of small brain specimens enable direct correlation to MR-images, brain atlases, or use of unbiased steriology. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 108, p. 153-159, 2001.
- BLOOR, C. M.; WHITE, F. C.; ROTH, D. M. The pig as a model of myocardial ischemia and gradual coronary occlusion. In: SWINDER, M. M. (Ed.). **Swine as models in biomedical research**, Ames, IA: Iowa State University Press, 1992. p. 163-175.
- BOLENDER, R. P. Biological stereology: history, present state, future directions. **Microscopy Research and Technique**, v. 21, p. 255-261, 1992.
- BOLENDER, R. P. Stereology: applications to pharmacology. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 21, p. 549-573, 1981.
- BRAENDGAARD, H.; EVANS, S. M.; HOWARD, C. V.; GUNDERSEN, H. J. G. The total numbers of neurons in the human neocortex unbiased estimated using disectors. **Journal of Microscopy**, v. 157, p. 285-304, 1988.
- BROWNLEE, R. R.; SWINDLE, M. M.; BERTOLET, R.; NEFF, P. Toward optimizing a preshaped catheter and system parameters to achieve single lead DDD pacing. **Pacing and clinical electrophysiology: PACE**, v. 20, n. 5, Pt. 1, p. 1354-1358, 1997.

BRÜEL, A.; NYENGAARD, J. R. Design-based stereological estimation of total number of cardiac myocytes in histological sections, **Basic Research in Cardiology**, v. 100, p. 1-9, 2005.

CHACHQUES, J. C.; ACAR, C.; HERREROS, J.; TRAININI, J. C.; PROSPER, F.; D'ATTELIS N, FABIANI, J.-N.; CARPENTIER, A. F. Cellular cardiomyoplasty: clinical application. **Annals of thoracic surgery**, v. 77, p. 1121-1130, 2004.

CHALKLEY, H. W. Methods for quantitative morphological analysis of tissue. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 4, p. 47-53, 1943.

CHALKLEY, H. W.; CORNFIEL, D. J.; PARK, H. C. A method for estimating volume-surface ratios. **Science**, v. 110, p. 295-301, 1949.

CHARLESTON, L. B.; THYER, A. C.; KLEIN, N. A.; SOULES, M. R.; CHARLESTON, J. S. An improved method for the production of slides from oversized samples of glycol methacrylate-embedded tissues: Application for optical disector based stereology. **Journal of Histotechnology**, v. 26, p. 49-52, 2003.

COGGESHALL, R. E. A consideration of neural counting methods. **Trends in Neuroscience**, v. 15, p. 9-13, 1991.

COGGESHALL, R. E.; LEKAN, H. A. Methods for determining numbers of cells and synapses: a case for more uniform standards of review. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 364, p. 6-15, 1996.

COLLAN, Y. Stereology and morphometry in histopathology. Principles of application. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, v. 7, p. 237-241, 1985.

COLLAN, Y. Stereology in diagnostic pathology. **Pathologica**, v. 89, p. 462-466, 1997.

CRICK, S. J.; SHEPPARD, M. N.; HO, S. Y.; ANDERSON, R. H. Localisation and quantification of autonomic innervation in the porcine heart I: conduction system. **Journal of Anatomy**, v. 195, p. 341-357, 1999.

DAVEY, M. G.; HEDRICK, H. L.; BOUCHARD, S.; ADZICK, N. S.; FLAKE, A. W.; DOOLIN, E. J. Computer-assisted stereology: Point fraction of lung parenchyma and alveolar surface density in fetal and newborn sheep. **Scanning**, v. 25, p. 37-44, 2003.

DENGLER, T. J.; KATUS, H. A. Stem cell therapy for the infarcted heart ("cellular cardiomyoplasty"). **Herz**, v. 7, p. 598-610, 2002.

DUFFELL, S. J.; SOAMES, A. R.; GUNBY, S. Morphometric analysis of the developing rat brain. **Toxicologic Pathology**, v. 28, p. 157-163, 2000.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSIWG, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 813 p.

ELIAS, H.; HYDE, D. M.; MULLENS, R. S.; LAMBERT, F. C. Colonic adenomas: stereology and growth mechanisms. **Diseases of the Colon and Rectum**, v. 24, p. 331-342, 1981.

FRANDSON, R. D.; LEE WILKE, W.; FAILS, A. D. **Anatomia e fisiologia dos animais de fazenda**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 454 p.

GAGLIARDO, K. M. **Número total de neurônios no gânglio mesentérico caudal de cães domésticos nas diferentes fases do desenvolvimento. Qual o papel da idade na população total e no tamanho dos neurônios?** 2003. 111 p. (Dissertação em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

GAL, D.; ISNER, J. M. **Atherosclerotic Yucatan microswine as a model for novel cardiovascular interventions and imaging**. In: SWINDLE, M. M. (Ed.). **Swine as Models in Biomedical Research**. Ames, IA: Iowa State University Press, 1992. p. 118-140.

GARDNER, E.; GRAY, D. J.; O'RAHILLY, R. **Anatomia**: estudo regional do corpo humano. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1971.

GARDNER, T. J.; JOHNSON, D. L. Cardiovascular system. In: SWINDLE, M. M.; ADAMS, R. J. (Ed.). **Experimental surgery and physiology**: induced animal models of human disease. Baltimore: Williams & Wilkins, 1988. p. 74-124.

GEUNA, S.; TOS, P.; BATTISON, B.; GUGLIELMONE, R. Verification of the two-dimensional disector, a method for the unbiased estimation of density and number of myelinated nerve fibers in peripheral nerves. **Annals of Anatomy**, v. 182, p. 23-34, 2000.

GUNDERSEN, H. J.; JENSEN, E. B.; KIEU, K.; NIELSEN, J. The efficiency of systematic sampling in stereology-reconsidered. **Journal of Microscopy**, v. 193, p. 199-211, 1999.

GUNDERSEN, H. J. G. Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of new ones, in memory of William R. Thompson. **Journal of Microscopy**, v. 143, Pt. 1, p. 3-45, 1986.

GUNDERSEN, H. J. G. The smooth fractionator. **Journal of Microscopy**, v. 207, p. 19-210, 2002.

GUNDERSEN, H. J. G. BENDTSEN, T. F.; KORBO, L.; MARCUSSEN, N.; MOLLER, A.; NIELSEN, K.; NYENGAARD, J. R.; PAKKENBERG, B.; SORENSEN, F. B.; VESTERBY, A.; WEST, M. J. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 96, p. 379-394, 1988a.

GUNDERSEN, H. J. G.; BENDTSEN, T. F.; KORBO, L.; MARCUSSEN, N.; MOLLER, A.; NIELSEN, K.; NYENGAARD, J. R.; PAKKENBERG, B.; SORENSEN, F. B.; VESTERBY, A.; WEST, M. J. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 96, p. 857-881, 1988b.

GUNDERSEN, H. J. G.; JENSEN, E. B. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. **Journal of Microscopic**, v. 147, p. 229-263, 1987.

HAMILTON, P. W.; ALLEN, D. C. **Quantitative clinical pathology**. Oxford: Blackwell, 1995. 342 p.

HANSEN, S.; GRABAU, D. A.; ROSE, C.; BAK, M.; SORENSEN, F. B. Angiogenesis in breast cancer: a comparative study of the observer variability of methods for determining microvessel density. **Laboratory Investigation**, v. 78, p. 1563-1573, 1998.

HOF, P.; BUSSIERE, T.; GOLD, G.; KOVARI, E.; GIANNAKOPOULOS, P.; BOURAS, C.; PERL, D. P.; MORRISON, J. H. Stereologic evidence for persistence of viable neurons in layer II of the entorhinal cortex and the CA1 field in Alzheimer disease. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 62, p. 55-67, 2003.

HOWARD, C. V.; REED, M. G. **Unbiased stereology: three-dimensional measurement in microscopy**. Berlin: Springer. 2004.

JENSEN, E. B. V. **Local stereology**. New Jersey: World Scientific, 1998. 247p.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 488p.

KUBINOVA, L.; ANDJANACEK, J. Confocal microscopy and stereology: estimating volume, number, surface area and length by virtual test probes applied to three-dimensional images. **Research and Technique**, v. 53, p. 425-435, 2001.

KUBINOVA, L.; JANACEK, J.; RIBARIC, S.; CEBASEK, V.; ERZEN, I. Three-dimensional study of the capillary supply of skeletal muscle fibres using confocal microscopy. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 22, p. 217-227, 2001.

LADEKARL, M. Objective malignancy grading: a review emphasizing unbiased stereology applied to breast tumors. **APMIS Supplementum**, v. 79, p. 1-34, 1998.

LEE, M.; LILL, M.; MAKKAR, R. R. Stem cell transplantation in myocardial infarction. **Reviews in Cardiovascular Medicine**, v. 5, p. 82-98, 2004.

LEOR, J.; PATTERSON, M.; QUINONES, M.; KEDES, L. H.; KLONER, R. A. Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat. A potential method for repair of infarcted myocardium? **Circulation**, v. 94, p. II332-II336, 1996.

LI, R. K.; MICKLE, D. A. G.; WEISEL, R. D.; MOHABEER, M. K.; ZHANG, J.; RAO, V.; LI, G.; MERANTE, F.; JIA, Z.-Q.; KLONER, R. A.; SCHWARZ, E. R.; PREJEAN, C.; KAY, G. The natural history of fetal rat cardiomyocytes transplanted into adult rat myocardial scar tissue. **Circulation**, v. 96, p. II179-II187, 1997.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Cardiac growth in staged human embryos-stages from 15 to 23, postsomitic period. **Anatomischer Anzeiger**, v. 173, p. 60-64, 1991.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. **Manual de quantificação morfológica: morfologia, estereologia**. 2. ed. [s.l.: s.n.], 1994. 102 p. Apostila.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. What is the interest of normal and pathological morphological research to be quantitative? The example of the stereology. **Brazilian Journal Morphological Science**, v. 16, p. 131-139, 1999.

MAYHEW, T. M. A review of recent advances in stereology for quantifying neural structure. **Journal of Neurocytology**, v. 21, p. 313-328, 1992.

MAYHEW, T. M. The new stereological methods for interpreting functional morphology from slices of cells and organs. **Experimental Physiology**, n. 76, p. 639-665, 1991.

MAYHEW, T. M.; GUNDERSEN, H. J. G. If you assume, you can make an ass out of u and me: a decade of the disector counting of particles in 3D space. **Journal of Anatomy**, v. 188, p. 1-15, 1996.

MEHRAN, R. J.; RICCI, M. A.; GRAHAM, A. M.; CARTER, K.; SMYES, J. F. Porcine model for vascular graft studies. **Journal of Investigative Surgery**, v. 4, n. 1, p. 37-44, 1991.

NICKEL, R.; SCHUMMER, A.; SEIFERRE, E. **The anatomy of the domestic animals**. Berlin-Hamburg: Verlag Paul Parey, 1981. v. 3.

NYENGAARD, J. R.; BENDTSEN, T. F.; GUNDERSEN, J. G. Stereological estimation of the number of capillaries, exemplified by renal glomeruli. **Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, . 4, p. 92-99, 1988. Supplement, 4.

OLIVARES, E. L.; RIBEIRO, V. P.; CASTRO, J. P. S. W.; RIBEIRO, K. C.; MATTOS, E. C.; GOLDENBERG, R. C. S.; MILL, J. G.; DOHMANN, H. F.; DOS SANTOS, R. R.; DE CARVALHO, A. C.; MASUDA, M. O. Bone marrow stromal cells improve cardiac performance in healed infarcted rat hearts. **American Journal of Physiology Heart Circulatory Physiology**, v. 787, p. 464-70, 2004.

PAKKENBERG, B.; GUNDERSEN, H. J. Total number of neurons and glial cells in human brain nuclei estimated by disector and fractionator. **Journal of microscopy**, v. 150, p. 1-20, 1988.

PAKKENBERG, G. B.; PELVIG, D.; MARNER, L.; BUNDGAARD, M. J.; GUNDERSEN, H. J.; NYENGAARD, J. R.; REGEUR, L. Aging and the human neocortex. **Experimental Gerontology**, v. 38, p. 95-99, 2003.

PEREIRA, L. M.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Myocardial changes after spironolactone in spontaneously hypertensive rats. A laser scanning confocal microscopy study. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 6, p. 49-57, 2002.

PITTENGER, M. F.; MARTIN, B. J. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. **Circulation Research**, v. 95, p. 9-20, 2004.

REINECKE, H.; ZHANG, M.; BARTOSEK, T.; MURRY, C. E. Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts. **Circulation**, v. 100, p. 193-202, 1999.

ROBERTS, N.; PUDDEPHAT, M. J.; MCNULTY, V. The benefit of stereology for quantitative radiology. **Brazilian Journal of Radiology**, v. 73, p. 679-697, 2000.

SCORSIN, M.; MAROTTE, F.; SABRI, A.; LE DREF, O.; DEMIRAG, M.; SAMUEL, J. L.; RAPPAPORT, L.; MENASCHÉ, P. Can grafted cardiomyocytes colonize peri-infarct myocardial areas? **Circulation**, v. 94, p. II337-II340, 1996.

SMITH, A. C.; KNICK, B.; SWINDLE, M. M.; GILLETTE, P. C. A technique for conducting non-invasive cardiac electrophysiology studies in swine. **Journal of Investigative Surgery** v. 10, n. 1-2, p. 25-30, 1997.

SMITH, A. C.; SPINALE, F. G.; SWINDLE, M. M. Cardiac function and morphology of Hanford miniature swine and Yucatan miniature and micro swine. **Laboratory Animal Science**, v. 40, n. 1, p. 47-50, 1990.

STANTON, H. C.; MERSMANN, H. J. **Swine in cardiovascular research**. Boca Raton, FL: CRC Pres, 1986. v. 1-2.

STERIO, D. C. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using disector. **Journal of Microscopy**, v. 134, p. 127-136, 1984.

SWINDLE, M. M. **Basic surgical exercises using swine**. New York, NY: Praeger Press, 1983. 237 p.

SWINDLE, M. M. **Surgery, anesthesia and experimental techniques in swine**. Ames, IA: Iowa State University Press, 1998. 329 p.

SWINDLE, M. M. **Swine as models in biomedical research**, Ames, IA: Iowa State University Press, 1992

SWINDLE, M. M.; ADAMS, R. J. **Experimental surgery and physiology**: induced animal models of human disease. Baltimore, MD: Williams and Wilkins, 1988. 350 p.

TAYLOR, D. A. Cell-based myocardial repair: How should we proceed? **International journal of cardiology**, v. 95, p. S-8-12, 2004. Supplement, 1.

TUMBLESON, M. E. **Swine in biomedical research**. New York: Plenum Press, 1988. v. 1-3, 1988 p.

TUMBLESON, M. E.; SCHOOK, L. B. **Advances in swine in biomedical research**. New York: Plenum Press, 1996. v. 1-2.

WEIBEL, E. R. Measuring through the microscope: development and evolution of stereological methods. **Journal of Microscopy**, v. 155, Pt 3, p. 393-403, 1989.

WEIBEL, E. R. **Stereological methods. Practical methods for biological morphometry**. London: Academic Press, 1979. 415 p.

WEIBEL, E. R.; GOMEZ, D. M. A principle for counting tissue structures on random sections. **Journal of Applied Physiology**, v. 17, p. 343-348, 1962.

WEIBEL, E. R.; KISTLER, G. S.; SCHERLE, W. F. Practical stereological methods for morphometric cytology. **Journal of Cell Biology**, v. 30, p. 23-38, 1966.

WHITE, C. J.; RAMEE, S. R.; BANKS, A. K.; WIKTOR, D.; PRICE, H. L. The Yucatan miniature swine: An atherogenic model to assess the early potency rates of an endovascular stent. In: SWINDLE, M. M. (Ed.). **Swine as models in biomedical research**. Ames, IA: Iowa State University Press, 1992. p. 156-162.

YOO, K. J.; LI, R. K.; WEISEL, R. D.; MICKLE, D. A.; LI, G.; YAU, T. M. Autologous smooth muscle cell transplantation improved heart function in dilated cardiomyopathy. **Annals of Thoracic Surgery**, v. 70, p. 859-865, 2000.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)