

## Quantificação de Vasos Linfáticos na Cardiomiopatia Dilatada e Chagásica Crônica

*Quantification of Lymphatic Vessels in Dilated and Chronic Chagasic Cardiomyopathy*

Luiz Alberto Benvenuti, Ana Maria Gonçalves da Silva, Vera Demarchi Aiello

Instituto do Coração do Hospital das Clínicas (InCor) - FMUSP, Instituto de Medicina Tropical (LIM 06) - FMUSP, São Paulo, SP - Brasil

### Introdução

O recente desenvolvimento de anticorpos específicos para o endotélio linfático tem permitido sua detecção por técnica imuno-histoquímica<sup>1</sup>. Apesar desse avanço metodológico, o estudo morfológico dos vasos linfáticos do miocárdio tem sido negligenciado e muito pouco se sabe sobre isso nas diferentes cardiopatias.

A insuficiência cardíaca congestiva acarreta edema intersticial em diferentes órgãos e tecidos, incluindo o miocárdio, devendo esse excesso de fluido ser drenado pelo sistema linfático. O edema do miocárdio está implicado no desenvolvimento de fibrose intersticial e prejudica o desempenho cardíaco<sup>2</sup>.

O objetivo deste estudo é comparar os vasos linfáticos do miocárdio de pacientes com insuficiência cardíaca congestiva secundária a cardiomiopatia dilatada idiopática ou a cardiomiopatia chagásica crônica com os vasos linfáticos do miocárdio normal.

### Métodos

Foram previamente avaliadas algumas características morfológicas de biópsias endomiocárdicas de pacientes portadores de insuficiência cardíaca congestiva classe funcional III ou IV, secundária a cardiomiopatia dilatada idiopática (CDI) ou cardiomiopatia chagásica crônica (CCC), essa última caracterizada por testes sorológicos positivos para a doença de Chagas e pela presença de miocardite linfo-histiocitária crônica<sup>3,4</sup>. Neste estudo foram reavaliadas as biópsias de 31 pacientes com CDI (média de idade: 40,65 ± 12,14 anos; 22 do sexo masculino) e 24 pacientes com CCC (média de idade: 43,71 ± 9,29 anos; 21 do sexo masculino), em que foi possível obter novos cortes histológicos que apresentassem ao menos 1,25 mm<sup>2</sup> de área analisável (cinco campos microscópicos de 400 ×). Como grupo-controle, coletamos pequenas

amostras do endomiocárdio do ventrículo direito normal de 11 indivíduos falecidos por causas não cardiovasculares e submetidos a necropsia (média de idade: 50,82 ± 15,39; 3 do sexo masculino). Essas amostras foram rotineiramente processadas e incluídas em parafina. Cortes seriados a 4 μm foram corados pela hematoxilina-eosina, tricrômico de Masson ou submetidos à técnica imuno-histoquímica para detecção de vasos linfáticos.

### Imuno-histoquímica

Cortes histológicos foram incubados com anticorpo monoclonal D2-40 (Dako Corporation, CA) diluído 1:100, overnight, a 4°C. As reações foram desenvolvidas com o polímero marcado com peroxidase EnVision (Dako Corporation, CA) por 30 minutos à temperatura ambiente e visualizados com 3,3' diaminobenzidina. Cortes histológicos de pele normal foram usados como controles positivos e negativos, omitindo-se o anticorpo primário nos últimos.

### Histopatologia e morfometria

Foram avaliados o diâmetro médio dos miócitos, a área fracional de colágeno, a área fracional dos vasos linfáticos e o diâmetro do vaso linfático de maior calibre de cada amostra. Miocardite foi caracterizada pela presença de infiltrado inflamatório mononuclear associado a degeneração e/ou necrose dos miócitos, de acordo com o critério de Dallas<sup>5</sup>. O diâmetro dos miócitos e a área fracional de colágeno foram avaliados conforme previamente descrito<sup>3,4</sup>. A área total ocupada pelo corte histológico, a área total ocupada pelos vasos linfáticos e o diâmetro do vaso linfático de maior calibre foram medidos com ajuda de sistema computadorizado de análise de imagens. A área fracional dos linfáticos foi calculada pela razão entre a área total ocupada pelos vasos linfáticos e a área total ocupada pelo corte histológico, multiplicada por 100.

### Análise estatística

Os dados morfométricos dos três grupos foram comparados usando o teste de análise de variância de postos de Kruskal-Wallis. O valor de  $p \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

### Resultados

Os vasos linfáticos estavam presentes entre os miócitos, ao redor dos vasos sanguíneos ou, mais raramente, no

### Palavras-chave

Cardiomiopatia chagásica, cardiomiopatia dilatada, vasos linfáticos.

Correspondência: Luiz Alberto Benvenuti •

Rua Madalena, 477/31 - Vila Madalena - 05434-090 - São Paulo, SP - Brasil

E-mail: anpluiz@incor.usp.br

Artigo recebido em 15/05/09; revisado recebido em 25/07/09; aceito em 07/10/09.

## Comunicação Breve

endocárdio. Os vasos linfáticos apresentavam-se esparsos, em muito menor número que os vasos sanguíneos, e sua densidade variou grandemente de amostra para amostra e mesmo em diferentes áreas da mesma amostra. Ocasionalmente havia numerosos vasos linfáticos colapsados, ramificados e agrupados, particularmente ao redor de arteríolas (fig. 1). Pacientes dos grupos CDI e CCC apresentaram maior diâmetro dos miócitos ( $p < 0,001$ ) e maior área fracional de colágeno ( $p < 0,001$ ) que os indivíduos do grupo controle, sem diferenças entre os dois primeiros grupos. Não houve diferença estatística entre os grupos em relação à área fracional de vasos linfáticos ( $p = 0,075$ ), salientando-se que a mediana do grupo controle foi a mais elevada dos três grupos. O diâmetro do vaso linfático de maior calibre foi menor no grupo CDI comparado ao grupo controle, mas não ao grupo CCC ( $p = 0,035$ ), sem diferenças entre esses dois últimos grupos (fig. 2). Miocardite linfo-histiocitária esteve presente em 20/24 (83%) pacientes do grupo CCC e em nenhum paciente dos grupos CDI ou controle.

### Discussão

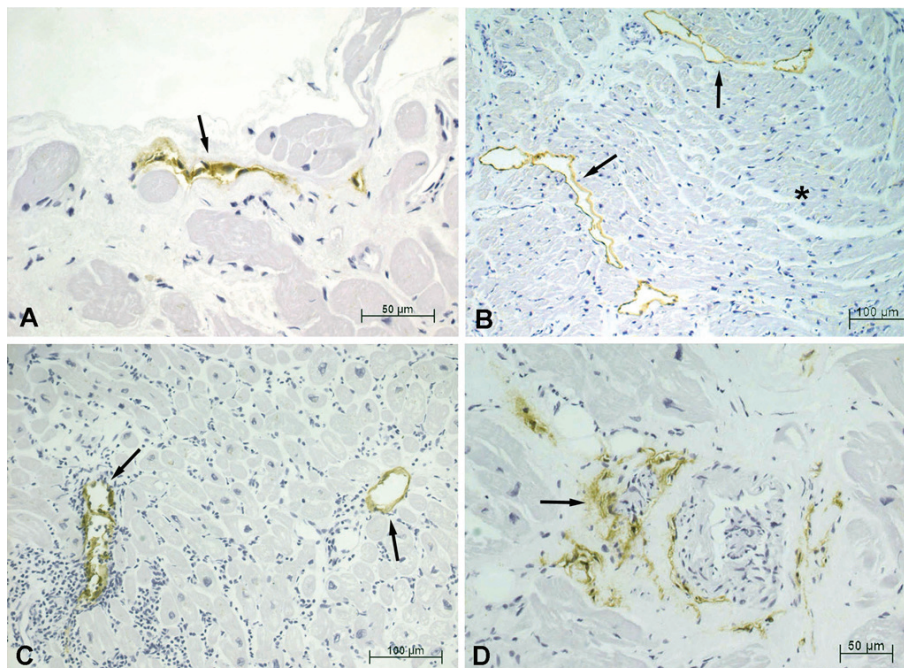
A investigação dos vasos linfáticos nas diversas cardiopatias humanas tem sido negligenciada. Isso se deve em grande parte à dificuldade em diferenciar esses vasos dos sanguíneos, o que até há pouco tempo só era possível a partir do exame pela microscopia eletrônica. Entretanto, o recente desenvolvimento de anticorpos monoclonais capazes de reconhecer especificamente o endotélio linfático<sup>1</sup> tem

mudado esse panorama, e alguns estudos morfológicos sobre as alterações dos vasos linfáticos na doença isquêmica do coração e no transplante cardíaco foram relatados<sup>6,7</sup>.

O coração dos mamíferos apresenta um plexo linfático subendocárdico, vasos linfáticos no miocárdio (em muito menor número que os capilares sanguíneos) e um plexo linfático subepicárdico, este último contendo vasos coletores de maior calibre que acompanham os ramos epicárdicos das artérias coronárias<sup>2,8</sup>.

Em nossas amostras os vasos linfáticos apareceram focalmente colapsados, ramificados e agrupados, impedindo sua contagem fidedigna. Assim, optamos por avaliar sua área fracional, que, ao contrário do número absoluto, sofre influência do estado de distensão vascular.

Até onde é do nosso conhecimento, há apenas um relato abordando os vasos linfáticos do miocárdio em cardiomiopatias: analisando por microscopia eletrônica amostras de coração de pacientes com CDI, os autores relataram dilatação dos linfáticos em áreas de edema intersticial e rarefação e irregularidade dos mesmos em áreas de fibrose intersticial<sup>9</sup>. O presente estudo é o primeiro a realizar exame imuno-histoquímico morfométrico dos vasos linfáticos do miocárdio em cardiomiopatias. Apesar de esperarmos aumento de sua área fracional, condicionadas pela insuficiência cardíaca congestiva dos pacientes e também pelo processo inflamatório crônico (miocardite linfo-histiocitária) no grupo CCC, as medidas morfométricas não confirmaram essa hipótese. Pelo contrário, apesar de estatisticamente não



**Fig. 1** - Vasos linfáticos do miocárdio (setas) detectados por técnica imuno-histoquímica, localizados no endocárdio (painel A, grupo CDI), interstício do miocárdio por entre os miócitos (painéis B e C, grupos controle e CCC, respectivamente) e ao redor de arteríola (painel D, grupo CDI). Note a presença de áreas destituídas de linfáticos (asterisco, painel B) e o aspecto colapsado, ramificado e agrupado dos vasos no painel D.

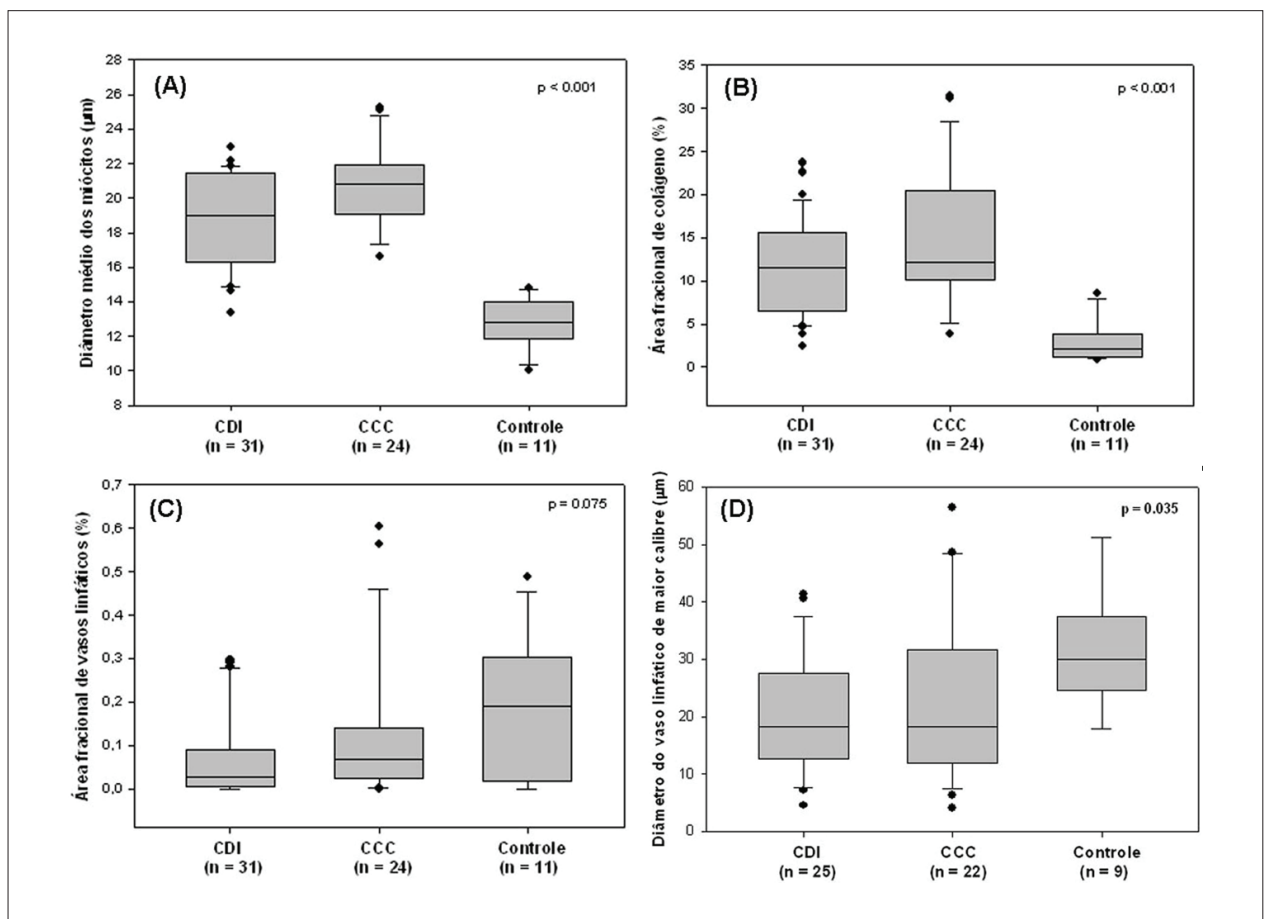


Fig. 2 - Diâmetro médio dos miócitos (A), área fracional de colágeno (B), área fracional de vasos linfáticos (C) e diâmetro do vaso linfático de maior calibre (D) dos grupos CDI, CCC e controle (box-plots).

significante, pacientes dos grupos CDI e CCC apresentaram menor área fracional de linfáticos que o grupo controle. Além disso, pacientes do grupo CDI apresentaram menor diâmetro do vaso linfático de maior calibre comparado aos indivíduos do grupo controle. É possível que tais resultados inesperados possam estar relacionados à maior área fracional de colágeno (fibrose) dos grupos CDI e CCC, o que acarretaria rarefação e atrofia dos vasos linfáticos, conforme previamente relatado<sup>9</sup>.

Os resultados deste estudo são preliminares, pois a relativa escassez e a grande variabilidade regional dos vasos linfáticos do miocárdio tornam difícil a interpretação conclusiva de dados obtidos pela avaliação de amostras pequenas, como a biópsia endomiocárdica. Nossos resultados devem ser confirmados por estudos posteriores, utilizando-se amostras amplas de corações de pacientes submetidos a transplante cardíaco ou necropsia.

## Referências

1. Ordóñez NG. Podoplanin: a novel diagnostic immunohistochemical marker. *Adv Anat Pathol*. 2006; 13: 83-8.
2. Mehlhorn U, Geissler HJ, Laine GA, Allen SJ. Myocardial fluid balance. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2001; 20: 1220-30.

## Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Thales de Brito, que gentilmente nos cedeu o anticorpo D2-40.

## Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

## Fontes de Financiamento

O presente estudo não teve fontes de financiamento externas.

## Vinculação Acadêmica

Não há vinculação deste estudo a programas de pós-graduação.

## Comunicação Breve

3. Benvenuti LA, Freitas HFG, Mansur AJ, Higuchi ML. Myocyte diameter and fractional area of collagen are not associated with survival time of outpatients with idiopathic dilated cardiomyopathy: a study based on right ventricular endomyocardial biopsies. *Int J Cardiol.* 2007; 116: 279-80.
4. Benvenuti LA, Roggério A, Freitas HFG, Mansur AJ, Fiorelli A, Higuchi ML. Chronic American trypanosomiasis: parasite persistence in endomyocardial biopsies is associated with high-grade myocarditis. *Ann Trop Med Parasitol.* 2008; 102: 481-7.
5. Aretz HT. Myocarditis: the Dallas criteria. *Human Pathol.* 1987; 18: 619-24.
6. Ishikawa Y, Akishima-Fukasawa Y, Ito K, Akasaka Y, Tanaka M, Shimokawa R, et al. Lymphangiogenesis in myocardial remodelling after infarction. *Histopathology.* 2007; 51: 345-53.
7. Geissler HJ, Dashkevich A, Fischer UM, Fries JW, Kuhn-Régner F, Addicks K, et al. First year changes of myocardial lymphatic endothelial markers in heart transplant recipients. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2006; 29: 767-71.
8. Shimada T, Morita T, Oya M, Kitamura H. Morphological studies of the cardiac lymphatic system. *Arch Histol Cytol.* 1990; 53 (Suppl): 115-26.
9. Marchetti C, Poggi P, Calligaro A, Arbustini E. Lymphatic system in human dilated cardiomyopathy. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 1988; 20: 701-8.