

## Morfometria do tecido conjuntivo do coração de equinos PSI

### Morphometry of connective tissue in equine heart

Eduardo Pecorali LEITE<sup>1</sup>;  
Pedro Primo BOMBONATO<sup>1</sup>;  
Frederico Ozanam;  
CARNEIRO E SILVA<sup>2</sup>;  
Hildebrando Gomes;  
BENEDICTO<sup>1</sup>;  
Marcelo Ismar Silva  
SANTANA<sup>1</sup>

1– Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, São Paulo - SP  
2– Departamento de Anatomia da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia - MG

#### Correspondência para:

PEDRO PRIMO BOMBONATO  
Departamento de Cirurgia  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP  
Av. Prof. Orlando Marques de Paiva, 87  
Cidade Universitária Armando Salles de Oliveira  
05508-270 – São Paulo - SP  
bombonat@usp.br

Recebido para publicação: 20/05/2003  
Aprovado para publicação: 18/05/2004

#### Resumo

Objetivou-se, neste trabalho, estudar a proporção de tecido conjuntivo existente na fração ventricular direita e esquerda do músculo cardíaco de equínos da raça puro sangue inglês, buscando, através da morfometria, dados referentes à inter-relação entre o tecido conjuntivo e o tecido muscular cardíaco. Utilizaram-se corações equínos, machos, com idade entre 20 e 120 meses, sem alterações cardíacas. Preparou-se o material oriundo da região média do terço médio dos ventrículos, tanto da face direita quanto da esquerda, segundo as técnicas histológicas convencionais e corados com Picrosirius red, Fucsina-Paraldeído associada ao Tricromo de Gomori e Tricromo de Masson, para evidenciação das fibras conjuntivas. As lâminas foram analisadas com auxílio do Axioscópico Zeiss® acoplado ao programa de análise de imagens KS-400 Zeiss. A quantidade de tecido conjuntivo no Ventrículo Esquerdo variou de 0,008 a 24,695%; no Ventrículo Direito variou de 0,029 a 20,921%; nos corações de equínos da raça puro sangue inglês. Os resultados obtidos mostram que há uma complexa rede de fibras conjuntivas envolvendo as fibras do tecido muscular cardíaco e que sua quantidade e disposição é muito variada, dependendo da região estudada, animais mais jovens exibem baixa quantidade de tecido conjuntivo, também dependendo de sua atividade física.

#### Palavras-chave:

Equínos.  
Coração.  
Tecido conjuntivo.  
Colágeno.

#### Introdução

O sistema circulatório é base para a manutenção da vitalidade tecidual de todo o organismo ao promover sua irrigação e drenagem.

Como órgão central deste sistema está o coração, o qual tem sido objeto de estudo há muito tempo, descobriu-se, entre outras coisas, que suas paredes apresentam-se constituídas por três túnicas: a interna, o endocárdio; a média, o miocárdio; e a externa, o pericárdio; e ainda, possui uma

porção central fibrosa que serve de ponto de apoio às válvulas e fibras musculares cardíacas chamadas esqueleto fibroso do coração.

Sabe-se, também, que este órgão possui como principal elemento funcional o músculo cardíaco ou miocárdio, cuja composição consiste em fibras musculares cardíacas dispostas em duas camadas de um modo complexo e espiraladas, caracterizando uma camada profunda, que dá sustentação para as válvulas, e uma superficial, que envolve essa camada profunda. Grande

parte dessas fibras se insere no esqueleto cardíaco. A disposição das fibras musculares é variável, a ponto de freqüentemente aparecerem, em corte histológico de coração, fibras orientadas em várias direções. Estas fibras diferem das fibras musculares esqueléticas por não serem multinucleadas, possuindo somente um ou dois núcleos centrais.

Frank e Langer<sup>1</sup> estudando o interstício do miocárdio de coelhos, através de microscopia eletrônica, descobriram que o espaço extracelular miocárdico possuía abundante substância amorfa 23%, o restante do espaço continha 59% de vasos sangüíneos, 6% de espaço vazio, 4% de fibras colágenas e 7% de células do tecido conjuntivo.

Em 1965, Puff and Langer<sup>2</sup> (apud ROBINSON; COHEN-GOULD; FACTOR<sup>3</sup>) demonstraram que as fibras elásticas se curvam, em forma de hélice, em torno dos miócitos em miocárdio humano, ou se configuram em forma reticular, em torno dos miócitos.

Icardo e Colvee<sup>4</sup> estudaram a organização estrutural do colágeno dentro do músculo papilar mitral (PM) de corações humanos normais e modificações nessa estrutura em corações hipertensos. Observaram que o PM possui uma aparência de favo de mel, devido à presença de bainhas de colágeno, as quais são ovais ou arredondadas, abrigam miócitos individuais e estabelecem comunicações laterais entre bainhas adjacentes. Os espaços entre essas bainhas são preenchidos por uma complexa malha de fibras colágenas de diferentes tamanhos e graus de compactação. A análise de corações hipertensos mostrou que há modificações na estrutura do coração, sendo observadas grandes quantidades de tecido fibroso e onde o tecido do miocárdio estava preservado, notou-se um aumento na quantidade de colágeno. O miocárdio perde, então, sua aparência de favo de mel.

Borg e Caulfield<sup>5</sup>, Robinson, Cohen-Gould e Factor<sup>3</sup> e Weber<sup>6</sup> definiram a rede colágena do coração como sendo um inter-

conector, uma unidade anatômica que envolve miócitos e capilares.

Qualquer modificação na arquitetura do coração pode ocasionar uma falha e comprometer outros sistemas e, por conseguinte, todo o organismo.

Este trabalho tem por objetivo estudar quantitativamente o tecido conjuntivo de 30 corações de eqüinos, machos, da raça puro sangue inglês (PSI), que não possuam antecedentes de alterações cardíacas, analisando a sua proporção em relação ao tecido muscular, fazendo uso da morfometria, aplicada em análise de histomagens, levando em conta variáveis como o peso, idade e biometria cardíaca, determinando assim, o padrão de normalidade para o órgão.

## **Materiais e Métodos**

Para desenvolvermos este trabalho utilizamos 30 corações de cavalos da raça puro sangue inglês (PSI), machos, sem histórico de alteração cardíaca, oriundos de vários criatórios. Desses animais foram coletados dados referentes à idade, peso e dados métricos do coração, a saber: a altura ventricular, esta tomada do sulco coronariano, na face esquerda, ao ápice do coração e a largura ventricular, esta tomada da margem cranial até a caudal na altura do sulco coronário.

Os corações foram coletados ainda à fresco, sendo seccionados, retirando-se fragmentos dos terços proximal, médio e distal das faces esquerda e direita dos ventrículos direito e esquerdo e, ainda, estes subdivididos em blocos, correspondentes às camadas profunda e superficial, para preparação histológica.

O material fora tratado segundo a técnica histológica convencional, ou seja, fixado, desidratado, diafanizado e incluído em blocos de parafina, de forma que cada bloco continha um segmento dos fragmentos das camadas profunda e superficial de cada ventrículo e de cada face. Foram escolhidas 7 (sete) lâminas de cada animal, contendo cortes de 5µm. Utilizamos para corar as lâminas a técnica

Picosirius e Tricromo de Masson para colágeno, e técnica Fucsina-Paraldeido associado ao Tricromo de Gomori para fibras elásticas.

Examinamos os dados com o auxílio do microscópio óptico Axioscópico Zeiss® sendo as imagens analisadas em um microcomputador com programa de morfometria específico KS-400 Zeiss®, segundo a seqüência abaixo:

- . Captação da imagem
- . Calibração do equipamento
- . Engenharia da imagem
- . Identificação da freqüência da cor do tecido estudado por campo
- . Binarização da imagem
- . Mensuração dos campos
- . Listagem dos dados

Os dados assim coletados e tabulados foram tratados estatisticamente, mediante aplicação de testes que sinalizam a condição de diferenças entre valores métricos médios de cada região, bem como testados e confrontados os valores referentes a cada um dos parâmetros, como a idade, valendo-se do teste de diferença entre médias, de correlação de Pearson, todos com nível de significância de 5%.

## Resultados

### Aspectos macroscópicos

Os corações de eqüinos da raça puro

sangue inglês (PSI), machos, apresentaram alturas ventriculares médias de  $23,3 \pm 1,36$  cm sendo a mediana de 23,35 cm. A largura ventricular apresentou média de  $24,86 \pm 1,31$  cm e mediana de 24,45 cm. A espessura ventricular esquerda obteve média de  $12,07 \pm 0,61$  cm e mediana de 12,2 cm. A espessura da parede ventricular teve média de  $4,24 \pm 2,01$  cm e mediana de 3,7 cm.

### Aspectos microscópicos

Dispostos de forma a interpermearem-se ao tecido muscular cardíaco, o tecido conjuntivo distribui-se diferentemente, quanto a sua orientação e até mesmo quanto a sua concentração, obedecendo à priori e preferencialmente a uma disposição paralela aos arranjos das fibras musculares, concentrando-se em maior quantidade junto aos vasos e nervos de maior volume, formando para estes como que pacotes que sugerem arranjo funcional específico (Tabela 1, Figuras 1 e 2).

## Discussão

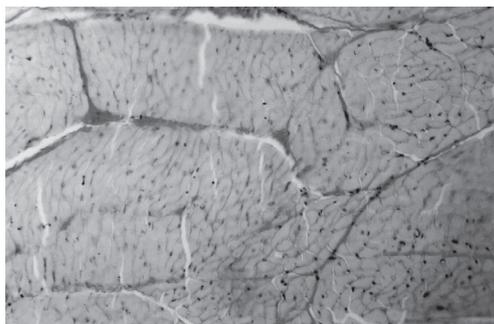
Estudos morfométricos têm sido realizados em diferentes setores do conhecimento biológico, por exemplo: o estudo morfométrico do osso navicular em eqüinos, realizado por Gabriel et al.<sup>7</sup>; a diferenciação morfométrica das dimensões de cabeças de espermatozoides de garanhões férteis e inférteis, realizada por Casey et al.<sup>8</sup>; e a

**Tabela 1**

Quantidade (%) mínima, máxima e média de tecido conjuntivo, encontrados para cada uma das porções estudadas (PE) dos ventrículos, do coração de eqüinos da raça puro sangue inglês - São Paulo - 2002

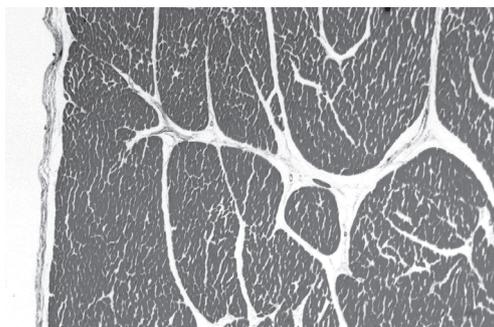
PE	MA MIN	MA MAX	MÉDIA MA	PR MIN	PR MÁX	MÉDIA PR	FPG MIN	FPG MAX	MÉDIA FPG
VEFES	0,17	10,55	$2,41 \pm 2,59$	0,51	13,88	$4,43 \pm 3,44$	0,06	24,69	$3,69 \pm 4,85$
VEFEP	0,01	7,49	$1,68 \pm 1,84$	0,08	6,95	$2,89 \pm 2,03$	0,008	11,72	$2,34 \pm 2,47$
VEFDS	0,19	21,53	$3,62 \pm 5,02$	0,84	16,74	$4,84 \pm 4,22$	0,09	11,52	$3,53 \pm 3,21$
VEFDP	0,31	5,80	$2,53 \pm 1,71$	0,80	15,59	$4,51 \pm 3,89$	0,02	12,52	$3,34 \pm 3,48$
VDFES	0,26	18,76	$3,51 \pm 4,03$	1,06	20,54	$5,37 \pm 0,88$	0,02	20,92	$4,29 \pm 4,66$
VDFEP	0,13	10,35	$3,22 \pm 2,58$	0,72	10,40	$3,86 \pm 2,55$	0,19	11,79	$3,03 \pm 3,11$
VDFDS	0,02	14,49	$3,45 \pm 3,54$	0,78	10,11	$4,20 \pm 2,47$	0,04	16,03	$3,53 \pm 3,66$
VDFDP	0,10	9,77	$1,41 \pm 1,84$	0,37	8,01	$2,76 \pm 1,78$	0,04	10,99	$2,83 \pm 2,90$

VD = ventrículo direito; VE = ventrículo esquerdo; FD = face direita; FE = face esquerda; S = camada superficial; P = camada profunda; FPG = coloração Fucsina-Paraldeido + Tricromo Gomori; PR = Picosirius red; MA = Tricromo Masson



**Figura 1**

Fotomicrografia da parede ventricular esquerda de equinos PSI evidenciando septos de tecido conjuntivo – (Técnica: Picrosirius red ; Aumento 400X)



**Figura 2**

Fotomicrografia da parede ventricular esquerda de equinos PSI evidenciando septos de tecido conjuntivo – (Técnica: Tricromo de Masson; Aumento: 240X)

morfologia e morfometria das fibras nervosas mielínicas do nervo para o músculo pectíneo do gato, realizada por Rodrigues et al.<sup>9</sup>

Neste contexto vem a morfometria, que tem apresentado significativos avanços por conta do fato de que vários dos aspectos que auxiliam essa técnica valem-se de análises quantitativas. Essa parte do conhecimento que pode oferecer substratos para o conhecimento do órgão, principalmente, aqueles relativos aos elementos quantitativos e qualitativos do tecido cardíaco, por nós abordados.

Trabalhos, antes realizados, fazem um estudo descritivo do coração, como é o caso de Junqueira e Carneiro<sup>10</sup> e Frank e Langer<sup>1</sup>

os quais definem toda a estrutura do tecido cardíaco, mas não realizam o estudo quantitativo por nós desenvolvido.

Sanches-Quintana et al.<sup>11</sup> concluíram que a matriz do tecido conjuntivo intramiocárdico é formada, em sua maioria, por fibras colágenas e observaram, em corações anormais, aumento das fibras colágenas e remodelação na matriz do tecido conjuntivo. Em nossos estudos, de acordo com o estudo acima citado, pudemos observar que o tecido conjuntivo intermiocárdico continha uma prevalência de fibras colágenas e que as fibras elásticas se encontravam nas regiões de epicárdio, endocárdio, camadas íntima e média dos grandes vasos; e, que, devido a sua quantidade e localização, não puderam ser quantificadas, pois essas áreas foram previamente descartadas para efeito de quantificação.

Robinson, Cohen-Gould e Factor<sup>3</sup> e Icardo e Colvee<sup>4</sup> fizeram um estudo de todo o arcabouço de tecido conjuntivo para sustentação das fibras musculares cardíacas, encontrando uma certa variação, em tamanho e forma, entre as regiões, relacionando isso com um considerável requerimento dinâmico do coração, como por exemplo, sua resistência as dramáticas mudanças de sua forma durante o ciclo. Também concordamos com essa afirmação por encontrarmos uma certa variação na quantidade de tecido conjuntivo entre as demais regiões por nós estudadas. Percebemos ainda que todo o arcabouço do tecido conjuntivo que envolve cada fibra muscular cardíaca, descrito pelo autor, se torna reduzido nos corações de equinos no que diz respeito a fibras musculares individuais, mas englobando feixes de fibras, em concordância com o que descreveu Spach e Dolber<sup>12</sup> e fazendo conexão com vasos sanguíneos, em corações de equinos PSI, ou seja, cavalos atletas, os quais possuem fibras cardíacas aumentadas de tamanho para sustentar todo o serviço exigido do coração.

Concordamos com a afirmação de que a rede colágena do coração é um inter-

conector, uma unidade anatômica que envolve miócitos e capilares.<sup>2,3,5,6</sup> Uma vez que encontramos uma concentração maior de tecido conectivo ao redor de vasos e com uma relação íntima entre este e o tecido que envolve feixes de fibras musculares. Este envoltório, formado por fibras colágenas, se apresenta como que uma fronteira isolante, de acordo com o que disse Spach e Dolber.<sup>12</sup>

Rossi<sup>13</sup> encontrou alterações na matriz do perímio do tecido conjuntivo de corações com miocardite crônica chagásica, concluindo que alterações nessa rede causariam diminuição da complacência do miocárdio e ruptura da contração sincrônica dos ventrículos durante a sístole; toda essa alteração, mesmo que o autor não afirme, é decorrente da variação na quantidade de tecido conjuntivo, como os encontrados em nosso material. Baduí-Dergal<sup>14</sup>, Weber<sup>6</sup> e Weber e Brilla<sup>15</sup> também reportaram em seus trabalhos, que várias condições patológicas afetam a função do coração e que, especificamente, enfermidades do tecido conjuntivo podem provocar inflamação e fibrose em qualquer uma das estruturas cardíacas; Moore et al.<sup>16</sup> descreve que em quadros de hipertrofia de células musculares ocorre, também, o aumento de tecido conjuntivo; Fein<sup>17</sup> notou que cães diabéticos apresentavam aumento de colágeno no interstício cardíaco e diminuição da atividade ventricular.

Debessa, Maifrino e Souza<sup>18</sup> conclui que o aumento do colágeno, com a variação da idade, pode contribuir para a diminuição da elasticidade ventricular; e de acordo com Sobel e Marmorston<sup>19</sup> e Clausen<sup>20</sup> o conteúdo total de colágeno de certos tecidos possuem uma variação com a idade.

Abrahams, Janicki e Weber<sup>21</sup> concluíram que nas hipertrofias há uma alteração no esqueleto de colágeno tendo um importante papel na diminuição da função ventricular, o que nós aceitamos como certo, por acreditarmos na inter-relação forma e função, então, qualquer alteração em quaisquer dos componentes

do tecido, pode comprometer toda a atividade do órgão. Como também acredita Meducora<sup>22</sup>, o qual, em seus estudos, concluiu que o conteúdo de colágeno miocárdico pode ser substancialmente alterado em certas doenças miocárdicas, entretanto não observou alterações na distribuição desse componente.

Em relação as correlações entre as variáveis encontramos para maioria delas valores negativos o que mostra certa discrepância em relação a literatura por nós apresentada e utilizada para justificação de nosso trabalho. Cabe salientar o fato de que os animais por nós utilizados possuíam idade juvenil, entre 20 e 120 meses, eram “atletas” e estavam em plena atividade física, portanto quase todo o tecido muscular cardíaco era composto essencialmente de fibras musculares sobressaindo-se sobre as pouquíssimas fibras conjuntivas existentes; a grande quantidade de fibras conjuntivas restringiam-se ao nível de epicárdio, endocárdio e regiões perivasculares, o que por nós fora descartado previamente para fins de quantificação, isto tudo justifica o fato de haver esta discrepância em relação ao encontrado e citado na literatura. Ainda assim, de forma genérica, acreditamos que animais mais velhos apresentam maior quantidade de tecido conjuntivo entre as fibras de tecido muscular cardíaco, mesmo que não observado em nossos resultados e que animais jovens apresentam menor quantidade de tecido conjuntivo, isto pode variar dependendo da atividade física que exercem e da exigência que esse órgão sofre durante seu trabalho.

## Conclusões

Em face aos resultados apresentados e os argumentos discutidos observamos que:

- há uma complexa rede de fibras de tecido conjuntivo envolvendo o tecido miocárdico, a quantidade dessas fibras varia conforme a região, não se estabelecendo a

predominância evidente entre as porções ou as camadas;

- a quantidade de tecido conjuntivo presente no miocárdio do ventrículo esquerdo de equinos da raça puro sangue inglês variou de 0,008% a 24,6955%;
- a quantidade de tecido conjuntivo presente no miocárdio do ventrículo direito de equinos da raça puro sangue inglês variou de 0,029% a 20,921%.

Em relação às correlações, de forma genérica, animais mais velhos apresentam maior quantidade de tecido conjuntivo entre as fibras de tecido muscular cardíaco, mesmo que não observado em nossos resultados e que animais jovens apresentam menor quantidade de tecido conjuntivo, isto pode variar dependendo da atividade física que exercem e da exigência que esse órgão sofre durante seu trabalho.

### Abstract

This work aimed to study the proportion of connective tissue in the fraction right and left of the ventricular heart muscle of equine PSI, searching, through of the morphometry, data in the interrelation between the connective tissue and the muscular tissue, for the knowledge of the functional relationships of the heart structure. It was used equine hearts, males, between 20 and 120 old months, without heart alterations. The material originated from of the medial portion of the ventricle from both the right face and the left, according to the conventional techniques and stained with Picrosirius red, Fucsina-Paraldeido associated to Gomori's Tricrome and Masson's Tricrome, to show of the connective fibers. The sheets were analysed using Axioscópico Zeiss® coupled to the program of analysis of images KS-400 Zeiss®. The amount of connective tissue in the left ventricle varied from 0,008 to 24,695%; in the right ventricle it varied from 0,029 to 20,921%; in the hearts of equine PSI. The obtained results show that there is a complex net of connective fibers involving the fibers of muscle tissue of the heart and that their amount and disposition is very varied, depending on the studied area, younger animals exhibit low amount of connective tissue, also depending on their physical activity.

### Key-words:

Equine.  
Heart.  
Connective tissue.  
Collagen.

### Referências

1. FRANK, J. S.; LANGER, G. A. The myocardial interstitium: its structure and its role in ionic exchange. **The Journal of Cell Biology**, v. 60, n. 3, p. 586-601, 1974.
2. PUFF, A.; LANGER, H. Das problem der diastolischen entfaltung der herzkammer (Eine untersuchung uber das elastische gewebe im myocard). **Gegenbaurs Morphol Jahrb**, v. 107, p. 184, 1965.
3. ROBINSON, T. F.; COHEN-GOULD, L.; FACTOR, S. M. Skeletal Framework of Mamalian Heart Muscle. **Laboratory Investigation**, v. 49, n. 4, p. 482-498, 1983.
4. ICARDO, J. M. ; COLVEE, E. Collagenous Skeleton of the Human Mitral Papillary Muscle. **The Anatomical Record**, v. 252, n. 4, p. 509-518, 1998.
5. BORG, T. K.; CAULFIELD, J. B. The collagen matrix of the heart. **Federation Proceedings**, v. 40, p. 2037-2041, 1981.
6. WEBER, K. T. Cardiac interstitium in health and disease: The fibrillar collagen network. **Journal American College of Cardiology**, v. 13, n. 7, p. 1637-1652, 1989.
7. GABRIEL, A. et al. Morphometric study of the equine navicular bone: variations with breeds and types of horse and influence of exercise. **Journal of Anatomy**, v. 193, n. 4, p. 535-549, 1998.
8. CASEY, P. J. et al. Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions. **Theriogenology**, v. 47, n. 2, p. 575-582, 1997.
9. RODRIGUES, A. C. et al. Morfologia e morfometria das fibras nervosas mielínicas do nervo para o musculo pectíneo do gato. **Revista de Ciências Biológicas**, v. 15, p. 23-30, 1995.
10. JUNQUEIRA, L. C. e CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1995.
11. SÁNCHEZ-QUINTANA, D. et al. Myoarchitecture and Connective tissue in Hearts with Tricuspid

- Atresia. **Heart**, v. 81, n. 2, p. 182-191, 1999.
- 12.SPACH, M. S.; DOLBER, P. C. Relating extracellular potentials and their derivatives to anisotropic propagation at a microscopic level in human cardiac muscle. Evidence for electrical uncoupling of side-to-side fiber connections with increasing age. **Circulation Research**, v. 58, n. 3, p. 356-371, 1986.
  - 13.ROSSI, M. A. Fibrosis and inflammatory cells in human chronic chagasic myocarditis: scanning electron microscopy and immunohistochemical observations. **Internation Journal of Cardiology**, v. 66, n. 2, p. 183-194, 1998.
  - 14.BADUÍ-DE GAL, E. El Corazón en algunas Enfermedades del Tejido Conectivo. **Gaceta Medica de Mexico**, v. 126, n. 3, p. 175-189, 1990.
  - 15.WEBER, K. T.; BRILLA, C. G. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. **Cardiology**, v. 83, n. 6, p. 1849-1865, 1991.
  - 16.MOORE, G. W. et al. Constituents of the human ventricular myocardium: Connective Tissue Hyperplasia Accompanying Muscular Hypertrophy. **American Heart Journal**, v. 100, n. 5, p. 610-617, 1980.
  - 17.FEIN, F. S. Diabetic Cardiomyopathy. **Diabetes Care**, v. 13, n. 11, p. 1169-1179, 1990.
  - 18.DEBESSA, C. R. G.; MAIFRINO, L. B. M.; SOUZA, R. R. Age related changes of the collagen network of the human heart. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 122, n. 10, p. 1049-1058, 2001.
  - 19.SOBEL, H.; MARMORSTON, J. The possibility role of gel-fibre ratio of connective tissue in the aging process. **Journal of Gerontology**, v. 11, p. 1-7, 1956.
  - 20.CLAUSEN, B. Influence of age on chondroitin sulfates and collagen of human aorta, myocardium and skin. **Laboratory Investigation**, v.12, p. 538-542, 1963.
  - 21.ABRAHANS, C.; JANICKI, J. S.; WEBER, K. T. Myocardial hypertrophy in *Macaca fascicularis*: structural remodeling of the collagen matrix. **Laboratory Investigation**, v. 56, n. 6, p. 676-683, 1987.
  - 22.MEDUCORAC, I.; JACOB, R. Characterization of left ventricular collagen in the rat. **Cardiovascular Research**, v. 17, n. 1, p.15-21, 1983.