



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente

**CARACTERIZAÇÃO NÃO-INVASIVA DA MORFOLOGIA
E FISIOLOGIA CARDÍACA DE *Halobatrachus didactylus* –
APLICAÇÃO DA ECOCARDIOGRAFIA**

*Dissertação apresentada à
Universidade do Algarve para
obtenção do grau de Doutor em
Biologia, especialidade de
Fisiologia Animal*

Natércia Maria Teixeira Joaquim

Faro, 2001



*“A totalidade das causas que determina a totalidade dos efeitos,
ultrapassa o entendimento humano”*

Louis Pauwels e Jacques Bergier (1960) **“O Despertar dos Mágicos”**

3102 T.

1242.65	51573
701 * Car	

ERRATA

- Páginas 2, 6, 13, 17, 18 e 19 – em “Farrell, 1991”, leia-se “Farrell, 1991a”
- Página 11 – em “Satchell, 1991”, leia-se “Satchell, 1971”
- Página 17 – em “Conklin e Olson, 1994a”, leia-se “Conklin e Olson, 1994”
- Página 24 – em “Hatler e Angelson, 1982”, leia-se “Hatler e Angelson, 1985”
- Páginas 69 à 82 – no cabeçalho, leia-se “Capítulo III.3”
- Página 97 – em “Fioretti, 1980”, leia-se “Fiorreti *et al.*, 1980”

O autor desta tese de doutoramento recebeu financiamento da **Fundação para a Ciência e Tecnologia**, de Março de 1997 a Setembro de 1999.
[Bolsa de Doutoramento – BD 9657/96 PRAXIS XXI]

Mãe's Jaque

AGRADECIMENTOS

Chegou finalmente o dia. Esperei tão ansiosamente esta última tarefa, que teimosamente deixei para o fim! Aquele capitulosinho das teses em que somos finalmente livres para escrever o que quisermos, para quem quisermos. E que responsabilidade esta de agradecer a quem tornou este momento possível!

O trabalho aqui apresentado foi realizado no Grupo de Fisiopatologia Cardiovascular Comparada (GFCC), da Universidade do Algarve, e insere-se numa linha de investigação corajosamente iniciada em 1991, pela Professora Josefina Coucelo, tendo como objectivo o estudo comparado dos sistemas cardiovasculares em vertebrados, aplicando uma técnica nova, que era comum na prática clínica em cardiologia, mas que nunca tinha sido aplicada aos peixes. Na altura, estava eu no 2º ano da minha licenciatura, quando a Profª Josefina Coucelo me presenteou com o convite e a oportunidade de ouro de embarcar nesta aventura desde o início. A partir daí, o meu caminho científico, profissional e também pessoal, está ligado ao grupo iniciado na altura e a todas as pessoas que dele fizeram parte até ao momento.

Não sei como expressar a minha gratidão à Professora Josefina Coucelo, por tudo o que me proporcionou ao longo destes anos. Sinto-me impotente, incapaz, vazia de palavras. Como tal, queria apenas deixar aqui o meu mais sentido agradecimento pela forma sábia como orientou esta tese, por sempre me ter “empurrado para a frente”, tornando possível eu estar aqui hoje.

Todo o trabalho realizado na área da ecocardiografia teria sido completamente impossível sem a colaboração de pessoas da área da cardiologia clínica que contribuíram com o seu saber e experiência, e que proporcionaram a utilização dos equipamentos de ultra-sons. O Dr. José Coucelo foi o cardiologista que fez a diferença. Foi ele a pessoa que teve a “carolice” (é sua a expressão!) de dispensar os seus scrões, Sábados, Domingos, Feriados, para a realização dos inúmeros exames ecocardiográficos efectuados ao longo destes anos. Foi com ele que aprendi tudo (ou o pouco!) que sei da técnica ultrasonográfica. Queria deixar aqui um grande bem haja, por ter aberto o seu laboratório de ecocardiografia a “doentes sem pêlo”.

Grande parte do sucesso do trabalho científico depende da troca com os pares que partilham o nosso dia à dia de trabalho. Como tal, queria também lembrar aqui todos os elementos que passaram pelo GFCC, cujo convívio me enriqueceu todos os dias. Aos Mestres Jaime Anibal e Gilberto Carreira e aos Drs. Vera Correia, Rui Serrano, Andrea Sousa, Gisela Borges, Sandra Soares, Paula Mendonça, Patrícia Martins e Paulo Freitas, e ao Prof. Aureliano Alves, o meu muito obrigado.

Só quem passa por estas coisas é que pode avaliar o quanto uma tese de doutoramento se mistura na nossa vida pessoal. Quantos momentos são roubados à nossa intimidade, ao convívio com aqueles que amamos? Incontáveis. E, no entanto, o mais espantoso é que essas pessoas estão sempre lá, é só olhar para o lado, estender a mão, e lá está um sorriso, um carinho, um conforto. A vós, os que eu amo, e que sem terem nada a ver com isto sempre sofreram os embates do meu empenho nesta causa, dedico esta tese.

RESUMO

Neste trabalho investigou-se a aplicabilidade da ecocardiografia para o estudo não invasivo da morfologia e fisiologia cardíacas de um teleosteo marinho, a espécie *Halobatrachus didactylus*, com vista à sua utilização, como um modelo experimental fiável, para o estudo dos mecanismos que regulam a contracção cardíaca, nomeadamente mecanismos de adaptação a alterações ambientais, farmacológicas e fisiopatológicas. Realizaram-se exames ecocardiográficos *in vivo* a indivíduos anestesiados e registaram-se imagens de vários planos das estruturas cardíacas, obtidos por ecocardiografia bidimensional e em modo-M. Foi também efectuado o registo de velocidade dos vários fluxos cardíacos (enchimento e ejeção ventricular e fluxo coronário), por ecocardiografia Doppler e Doppler-cor. A ecocardiografia providenciou imagens bidimensionais das câmaras cardíacas de excelente qualidade, com boa definição tanto do contorno externo como interno do ventrículo, que permitiram a determinação de vários parâmetros morfológicos e fisiológicos do coração da espécie em estudo.

A aplicação da ecocardiografia no modelo experimental permitiu efectuar uma caracterização tecidual do ventrículo por densitometria ecocardiográfica bidimensional. Este estudo demonstrou que a análise espectral quantitativa densitométrica do tecido das paredes do ventrículo é exequível e revelou diferenças nas características do ventrículo de *H. didactylus*, em diferentes regiões da parede e em diferentes momentos do ciclo cardíaco. A variação física da distribuição espectral de cinzentos das imagens da parede do ventrículo, ao longo do ciclo cardíaco, traduz as modificações introduzidas pelo processo contráctil do miocárdio ventricular e documenta a sensibilidade desta técnica.

Foram determinados índices de eficiência ventricular que se baseiam na capacidade do ventrículo para bombear sangue (volume de ejeção e débito cardíaco), na sua habilidade para gerar força (gradientes de pressão), na sua habilidade de encurtar a cada contracção (fracção de ejeção e fracção de encurtamento) e nas relações temporais da contracção e relaxamento (intervalos sistólicos e diastólicos). A determinação destes parâmetros possibilitou estudar a função sistólica e função diastólica. A reserva coronária foi estudada a partir dos registos Doppler de velocidade do fluxo coronário. Este trabalho provou que todos estes parâmetros podem ser obtidos de forma não-invasiva em vertebrados não mamíferos e podem ser utilizados para estudar os factores que regulam a função cardíaca nestas espécies. Esta técnica viabilizou a determinação das variações volumétricas e hemodinâmicas do ventrículo de *H. didactylus*, com valores similares aos obtidos para outras espécies de baixa actividade metabólica, por outras técnicas.

A vantagem mais importante da ecocardiografia é a sua natureza não-invasiva, que fornece imagens das estruturas cardíacas com elevado detalhe morfológico e funcional, em animais intactos. O facto de se aplicar uma técnica não interventiva garante a ausência de danos nos animais, o que permitiu repetir os exames no mesmo animal ao longo do tempo. Este estudo prova a utilidade desta técnica para estudar índices de função ventricular nesta espécie e abre caminho para a sua aplicação a outras espécies de peixes e a outros grupos de vertebrados não mamíferos.

SUMMARY

The applicability of echocardiography to the non-invasive study of heart morphology and physiology of a marine teleost, the Lusitanian Toadfish (*Halobatrachus didactylus*), was investigated, regarding its use as a reliable experimental model to study the cardiac contraction regulatory mechanisms, namely adaptation mechanisms to environmental, pharmacological and physiopathological changes. Echocardiographic examination was performed *in vivo* on anaesthetised individuals. Bidimensional images of heart structures were obtained by bidimensional echocardiography and M-mode. Doppler velocity spectrum of cardiac flows were also recorded (ventricular filling and ejection flows and coronary flow) by pulsed and colour-Doppler. Several morphological and physiological indices were determined based on two-dimensional images, with high quality internal and external ventricular contours.

Ultrasound myocardial tissue characterization was obtained by quantitative analysis of the two-dimensional spatial pattern of the echocardiographic images. These results demonstrate the applicability of densitometric myocardial tissue analysis and emphasized regional and temporal tecdular differences on the ventricle of *H. didactylus*. Grey scale spectral distribution of ventricle wall images, throughout the cardiac cycle, reveal contractible changes on the ventricular myocardium and states the sensitivity of this technique.

Several indices of ventricle performance were determined based on the capacity of the blood to pump blood (stroke volume and cardiac output), the ability to generate force (pressure gradients), the ability to shorten with each contraction (ejection fraction and fractional shortening) and the temporal relationships of contraction and relaxation (systolic and diastolic intervals). These parameters allowed to study systolic and diastolic functions of the *H. didactylus* heart. Coronary reserve flow was also calculated, based on spectral Doppler records of coronary blood flow. This work proved that all these parameters can be obtained by a non-invasive approach in lower vertebrates and are useful to study the cardiac contraction regulation in these animals. The volumetric and hemodynamic variations of *H. didactylus* ventricle, were similar to other sedentary species, derived with other techniques.

The strongest advantage of echocardiography is its non invasive approach, which provides cardiac structural images with detailed morphological and functional information, from intact animals. The application of a non invasive technique guaranties the absence of injury to the patient, which allowed to repeat the examination throughout time, on the same animal. This work proves the utility of echocardiography to study ventricular functional indices on this specie and opens the chance to study other fish species and other vertebrate groups.

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Summary	iii
Índice geral	iv
Índice de figuras	ix
Índice de tabelas	xiv
Abreviaturas	xv

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL 1

1. INTRODUÇÃO 2

2. MORFOLOGIA E FUNÇÃO CARDÍACA EM PEIXES 4

2.1. Introdução 4

2.2. Anatomia e morfologia cardíaca 5

2.2.1. Seio venoso 5

2.2.2. Aurícula 6

2.2.3. Ventrículo 6

Forma 7

Estrutura do miocárdio 7

Irrigação 7

Tipos de ventrículo 7

Mioarquitetura 10

Massa ventricular relativa 10

2.2.4. Bulbo arterial 11

2.3. Ciclo cardíaco 12

2.4. Função cardíaca 13

2.4.1. Débito cardíaco 13

2.4.2. Volume de ejeção 15

Volume telediastólico 15

Enchimento cardíaco 16

Tempo de enchimento 16

Distensibilidade ventricular 17

Contractilidade 17

Pressão arterial 18

2.4.3. Frequência cardíaca 18

3. ECOCARDIOGRAFIA 20

3.1. Desenvolvimento da ecocardiografia 20

3.2. Ecocardiografia – princípios e instrumentação 21

3.2.1. Propriedades dos ultra-sons 21

3.2.2. Transdutores 22

3.3. Ecocardiografia bidimensional e modo-M 23

3.4. Ecocardiografia Doppler	24
3.4. Doppler-cor	26
3.5. Ecocardiografia - vantagens e limitações	27
3.6. Ultrasonografia em Vertebrados não Mamíferos	28
CAPÍTULO II – METODOLOGIA APLICADA NOS EXAMES ECOCARDIOGRÁFICOS	30
<hr/>	
1. POPULAÇÃO	31
1.1. Biologia do modelo experimental	31
1.2. Grupo experimental e manutenção	32
2. METODOLOGIA ECOCARDIOGRÁFICA	33
2.1. Preparação dos exames ecocardiográficos	33
2.2. Instrumentação	34
2.3. Electrocardiograma	36
2.4. Posicionamento e orientação da sonda	36
2.5. Ecocardiografia bidimensional e modo-M	38
2.6. Doppler-cor	40
2.7. Ecocardiografia doppler	41
2.8. Armazenamento e processamento de imagens	42
2.9. Limitações	42
CAPÍTULO III – CARACTERIZAÇÃO ECOCARDIOGRÁFICA DA MORFOLOGIA E FISIOLOGIA CARDÍACA EM <i>Halobatrachus didactylus</i>	44
<hr/>	
1. CARACTERIZAÇÃO DA ANATOMIA E HISTOLOGIA DO VENTRÍCULO	45
1.1. Introdução	45
1.2. Material e Métodos	45
1.2.1. Morfometria	46
1.2.2. Processamento histológico	47
1.2.3. Colorações	47
<i>Hematoxilina-eosina (HE)</i>	47
<i>Reacção do ácido periódico-Schiff (PAS)</i>	48
<i>Coloração para lípidos</i>	48
<i>Picrosirius</i>	48
1.2.4. Análise histológica	48
<i>Identificação de estruturas celulares</i>	48
<i>Cálculo da fracção de área dos componentes do miocárdio</i>	49
1.2.5. Análise estatística	49
1.3. Resultados	49
1.3.1. Descrição macroscópica do coração de <i>H. didactylus</i>	49
1.3.2. Descrição microscópica do coração de <i>H. didactylus</i>	51

1.3.3. Fracção de área dos componentes da parede ventricular	55
1.4. Discussão	57
1.5. Conclusões	58
2. CARACTERIZAÇÃO TECIDULAR DO MIOCÁRDIO VENTRICULAR – ANÁLISE DENSITOMÉTRICA	59
2.1. Introdução	59
2.2. Material e Métodos	60
2.2.1. Grupo experimental	60
2.2.2. Metodologia ecocardiográfica	61
2.2.3. Metodologia densitométrica	61
2.2.4. Variação inter-axial e cíclica	62
2.2.5. Variação intra e inter-observador	63
2.2.6. Análise estatística	64
2.3. Resultados	64
2.3.1. Variação inter-axial e cíclica	64
2.3.2. Variação intra e inter-observador	65
2.4. Discussão	66
2.5. Conclusões	68
3. ESTUDO HEMODINÂMICO NÃO INVASIVO DA FUNÇÃO SISTÓLICA VENTRICULAR POR ECODOPPLER	69
3.1. Introdução	69
3.2. Material e Métodos	70
3.2.1. Grupo experimental	70
3.2.2. Metodologia ecocardiográfica	70
3.2.3. Velocidade máxima e gradiente de pressão	70
3.2.4. Integral velocidade-tempo e volume de ejeção	72
3.2.5. Intervalos sistólicos	72
3.2.6. Análise estatística	73
3.3. Resultados	74
3.3.1. Velocidade máxima e gradiente de pressão	74
3.3.2. Integral velocidade-tempo e volume de ejeção	75
3.3.3. Intervalos sistólicos	75
3.4. Discussão	78
3.4.1. Velocidade máxima e gradiente de pressão	78
3.4.2. Integral velocidade-tempo e volume de ejeção	79
3.4.3. Intervalos sistólicos	79
3.5. Conclusões	81
4. ESTUDO HEMODINÂMICO NÃO INVASIVO DA FUNÇÃO DIASTÓLICA VENTRICULAR POR ECODOPPLER	83
4.1. Introdução	83
4.2. Material e Métodos	85
4.2.1. Grupo experimental	85
4.2.2. Metodologia ecocardiográfica	85
4.2.3. Velocidades máximas e razão E/A	85

4.2.4. Intervalos diastólicos	86
4.2.5. Análise estatística	88
4.3. Resultados	88
4.3.1. Velocidades máximas e razão E/A	88
4.3.2. Intervalos diastólicos	90
4.4. Discussão	92
4.5. Conclusões	98
5. DETERMINAÇÃO DO PADRÃO DE CONTRACÇÃO, VOLUMES, MASSA E ÍNDICES FUNCIONAIS DO VENTRÍCULO POR ECOCARDIOGRAFIA BIDIMENSIONAL	100
5.1. Introdução	100
5.2. Material e Métodos	101
5.2.1. Grupo experimental	101
5.2.2. Metodologia ecocardiográfica	101
5.2.3. Dimensões lineares	102
5.2.4. Cálculo de volumes	103
5.2.5. Validação do cálculo do volume	105
5.2.6. Índices de função ventricular	105
5.2.7. Análise estatística	107
5.3. Resultados	108
5.3.1. Qualidade das imagens de ecocardiografia 2D	108
5.3.2. Dimensões lineares	108
5.3.3. Dados volumétricos	111
5.3.4. Índices de função ventricular	114
5.4. Discussão	116
5.4.1. Qualidade das imagens ecocardiográficas 2D	116
5.4.2. Dados lineares padrão de contracção	117
5.4.3. Dados volumétricos	119
5.4.4. Índices de função ventricular	122
5.5. Conclusões	124
6. MELHORAMENTO DO CÁLCULO DE VOLUMES DO VENTRÍCULO – APLICAÇÃO DO TRANSDUTOR LINEAR DE 15 MHZ DE EMISSÃO	126
6.1. Introdução	126
6.2. Material e Métodos	127
6.2.1. Grupo experimental	127
6.2.2. Metodologia ecocardiográfica	127
<i>Eco 2D fundamental</i>	127
<i>Doppler-cor</i>	127
<i>Doppler pulsado</i>	127
<i>Ecocardiografia de contraste</i>	128
6.2.3. Cálculo do volume de ejeção	128
6.2.4. Validação do cálculo do volume	129
6.2.5. Análise estatística	129
6.3. Resultados	130
6.3.1. Qualidade das imagens	130
6.3.2. Cálculo do volume de ejeção	131

6.4. Discussão	132
6.5. Conclusões	134
7. ESTUDO NÃO INVASIVO DO FLUXO E DA RESERVA CORONÁRIA	136
7.1. Introdução	136
7.2. Material e Métodos	137
7.2.1. Grupo experimental	137
7.2.2. Metodologia ecocardiográfica	138
<i>Doppler-cor</i>	138
<i>Doppler espectral</i>	138
<i>Eco de contraste</i>	138
7.2.3. Reserva coronária	138
7.2.4. Análise estatística	139
7.3. Resultados	139
7.3.1. Visualização do fluxo coronário	139
7.3.2. Perfil de velocidade do fluxo coronário	140
7.3.3. Reserva coronária	142
7.4. Discussão	142
7.5. Conclusões	145
CAPÍTULO IV – CONSIDERAÇÕES FINAIS	147
<hr/>	
1. Ecocardiografia aplicada ao estudo do coração de <i>H. didactylus</i>	148
2. Caracterização tecidual do miocárdio	149
3. Determinação de índices de função ventricular	149
CAPÍTULO V - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	153
<hr/>	

Anexo – Lista de publicações e comunicações

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.2.1 - Esquema geral do sistema circulatório dos peixes teleósteos (adaptado de Randall <i>et al.</i> , 1997).	5
Figura I.2.2 - Esquema representativo dos diferentes tipos de ventrículo – I, II, III e IV - segundo Tota <i>et al.</i> (1983). A estrutura anatómica do coração foi dividida em quatro quadrantes, cada um representando os aspectos particulares de cada tipo.....	9
Figura I.2.3 - Esquema dos factores que controlam o débito cardíaco nos peixes: ”+” representa relações directas; “-“ representa relações inversas (adaptado de Olson, 1998).....	14
Figura I.3.1 - Esquema representativo de vários tipos de ecocardiogramas: modo-A, modo-B e modo-M. Os três modos estão representados num sistema de eixos “xyz”: no modo-A, “x” mede a amplitude e “y” a distância; no modo-B, “y” mede a distância e “z”, através de modulação de intensidade, representa a amplitude; o modo-M obtém-se do modo-B, adicionando-lhe um eixo de tempo (eixo “x”) (adaptado de Oliveira, 1988).....	23
Figura I.3.2 - Esquema representativo do efeito Doppler (adaptado de Oh <i>et al.</i> , 1994): <i>F_e</i> , frequência dos ultra-sons emitidos; <i>F_r</i> , frequência dos ultra-sons reflectidos; <i>v</i> , velocidade das células sanguíneas (GV); θ , ângulo entre a direcção do feixe emitido e a direcção do deslocamento dos GV. A variação de frequência (ΔF) e a <i>v</i> , são calculados de acordo com as equações 1.3.1 e 1.3.2, respectivamente.	25
Figura II.1.1 - Exemplar da espécie <i>H. didactylus</i> no seu meio natural (cortesia de José Vieira, <i>Hidrospaço</i>).	32
Figura II.2.1 - Sistema de recirculação de água utilizado durante os exames ecocardiográficos. O animal foi posicionado com a face ventral para cima, com um tubo introduzido na cavidade bucal, com débito de água controlado. Os eléctrodos para registo do ECG foram colados na face ventral.....	34
Figura II.2.2 - Ecógrafo <i>Aloka SSD 830</i> (A) e respectivas sondas (B).	35
Figura II.2.3 - Ecógrafo <i>Acuson Sequoia 512</i> (© 2000 Acuson).....	35
Figura II.2.4 - Posicionamento dos eléctrodos para registo do electrocardiograma: os três eléctrodos foram fixados através de adaptadores pediátricos e colocados triangularmente: o verde sobre a barbatana pélvica direita, o branco sobre a barbatana pélvica esquerda e o preto sobre a região anal.....	36
Figura II.2.5 - Posicionamento da sonda sobre a região cardíaca, para obtenção de imagens ecocardiográficas do coração de <i>H. didactylus</i> , em curto eixo (a) e em longo eixo (b), em vista frontal (1) e lateral (2).....	37
Figura II.2.6 - Imagem ecocardiográfica 2D em corte longitudinal do coração de <i>H. didactylus</i> , obtida com o ecógrafo <i>Acuson Sequoia</i> , com sonda de 15 MHz (profundidade 20 mm). Na imagem visualiza-se o ventrículo (V), o lúmen ventricular (<i>L_v</i>) e o bulbo (B).....	39
Figura II.2.7 - Imagem ecocardiográfica 2D em corte transverso do coração de <i>H. didactylus</i> , onde se visualiza a parede do ventrículo (V), o lúmen ventricular (L) e a aurícula (A).....	39
Figura II.2.8 - Imagem ecocardiográfica 2D e MM do coração de um exemplar de <i>H. didactylus</i> , com registo electrocardiográfico (ECG) simultâneo: V - parede do ventrículo; <i>L_v</i> - lúmen ventricular; B - bulbo. Em MM regista-se a variação da cinética da parede do ventrículo em função do tempo, no eixo vertical indicado em 2D (seta branca).....	40

- Figura III.1.1** – Exemplar de *H. didactylus* (macho, 31 cm, 560 g), mostrando os órgãos internos e a localização do coração, na cavidade pericárdica.....46
- Figura III.1.2** - Coração *in situ* de *H. didactylus*, após remoção do pericárdio, evidenciando as quatro câmaras: SV - seio venoso; A - aurícula; V - ventrículo; B - bulbo arterial.....50
- Figura III.1.3** – Coração e aorta ventral de um exemplar da espécie *H. didactylus*: SV, seio venoso; A, aurícula; V - ventrículo; B - bulbo; av - aorta ventral; ab - artérias branquiais.....51
- Figura III.1.4** – Imagens obtidas ao microscópio óptico (ampliação 400×) de um corte transverso de ventrículo de *H. didactylus* corado com Hematoxilina-eosina, correspondentes às diferentes zonas da parede: a) epicárdio; b) miocárdio; c) endocárdio; 1 – células epiteliais; 2 – camada de tecido conjuntivo; 3 – camada fibroadiposa; 4 – região subepicárdica; 5 – fibroblasto; 6 – célula adiposa; 7 – núcleo do miócito; 8 – lacuna; 9 – região subendocárdica; 10 – células endoteliais.....52
- Figura III.1.5** - Imagem obtida ao microscópio óptico (ampliação 400×) da região miocárdica de um corte transverso de ventrículo de *H. didactylus* corado pela reacção do ácido periódico-Shift: 1 - grânulos de glicogénio no sarcoplasma.....53
- Figura III.1.6** - Imagem obtida ao microscópio óptico (ampliação 400×) da região miocárdica de um corte transverso de ventrículo de *H. didactylus* sujeito à coloração para lípidos: 1 - Gotas lipídicas no sarcoplasma.....53
- Figura III.1.7** - Imagens obtidas ao microscópio óptico com luz polarizada (ampliação 400×) de um corte transverso de ventrículo de *H. didactylus* corado com Picrosirius, correspondentes às diferentes zonas do ventrículo: a) epicárdio; b) miocárdio; c) endocárdio; 1 - colagénio do tipo I; 2 - colagénio do tipo III; 3 – músculo; 4 - lacuna..... 54
- Figura III.1.8** - Imagem obtida ao microscópio óptico de um corte transverso do ventrículo de *H. didactylus* corado com Hematoxilina-eosina (ampliação 1000×): 1 - capilares subendocárdicos; 2 - célula endotelial da parede do capilar; 3 - células endoteliais endocárdicas.....55
- Figura III.1.9** – Fração de área dos elementos estruturais do tecido ventricular de *H. didactylus*(n=10): colagénio I (col I), colagénio III (col III), tecido muscular (músculo) e espaços lacunares (lacunas), em três regiões da parede - epicárdio, miocárdio e endocárdio.....57
- Figura III.2.1** – Janela do programa *Optimas* com histograma de frequência de pixels (yy), em função da escala adimensional de cinzentos (xx), da região de interesse seleccionada e respectivos parâmetros estatísticos da distribuição: média (mean), desvio padrão (stddev), variância (var), máximo (max) e mínimo (min), número de pixels (counts) analisados e número de valores da escala apresentados no histograma e utilizados na estatística (n bins).....62
- Figura III.2.2** – Representação esquemática de uma imagem em curto eixo do ventrículo de *H. didactylus* obtida por ecocardiografia 2D, indicando a localização das regiões de interesse: 0, 3, 6 e 9 horas, correspondendo à região ventral, lateral direita, dorsal e lateral esquerda, respectivamente; V – parede ventricular e L – lúmen ventricular..... 63
- Figura III.2.3** – Imagens ecocardiográficas 2D em curto eixo do ventrículo de *H. didactylus* utilizadas no estudo densitométrico em telesístole (a) e telediástole (b): V – parede ventricular.....63
- Figura III.2.4** – Gráficos representativos da correlação dos valores densitométricos de imagens ecocardiográficas 2D da parede do ventrículo de *H. didactylus*, obtidos pelo mesmo observador em duas ocasiões distintas (a - variação intra-amostrador) e por dois observadores diferentes (b - variação inter-observador)..... 65

- Figura III.3.1** - Imagem ecocardiográfica bidimensional com registo de Doppler-cor e espectro Doppler de velocidade do fluxo de ejeção ventricular de *H. didactylus*, com registo electrocardiográfico (ECG) e indicação da determinação da velocidade máxima do fluxo (V_{max}), do integral velocidade-tempo (IVT) e da área da secção transversal do orifício ventrículo-bulbar ($AST_{v,b}$): V - ventrículo; B - bulbo; av, - aorta ventral.....71
- Figura III.3.2** - Esquema representativo dos intervalos sistólicos estudados: tempo de pré-ejeção - TPEj, tempo de ejeção - TEj, com tempo de aceleração - TAccl e tempo de desaceleração - TDesacel e tempos totais de sístole e diástole (r - onda R; iEj - início de ejeção; pEj - pico de ejeção; fEj - fim de ejeção).....73
- Figura III.3.3** - Variação dos intervalos sistólicos em função da frequência cardíaca do coração de *H. didactylus* (n=14). As linhas representam rectas de regressão entre os intervalos sistólicos e a frequência cardíaca: $y(TPEj)=0,0014x+0,10$; $r^2=0,12$ $y(TAccl)=-0,0017x+0,16$; $r^2=0,34$; $y(TDesacel)=-0,006x+0,51$; $r^2=0,64$; $y(TEj)=-0,007x+0,66$; $r^2=0,66$; $y(Sístole)=-0,0059x+0,77$; $r^2=0,72$; $y(Diástole)=-0,03x+2,27$; $r^2=0,94$77
- Figura III.3.4** - Variação dos intervalos sistólicos (em percentagem ocupada no ciclo cardíaco) em função da frequência cardíaca do coração de *H. didactylus* (n=14). As linhas representam rectas de regressão entre os intervalos sistólicos e a frequência cardíaca: $y(TPEj)=0,366x-3,99$; $r^2=0,68$; $y(TAccl)=0,012x+5,54$; $r^2=0,004$; $y(TDesacel)=0,101x+14,5$; $r^2=0,13$; $y(TEj)=0,11x+20,1$; $r^2=0,08$; $y(Sístole)=0,48x+16,1$; $r^2=0,72$; $y(Diástole)=-0,48x+83,9$; $r^2=0,72$77
- Figura III.4.1** - Imagem ecocardiográfica com registo Doppler de velocidade do fluxo de enchimento ventricular do coração de *H. didactylus*, com registo electrocardiográfico (ECG) simultâneo e indicação das medições efectuadas para determinação da velocidades máximas das ondas E e A (V_{maxE} , V_{maxA}).....86
- Figura III.4.2** - Esquema representativo dos intervalos diastólicos: tempo de relaxamento isovolumétrico (TRI); tempo de enchimento precoce (TEP); diástase (Diast) e tempo de enchimento tardio (TET) (r - onda R; p - onda P; t - onda T).....87
- Figura III.4.3** - Registo Doppler do fluxo de enchimento ventricular do coração de *H. didactylus*, com registo electrocardiográfico (ECG) simultâneo e indicação dos intervalos diastólicos: tempo de relaxamento isovolumétrico (TRI); tempo de enchimento precoce (TEP); diástase (Diast) e tempo de enchimento tardio (TET) (um ciclo cardíaco - intervalo RR).....87
- Figura III.4.4** - Imagens ecocardiográficas bidimensional com registo Doppler do fluxo de enchimento ventricular do coração de *H. didactylus*, com registo electrocardiográfico (ECG) simultâneo, obtido a partir de incidência transversal (a) e longitudinal (b). A amostra de volume foi colocada sobre o orifício aurículo-ventricular (O_{av}). Em ambas as incidências é registado um fluxo bifásico com o mesmo perfil (E - onda E; A - onda A).....89
- Figura III.4.5** - Registo Doppler do fluxo de enchimento ventricular do coração de *H. didactylus*, com registo electrocardiográfico (ECG) simultâneo, obtido a frequências cardíacas diferentes: a) onda E inferior à onda A, FC=46 bpm; b) onda E superior à onda A, FC = 18 bpm (E - onda E; A - onda A).....89
- Figura III.4.6** - Variação da razão E/A em função da frequência cardíaca do coração de *H. didactylus* (n=14). A recta de regressão é definida por: $y = -0,03x + 1,87$, com $r^2 = 0,63$90
- Figura III.4.7** - Variação temporal dos intervalos diastólicos em função da frequência cardíaca do coração de *H. didactylus* (n=14). As rectas de regressão entre os intervalos diastólicos e a frequência cardíaca são definidas por: $y(Diástole) = -0,07x + 3,65$; $r^2 = 0,91$; $y(TRI) = -0,005x + 0,34$; $r^2 = 0,74$; $y(TEP) = -0,009x + 0,65$; $r^2 = 0,55$; $y(Diástase) = -0,051x + 2,39$; $r^2 = 0,81$; $y(TET) = -0,00003x + 0,27$; $r^2=0,013$91

- Figura III.4.8** - Variação percentual dos intervalos diastólicos em função da frequência cardíaca do coração de *H. didactylus* (n=14). As rectas de regressão entre os intervalos diastólicos e a frequência cardíaca são definidas por: y (Diástole) = $-0,82x + 92,6$; $r^2 = 0,78$; y (TET) = $0,42x + 0,56$; $r^2 = 0,91$; y (Diastáse) = $-1,29x + 69$; $r^2 = 0,808$; y (TRI) = $-0,017x + 8,25$; $r^2 = 0,01$; y (TEP) = $0,063x + 14,8$; $r^2 = 0,028$ 92
- Figura III.4.9** - Sequência de imagens bidimensional, com Doppler-cor, em incidência transversal sobre a região média do coração de *H. didactylus*: 1 – diastáse (fluxo vermelho, enchimento auricular); 2 – contração auricular (enchimento ventricular tardio); 3 – contração isovolumétrica; 4 – ejeção ventricular; 5 – relaxamento isovolumétrico; 6 – enchimento ventricular precoce. A seta branca indica no traçado electrocardiográfico (ECG), o momento do ciclo cardíaco em que foi registada a imagem. V- ventrículo; A – aurícula.....94
- Figura III.4.10** - Imagem de ecocardiografia bidimensional em curto eixo do ventrículo de *H. didactylus* com registo Doppler do fluxo de enchimento auricular (vermelho): V - ventrículo; A - aurícula; SV - seio venoso.....96
- Figura III.5.1** - Representação esquemática do corte longitudinal do ventrículo de *H. didactylus* obtido por ecocardiografia 2D, indicando as medições efectuadas: DL_e – diâmetro longitudinal externo; DL_i - diâmetro longitudinal interno; DT_e - diâmetro transversal externo; DT_i - diâmetro transversal interno.102
- Figura III.5.2** - Imagens ecocardiográficas 2D longitudinais do ventrículo de *H. didactylus*, utilizadas para determinação dos diâmetros ventriculares, em telesístole (a) e telediástole (b). A seta branca indica no traçado electrocardiográfico (ECG) o momento do ciclo cardíaco em que foi registada a imagem. Em baixo, representação esquemática do contorno das estruturas: ventrículo (V) e bulbo (B) (cortesia de António Granja Publicidade)..... 103
- Figura III.5.3** - Imagem em MM do ventrículo de *H. didactylus*, com traçado electrocardiográfico simultâneo, indicando as medições lineares efectuadas: DTD – diâmetro na telediástole; DTS – diâmetro na telesístole (parede ventricular (V); lúmen ventricular (L_v))..... 106
- Figura III.5.4** - Variação dos diâmetros transversos (DT) e longitudinais (DL), externos (e) e internos (i) do ventrículo ao longo do ciclo cardíaco, de um exemplar da espécie *H. didactylus*: 763 g, 32 cm comprimento, macho, FC=30 bpm (TPEj - tempo de pré-ejeção, TEj - tempo de ejeção, TRI - tempo de relaxamento isovolumétrico, TEP - tempo de enchimento precoce, Diast - diastáse e TET - tempo de enchimento tardio)..... 109
- Figura III.5.5** - Variação da razão entre os diâmetros longitudinais (DL) e transversos (DT), externos (A) e internos (B) do ventrículo de *H. didactylus*, ao longo do ciclo cardíaco (TPEj - tempo de pré-ejeção, TEj - tempo de ejeção, TRI - tempo de relaxamento isovolumétrico, TAP - tempo de enchimento precoce, diast - diastáse e TET, tempo de enchimento tardio)..... 110
- Figura III.5.6** - Correlação entre do volume do miocárdio ventricular (VMV) derivado dos algoritmos e o VMV derivado do peso em telediástole (A) e telesístole (B). As linhas representam regressões lineares entre as variáveis: A) y (Cúbico)= $1,43x+0,24$; $r^2=0,50$; y (Teichholtz)= $2,67x+0,482$; $r^2=0,482$; y (Área-comprimento)= $0,88x+0,16$; $r^2=0,51$; y (Simpson)= $0,88x+0,11$; $r^2=0,88$; B) y (Cúbico)= $0,56x+0,21$; $r^2=0,172$; y (Teichholtz)= $1,13x+0,51$; $r^2=0,17$; y (Área-comprimento)= $0,44x+0,19$; $r^2=0,23$; y (Simpson)= $0,651x+0,113$; $r^2=0,78$ 114
- Figura III.5.7** - Imagem de ecocardiografia 2D e MM em curto eixo da região média do ventrículo de *H. didactylus*, com registo electrocardiográfico (ECG) simultâneo: V - parede ventricular; L_v - lúmen ventricular. A seta branca indica o eixo da imagem em MM..... 118
- Figura III.6.1** - Imagens ecocardiográficas 2D em longo-eixo do coração de *H. didactylus*: (a) modo fundamental, o VTSi foi calculado pelo contorno interno do ventrículo; (b) Doppler-cor dos fluxos intracardíacos de baixa velocidade, o VTDi foi calculado a partir do contorno de cor do ventrículo no início da sístole; B – bulbo, V – ventrículo..... 129

- Figura III.6.2** - Imagens ecocardiográficas 2D com registo de Doppler-cor dos fluxos intracardíacos em sístole (a) e diástole (b) e registo electrocardiográfico simultâneo (ECG). Note-se a inversão do padrão de cor do fluxo em sístole e diástole, indicando a entrada e saída de sangue das lacunas (V - ventrículo; B - bulbo).....131
- Figura III.6.3** - Correlação entre o volume de ejeção de *H. didactylus* (n=6) obtido de dados morfométricos e hemodinâmicos.....132
- Figura III.7.1** - Imagens ecocardiográficas 2D, em incidência transversal (a) e longitudinal (b) do coração de *H. didactylus*, com registo Doppler-cor do fluxo coronário (laranja) e electrocardiograma simultâneo (ECG); V - ventrículo; A - aurícula; B - bulbo.....140
- Figura III.7.2** - Imagens ecocardiográficas 2D longitudinais do coração de *H. didactylus*, com registo Doppler-cor dos fluxos cardíacos após injeção do agente de contraste Levovist, em sístole (a) e diástole (b): V - ventrículo; B - bulbo; electrocardiograma (ECG).....140
- Figura III.7.3** - Imagens ecocardiográficas bidimensionais com registo Doppler de velocidade do fluxo coronário de *H. didactylus*, em condições basais (a) e após injeção de adenosina (b); imagens 2D em longo-eixo do ventrículo (V) e bulbo (B); as setas indicam o registo do fluxo coronário.....141

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela III.1.1 - Percentagem de área ocupada pelos componentes do tecido cardíaco de <i>H. didactylus</i> (n=10), nas três regiões da parede ventricular: subepicárdica, miocárdica e subendocárdica.....	56
Tabela III.2.1 - Valores densitométricos adimensionais obtidos de imagens ecocardiográficas bidimensionais do ventrículo de <i>H. didactylus</i> (n=6), em telesístole e telediástole em quatro zonas da parede	65
Tabela III.3.1 - Registo da velocidade máxima e do gradiente de pressão do fluxo de ejeção ventricular de <i>H. didactylus</i> (n=14).....	74
Tabela III.3.2 - Registo do volume de ejeção e do débito cardíaco de <i>H. didactylus</i> (n=14).....	75
Tabela III.3.3 - Registo dos intervalos sistólicos do coração de <i>H. didactylus</i> (n=14).....	76
Tabela III.4.1 - Intervalos diastólicos do coração de <i>H. didactylus</i> (n=14).....	91
Tabela III.5.1 - Registo dos diâmetros ventriculares de <i>H. didactylus</i> (n=10) em telesístole e telediástole, obtidos por ecocardiografia 2D.....	111
Tabela III.5.2 - Registo dos volumes ventriculares de <i>H. didactylus</i> (n=10) obtidos por quatro métodos lineares: <i>Cúbico, Teichholtz, Área-Comprimento e Simpson</i>	112
Tabela III.5.3 - Registo do volume do miocárdio ventricular de <i>H. didactylus</i> (n=10), em telesístole e telediástole, derivado de quatro métodos lineares e do peso do ventrículo.....	113
Tabela III.5.4 - Registo do volume de ejeção e débito cardíaco de <i>H. didactylus</i> (n=10).....	115
Tabela III.5.5 - Registo dos índices funcionais do ventrículo de <i>H. didactylus</i> (n=10), derivados pelo método de Simpson.....	116
Tabela III.6.1 - Registo do volume de ejeção ventricular de <i>H. didactylus</i> (n=6), obtido por três métodos diferentes	131
Tabela III.7.1- Registo da reserva coronária de <i>H. didactylus</i>	142

ABREVIATURAS

- ΔF – variação de frequência (MHz)
- μm - micrómetro
- ΔP - gradiente de pressão (mmHg)
- 2D** - bidimensional
- A** – aurícula
- ab** - artérias branquiais
- ADN** – ácido desoxiribonucleico
- ARN** – ácido ribonucleico
- AST_{v-b}** - área da secção transversal do orifício ventrículo-bulbar (cm²)
- av** – aorta ventral
- B** – bulbo
- BMP** – bit map
- bpm** – batimentos por minuto
- c* – velocidade de propagação dos ultra-sons (m/s)
- cm** – centímetro
- cm/s** – centímetro por segundo
- Col I** – colagénio do tipo I
- Col III** – colagénio do tipo III
- cos** - coseno
- dB** - decibel
- DC** - débito cardíaco (ml/min)
- DC_c** - débito cardíaco expresso por peso corporal (ml/min/kg)
- Diast** – diastáse (s)
- DL_e** – diâmetro longitudinal externo (cm)
- DL_i** - diâmetro longitudinal interno (cm)
- DTD** - diâmetro ventricular em telesístole (cm)
- DT_e** - diâmetro transverso externo (cm)
- DT_i** - diâmetro transverso interno (cm)
- DTS** – diâmetro ventricular em telediástole (cm)
- ECG** - electrocardiograma

FC – frequência cardíaca (bpm)
Fe - frequência dos ultra-sons emitidos (MHz)
FEj - fracção de ejeção (%)
fEj - fim de ejeção
FEn - fracção de encurtamento (%)
Fig. – figura
Fr - frequência dos ultra-sons reflectidos (MHz)
g – grama
g/ml – grama por mililitro
h - hora
HE – hematoxilina-eosina
HSL - *hue, saturation, luminance*
iEj - início de ejeção
IS – intervalos sistólicos (s)
IVT - integral velocidade-tempo (cm)
kg - quilograma
Lv - lúmen ventricular
m/s – metro por segundo
MCR - massa cardíaca relativa (%)
mg/kg – miligrama por quilograma
mg/ml – miligrama por mililitro
MHz – megahertz
ml - mililitro
ml/l – mililitro por litro
ml/min/kg – mililitro por minuto por quilograma
mm - milímetro
MM – modo M
mmHg – milímetro de mercúrio
MV - massa volúmica (g/ml)
MVR - massa ventricular relativa (%)
n – número
O_{av} - orifício aurículo-ventricular
p – onda p
PAS - ácido periódico-Schiff

P_{av} – pressão na aorta ventral (mmHg)
 pEj - pico de ejeção
 PO_2 – pressão de oxigénio (mmHg)
 q – onda q
 qrs – complexo qrs, despolarização ventricular
 r – onda r
 r – raio (cm)
 RC – Reserva coronária (%)
 RGB – *red, green, blue*
 RI - região de interesse
 RR – intervalo rr
 s - segundo
 SV - seio venoso
 $TAcel$ - tempo de aceleração (s)
 $TDesacel$ - tempo de desaceleração (s)
 TEA - tempo da contracção auricular (s)
 TEE - tempo de enchimento precoce (s)
 TEj - tempo de ejeção (s)
 $TIFF$ - *tagget image file format*
 $TPEj$ - tempo de pré-ejeção (s)
 TRI – tempo de relaxamento isovolumétrico (s)
 v - velocidade das células sanguíneas (m/s)
 V – ventrículo
 VE - volume de ejeção (ml)
 VE_c – volume de ejeção expresso por peso corporal (ml/kg)
 VE_e - volume de ejeção calculado a partir de volumes externo (ml)
 $VE_{hemodinámico}$ - volume de ejeção calculado a partir de dados hemodinâmicos
 VE_i - volume de ejeção calculado a partir de volume internos (ml)
 V_{max} - velocidade máxima do fluxo
 VMV – volume do miocárdio ventricular (ml)
 $VMV_{algoritmo}$ - volume do miocárdio ventricular derivado de algoritmos (ml)
 VMV_{peso} - volume do miocárdio ventricular derivado do peso (ml)
 VTD – volume telediastólico do ventrículo (ml)
 VTD_e – volume telediastólico externo do ventrículo (ml)

VTD_i – volume telediastólico interno do ventrículo (ml)

VTS – volume telesistólico do ventrículo (ml)

VTS_e – volume telesistólico externo do ventrículo (ml)

VTS_i – volume telesistólico interno do ventrículo (ml)

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO

Os factores que regulam a função cardíaca têm sido alvo de um crescente interesse nos últimos anos, uma vez que as doenças cardiovasculares são a primeira causa de mortalidade e morbidade no mundo industrializado. A geometria e estrutura do coração têm sido amplamente estudadas por serem factores determinantes da função cardíaca normal. Assim, alterações estruturais do tecido cardíaco parecem estar na origem de algumas das patologias cardíacas mais comuns.

Por outro lado, e em face da complexidade do coração dos mamíferos, tem também crescido a procura de modelos animais alternativos para o estudo dos sistemas cardiovasculares e dos factores que estão na base da sua regulação. Vários autores tem desenvolvido e defendido a utilização de modelos experimentais não mamíferos, nomeadamente os peixes, para o estudo da função cardíaca (Benitez *et al.*, 1994a e 1994b; Sanchez-Quintana *et al.*, 1995; Chápuli e Hamlett, 1996; Coucelo *et al.*, 1996).

Os peixes apresentam características excepcionais para o estudo da função cardíaca pois possuem um coração mais simples, com ventrículo único, que apresenta, no entanto, características funcionais equivalentes ao ventrículo esquerdo dos mamíferos. Estes animais apresentam características ecofisiológicas únicas dentro dos vertebrados, sendo o grupo que apresenta maior variabilidade a nível do ventrículo. Estas variações abrangem a forma, o tamanho, a mioarquitectura e a irrigação do miocárdio, e estão relacionadas com adaptações morfofisiológicas específicas de cada espécie ao seu habitat e modo de vida (Santer e Greer-Walker, 1980; Santer *et al.*, 1983; Tota *et al.*, 1983; Emery *et al.*, 1985; Johansen e Gesser, 1986; Sanchez-Quintana e Hurlé, 1987; Farrell, 1991; Harrison *et al.*, 1991; Sanchez-Quintana *et al.*, 1995; Zummo *et al.*, 1995). O estudo do coração, nomeadamente da relação morfologia / função ventricular deste grupo de animais, apresenta um interesse especial, uma vez que poderá esclarecer os mecanismos de adaptação ao ambiente e a situações patológicas.

Diferentes técnicas tem sido aplicadas para o estudo de vários aspectos da morfologia e da função cardíaca em peixes. A esmagadora maioria dos estudos que têm sido feitos sobre o sistema cardiovascular de vertebrados não mamíferos, utiliza técnicas invasivas. Os dados disponíveis provêm de estudos *in vitro* - utilizando preparações isoladas de secções de vasos sanguíneos ou de tecido cardíaco, *in situ* - utilizando preparações perfundidas de corações isolados e *in vivo* - com a aplicação de transdutores

de pressão directamente nos vasos, consequentemente dependentes de procedimentos cirúrgicos. Cada um destes métodos apresenta vantagens e limitações. Os estudos *in vitro* e *in situ* têm fornecido informações relativas à função contráctil e actividade eléctrica mas muitos destes estudos foram realizados em condições não fisiológicas, comprometendo a extrapolação dos resultados obtidos para o animal como um todo (Farrell, 1984; Farrell e Jones, 1992). Os estudos *in vivo* tem a vantagem de lidar com a enervação do coração intacta, mas são limitados pelo stress induzido ao animal pelo manuseamento e por os efeitos observados serem não específicos. Além disso, estes animais são sujeitos a intervenções cirúrgicas o que, interfere com o seu estado fisiológico. Como tal, a determinação de parâmetros funcionais do coração, obtidos a partir de animais intactos, é essencial para avaliar a fisiologia cardíaca e os factores que controlam a sua eficiência.

A ecocardiografia é uma técnica não-invasiva que tem sido largamente utilizada para o estudo dos sistemas cardiovasculares em mamíferos. As vantagens decorrentes do carácter não-invasivo desta técnica conduziram a um investimento crescente no desenvolvimento técnico e que, hoje em dia, seja amplamente utilizada quer na prática clínica, quer na investigação de doenças cardiovasculares. Apesar das evidentes vantagens da ecocardiografia, a sua aplicação ao estudo dos sistemas cardiovasculares em vertebrados não mamíferos tem sido bastante limitada (Franklin e Davie, 1992; Sande e Pope, 1995; Coucelo *et al.*, 1996 e 2000; Lai *et al.*, 1996 e 1998; Snyder, 1999).

As dificuldades da aplicação da ecocardiografia em peixes prendem-se essencialmente com limitações técnicas dos equipamentos de ultra-som disponíveis, uma vez que se encontram exclusivamente vocacionados para a sua utilização no Homem. O recente desenvolvimento de novos transdutores de elevada frequência permitiu a aplicação desta metodologia ao estudo do coração de espécies de reduzido tamanho. Tendo em conta as especificações morfológicas e funcionais dos peixes, torna-se necessário o estudo da aplicação desta metodologia neste grupo.

O objectivo deste trabalho foi aplicar um método não-invasivo, a ultrasonografia, ao estudo de parâmetros de morfologia e fisiologia cardíaca, num modelo experimental - a espécie *Halobatrachus didactylus* - para esclarecer os mecanismos que regulam a contracção cardíaca, nomeadamente mecanismos de adaptação a alterações ambientais, farmacológicas e fisiopatológicas.

2. MORFOLOGIA E FUNÇÃO CARDÍACA EM PEIXES

2.1. INTRODUÇÃO

Em todos os vertebrados adultos, o sistema cardiovascular é essencial à sobrevivência uma vez que garante a distribuição adequada de oxigénio a todos os tecidos e remove o dióxido de carbono e outros produtos do metabolismo. Nos últimos 30 anos, grandes progressos foram feitos no sentido de compreender a fisiologia cardíaca e vascular nos peixes (para revisão ver Farrell e Jones 1992; Farrell, 1993; Olson, 1998). No entanto, a forma como o modo de vida, o nível de actividade e a morfologia do corpo influenciam a morfologia e a fisiologia do sistema cardiovascular nestas espécies, continua longe de ser completamente compreendida.

O plano geral do sistema circulatório dos peixes encontra-se esquematizado na Figura I.2.1. Nestes animais, o coração univentricular situa-se entre a circulação sistémica e branquial, que se organizam em série. O ventrículo bombeia sangue venoso para o bulbo elástico. O sangue flui para uma aorta ventral curta e daí para as branquias onde é oxigenado. A aorta dorsal distribui sangue oxigenado, pós branquial, à circulação sistémica. A circulação de retorno leva o sangue venoso dos tecidos de volta ao coração. A pressão da aorta ventral é determinada pelo débito cardíaco e está directamente relacionada com a resistência vascular branquial e sistémica. A pressão da aorta dorsal está directamente relacionada com a resistência sistémica mas varia inversamente com a resistência branquial. O objecto de estudo neste trabalho é o coração de um peixe teleósteo, pelo que os outros componentes do sistema circulatório não serão abordados em detalhe.

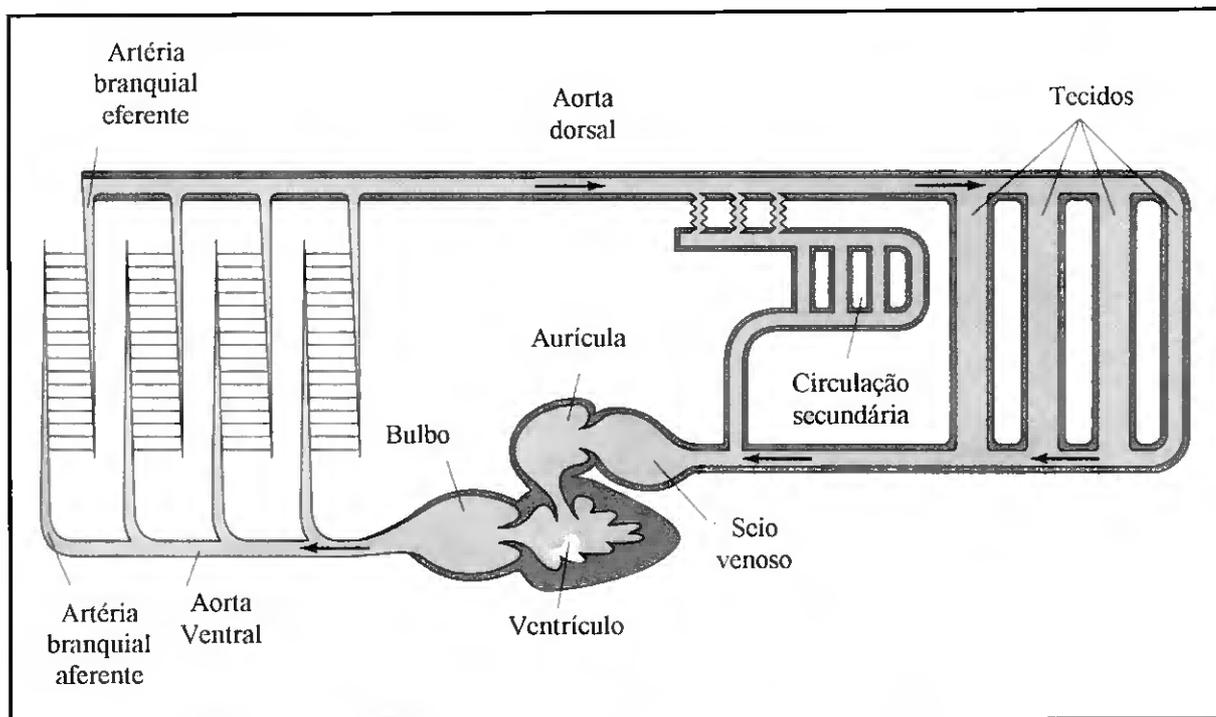


Figura I.2.1 – Esquema geral do sistema circulatório dos peixes teleósteos (adaptado de Randall *et al.*, 1997).

2.2. ANATOMIA E MORFOLOGIA CARDÍACA

O coração dos peixes é um órgão constituído por quatro câmaras em série, contidas no pericárdio. Este coração é normalmente denominado coração venoso, uma vez que, na maioria das espécies, a irrigação do miocárdio é feita a partir do sangue venoso que ocupa o lúmen ventricular e os espaços intertrabeculares (Tota *et al.*, 1983). O sangue é recolhido no seio venoso e é bombeado sequencialmente para a aurícula, ventrículo e bulbo (teleósteos) ou cone arterial (elasmobrânquios).

2.2.1. Seio Venoso

O seio venoso é uma câmara de paredes finas, com 60-90 μm de espessura (Santer, 1985), de pequenas dimensões, constituída por tecido muscular cardíaco e tecido conjuntivo, que recebe o sangue venoso através dos ductos de Cuvier, veias hepáticas e veias jugulares anteriores (Johansen e Gesser, 1986). O seio venoso é o local onde se encontram as células do *pacemaker*, responsável pelo início e controlo do batimento cardíaco (Santer, 1985; Farrell e Jones, 1992; Farrell, 1993; Olson, 1998). No entanto, a contracção do seio venoso parece desempenhar um papel negligenciável no enchimento

auricular devido ao reduzido número de células musculares cardíacas e pela ausência de válvulas que previnam o refluxo de sangue para as veias (Farrell e Jones, 1992).

2.2.2. Aurícula

A aurícula é uma câmara com forma irregular, constituída por paredes finas de tecido muscular cardíaco. Embora sua massa constitua apenas 0,01 a 0,03 % da massa corporal e 8 a 25 % da massa do ventrículo, o volume da aurícula é semelhante ou superior ao do ventrículo (Farrell, 1991). A presença de válvulas nos orifícios seio-auricular e aurículo-ventricular garantem a direcção do fluxo no sentido do ventrículo, durante a contracção auricular.

2.2.3. Ventrículo

O ventrículo único dos peixes é a câmara contráctil por excelência, sendo responsável por gerar a maior parte do trabalho sistólico do coração. A parede ventricular é constituída por três camadas de tecido: epicárdio, que estabelece continuidade com a face do saco pericárdico, sendo constituída por mesotélio suportado por tecido conjuntivo; endocárdio, que reveste a face interna da câmara cardíaca; miocárdio, que constitui a maior porção da estrutura parietal ventricular e é abundante em tecido muscular cardíaco (Hibiya, 1982).

As células musculares cardíacas (miócitos) são uninucleadas, com o núcleo localizado centralmente, e possuem estruturas juncionais complexas. Os miócitos dos peixes apresentam algumas diferenças em relação às dos mamíferos: menor tamanho (1 a 12,5 μm comparativamente a 10 a 25 μm dos mamíferos), desenvolvimento anatómico limitado do retículo sarcoplasmático, arranjo periférico das miofibrilhas e conteúdo variável em mioglobina intracelular (Santer, 1985; Farrell, 1993).

Para além dos miócitos, o miocárdio é constituído por tecido intersticial, que inclui tecido conjuntivo (colagénio), fibroblastos, células nervosas e uma substância amorfa composta por glicoproteínas (Weber, 1989).

A anatomia ventricular nos peixes é muito diversa em vários aspectos, como a forma, a mioarquitectura, a massa ventricular relativa e a irrigação do miocárdio, reflectindo adaptações a diferentes situações ambientais ou a alterações ecofisiológicas, farmacológicas e patológicas temporárias (Santer e Greer-Walker, 1980; Santer *et al.*, 1983; Tota *et al.*, 1983; Emery *et al.*, 1985; Johansen e Gesser, 1986; Sanchez-Quintana e Hurlé, 1987; Farrell, 1991; Harrison *et al.*, 1991; Sanchez-Quintana *et al.*, 1995; Zummo *et al.*, 1995; Tota and Gattuso, 1996).

Forma

Relativamente à forma, Santer (1985) definiu três categorias para o ventrículo dos peixes: (1) **sacular**, de forma arredondada com apex indefinido, típico dos elasmobrânquios e muitos teleósteos marinhos; (2) **tubular**, com secção cilíndrica, típico de peixes de corpo alongado; (3) **piramidal**, com base triangular, típico de espécies de elevada actividade. O significado funcional das diferentes formas ventriculares é pouco claro, embora vários estudos indiquem que o coração piramidal é mais eficiente em termos de geração de pressão cardíaca, razão pela qual esta forma é característica de espécies com elevados requisitos metabólicos (Farrell e Jones, 1992; Farrell, 1996).

Estrutura do miocárdio

Relativamente à estrutura do miocárdio, o ventrículo dos peixes apresenta dois tipos de organização distintas: **tecido esponjoso** (*spongiosa*), constituído por trabéculas organizadas de forma complexa que originam uma rede lacunar na zona luminal da câmara ventricular; **tecido compacto** (*compacta*), que aparece em apenas algumas espécies, como uma camada exterior em relação ao tecido esponjoso (Tota *et al.*, 1983; Tota, 1989; Davie e Farrell, 1991; Harrison *et al.*, 1991; Sanchez-Quintana *et al.*, 1996; Tota e Gattuso, 1996).

Irrigação

A irrigação destes dois tipos de tecido é feita de forma diferente: o miocárdio esponjoso não apresenta irrigação coronária e utiliza exclusivamente a **circulação venosa** para fornecer oxigénio ao tecido miocárdico; o tecido compacto é perfundido com sangue arterial através de **circulação coronária** (Cameron, 1975; Santer e Greer Walker, 1980; Santer *et al.*, 1983; Tota *et al.*, 1983; Emery *et al.*, 1985; Davie e Farrell, 1991; Harrison *et al.*, 1991). A circulação coronária pode ter dois locais de origem: circulação cranial e, em algumas espécies, existe uma circulação caudal adicional. A origem anatómica de ambos os circuitos determina que o sangue oxigenado seja distribuído directamente das brânquias para o coração, a uma pressão sanguínea pós-branquial o mais elevada possível (Farrell, 1993).

Tipos de ventrículo

Tota *et al.* (1983) definiram quatro tipos de ventrículo em peixes (I, II, III e IV), tendo em conta a proporção de tecido compacto / tecido esponjoso e o padrão de

vascularização do miocárdio (Fig. 1.2.2). Estas quatro categorias reflectem uma complexidade crescente no padrão de organização do miocárdio.

O ventrículo **tipo I** apresenta apenas miocárdio do tipo esponjoso. Existem variações do ventrículo tipo I que reflectem diferenças a nível do desenvolvimento vascular, embora não haja capilares no miocárdio em todos os ventrículos deste tipo: o ventrículo sub-tipo Ia é totalmente avascular e o fornecimento de oxigénio é feito apenas a partir do sangue venoso do lúmen e dos espaços intertrabeculares. Os sub-tipos Ib e Ic possuem uma artéria coronária superficial que está confinada ao epicárdio (sub-tipo Ib), ou está ligada directamente aos espaços intertrabeculares (sub-tipo Ic).

Os outros tipos de ventrículo (II, III e IV) apresentam tecido esponjoso e tecido compacto (em diferentes proporções) e apresentam capilares no miocárdio (Tota *et al.*, 1983; Tota, 1989; Davie e Farrell, 1991; Sanchez-Quintana *et al.*, 1996; Tota e Gattuso, 1996). O ventrículo **tipo II** é caracterizado pela presença de capilares da circulação coronária apenas na camada superficial do miocárdio (*compacta*). Os ventrículos **tipo III** e tipo IV são caracterizados por possuírem irrigação coronária que atinge o tecido esponjoso, além do tecido compacto. A diferença entre estes dois tipos de coração baseia-se na percentagem de tecido compacto em relação à massa total do miocárdio: o ventrículo do tipo III apresenta uma composição em tecido compacto inferior a 30%, enquanto o ventrículo com *compacta* superior a 30 %, é denominado **tipo IV**.

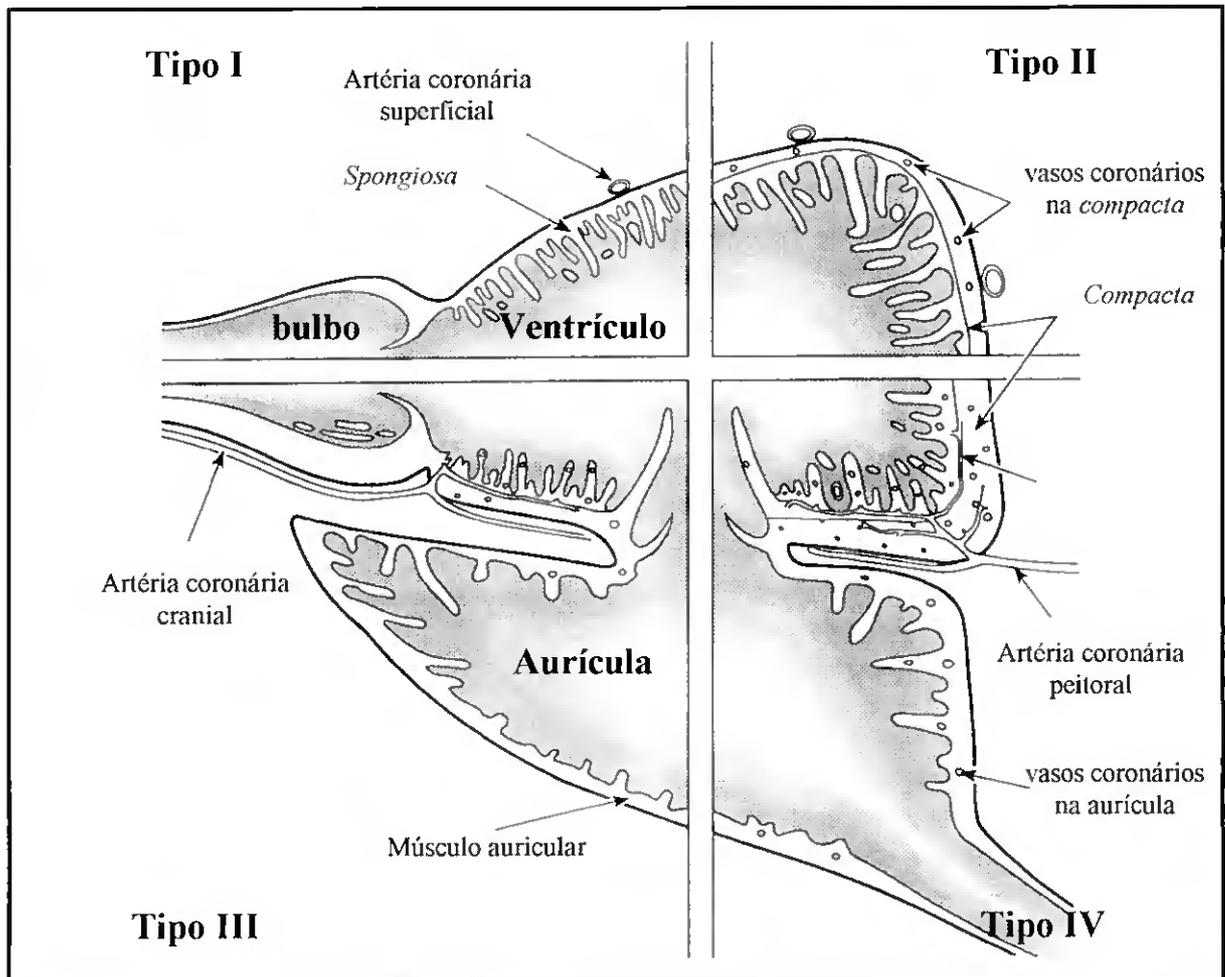


Figura 1.2.2 – Esquema representativo dos diferentes tipos de ventrículo - I, II, III e IV - segundo Tota *et al.* (1983). A estrutura anatômica do coração foi dividida em quatro quadrantes, cada um representando os aspectos particulares de cada tipo.

A maioria dos peixes apresenta ventrículos do tipo I e, dentro deste grupo, a maior parte das espécies possui ventrículos do sub-tipo Ia (Farrell e Jones, 1992). Normalmente os ventrículos do tipo I correspondem a ventrículos saculares e tubulares, com menor eficiência de contração e ocorrem em espécies com baixos requisitos metabólicos. Por outro lado, os restantes tipos, onde ocorre a camada cortical de miocárdio compacto, correspondem normalmente a ventrículos de forma triangular piramidal, com maior eficiência de contração, e aparecem em espécies com elevada actividade: o tipo II é comum na maioria dos teleósteos que possuem compacta; o tipo III é comum na maioria dos elasmobrânquios; o tipo IV é comum nos peixes mais activos, elasmobrânquios e teleósteos endotérmicos (Olson, 1998).

Mioarquitectura

Relativamente à mioarquitectura, Sanchez-Quintana e Hurlle (1987) referiram que o **miocárdio compacto** encontra-se organizado em camadas de feixes de fibras musculares cardíacas com um **arranjo ordenado**. O número destas camadas depende da espessura da parede: espécies com camada *compacta* mais espessa apresentam maior número de camadas de feixes de fibras, possuindo cada uma uma arquitectura diferente. Estudos desenvolvidos por Sanchez-Quintana e Hurlle (1987) demonstraram que as camadas de fibras mais internas apresentam um arranjo circular nos ventrículos saculares dos elasmobrânquios e em forma de rosca no vértice dos ventrículos piramidais dos teleósteos mais activos. A presença destas camadas mais internas de fibras parece ser uma característica das espécies mais activas e proporciona uma vantagem mecânica para o desenvolvimento de pressões sanguíneas mais elevadas. Em relação ao **miocárdio esponjoso**, Sanchez-Quintana e Hurlle (1987) e Harrison *et al.* (1991) referiram que este apresenta um **arranjo aleatório**, excepto junto ao orifício bulbo-ventricular, onde as fibras se organizam longitudinalmente. Estas diferenças de arranjos das fibras musculares reflectem-se na eficiência da contracção muscular: Davic e Farrell (1991) sugeriram que o aumento da eficiência de contracção ventricular está relacionada com o crescente arranjo ordenado das fibras do miocárdio, o que significa que espécies que possuem maior proporção de tecido compacto possuem igualmente ventrículos mais eficientes.

Massa ventricular relativa

A importância da estrutura ventricular para o desempenho funcional do ventrículo está também associado à sua massa relativa. A massa ventricular relativa (MVR - massa do ventrículo/massa corporal) nos peixes varia consideravelmente, entre 0,04 (espécies pouco activas) a 0,2 % (espécies de elevada actividade). Vários estudos demonstraram que uma MVR elevada corresponde a uma maior eficiência funcional do coração, uma vez que as espécies de elevada actividade possuem MVR elevada (Farrell *et al.*, 1988; Farrell e Jones, 1992; Farrell, 1993).

Têm sido realizados vários estudos em relação à massa ventricular relativa em diversos peixes, que permitem estabelecer várias comparações: os teleósteos activos geralmente apresentam MVR superior aos elasmobrânquios activos (Poupa e Lindstrom, 1983); os elasmobrânquios bentónicos apresentam MVR superior à dos teleósteos bentónicos (Poupa e Lindstrom, 1983); os elasmobrânquios endotérmicos possuem ventrículos maiores que os elasmobrânquios ectotérmicos (Emery *et al.*, 1985); espécies do

Antártico possuem MVR elevada, que é três vezes superior em espécies sem hemoglobina (Harrison *et al.*, 1991; Zummo *et al.*, 1995).

Tal como em relação aos factores referidos anteriormente, estes aspectos revelam que a MVR parece estar relacionada com factores ecofisiológicos, sendo uma MVR elevada importante para o desenvolvimento de pressões elevadas nos peixes activos, para compensar o efeito inotrópico negativo provocado por temperaturas baixas e para permitir um volume de ejeção elevado (Farrell e Jones, 1992; Farrell, 1993).

Tendo em conta os vários aspectos referidos, conclui-se que os peixes são o grupo dentro dos vertebrados que apresenta uma maior diversidade a nível da câmara ventricular, que está relacionada com fenómenos de adaptação ecofisiológica: as espécies mais activas apresentam corações de forma piramidal com grande volume (MVR elevada), com miocárdio misto e uma percentagem de tecido compacto elevada, irrigado por circulação arterial (coronárias); as espécies de baixa actividade possuem corações saculares ou tubulares, com baixa MVR, com miocárdio exclusivamente esponjoso, irrigado pela circulação venosa.

2.2.4. Bulbo arterial

A quarta câmara cardíaca é uma câmara cilíndrica ou em forma de “pêra” localizada entre o ventrículo e a aorta ventral. Nos teleósteos esta câmara é constituída por fibras elásticas e tecido muscular liso e denomina-se **bulbo arterial** (Satchell, 1991). O bulbo recebe o sangue venoso bombeado pelo ventrículo através duma válvula semilunar e envia-o à aorta ventral, não havendo qualquer sistema valvular que impeça o refluxo de sangue durante a diástole ventricular (Farrell e Jones, 1992).

Nos elasmobrânquios, a quarta câmara cardíaca denomina-se **cone arterial** e é constituída por tecido muscular cardíaco, além de fibras elásticas, o que faz com que esta câmara seja ritmicamente contráctil. Além disto, o cone arterial pode apresentar várias válvulas organizadas em filas, que impedem o refluxo de sangue. A contracção do cone parece servir como bomba de ejeção auxiliar para prolongar o fluxo de sangue para a aorta ventral (Farrell, 1993).

No bulbo dos teleósteos não há válvulas mas a sua grande elasticidade permite prolongar o débito cardíaco ao longo da diástole ventricular, prevenindo o refluxo na aorta ventral e uma possível perda de eficiência nas trocas gasosas a nível branquial (Johansen e Gesser, 1986).

2.3. CICLO CARDÍACO

O ciclo cardíaco é caracterizado por uma série de eventos eléctricos correlacionados com eventos mecânicos, que consistem em contracções isométricas e isotónicas (sístole) e relaxamentos (diástole) sincronizados das várias câmaras cardíacas (Farrell e Jones, 1992).

Nos peixes, o ciclo cardíaco e os processos hemodinâmicos apresentam especializações em relação aos outros vertebrados, que parecem estar relacionadas primeiramente com a organização em série das quatro câmaras cardíacas, bem como com outros aspectos morfológicos específicos dos peixes: possuem um bulbo elástico (telcósteos) ou um cone contráctil (elasmobrânquios) que regula o fluxo de sangue à saída do coração; apresentam uma aorta ventral curta que liga o coração à superfície respiratória; possuem um pericárdio rígido ou semi-rígido, com um papel importante no enchimento cardíaco e um seio venoso como câmara distinta, onde se inicia o batimento cardíaco (Johansen e Gesser, 1986; Farrell e Jones, 1992; Olson, 1998).

Relativamente aos fenómenos hemodinâmicos que ocorrem durante o ciclo cardíaco, até aos anos 90 considerava-se que o coração funcionava como quatro bombas em série: a contracção do seio venoso era responsável pelo enchimento da aurícula; a contracção da aurícula era o único determinante para o enchimento do ventrículo (Johansen e Gesser, 1986). Estudos mais recentes vieram por em causa estes princípios, demonstrando que o papel do seio venoso no enchimento da aurícula é muito limitado (Olson, 1998) e que o enchimento ventricular é bifásico, tal como se verifica nos mamíferos (Coucelo *et al.*, 1996; Lai *et al.*, 1996, 1998). Como tal, os mecanismos gerais para a hemodinâmica cardíaca nos peixes não se encontram completamente compreendidos.

Os processos eléctricos do músculo cardíaco, ondas de despolarização e repolarização, podem ser registados num electrocardiograma (ECG). A terminologia utilizada no electrocardiograma dos peixes é a mesma que para os mamíferos. O ECG é constituído pela onda P, que corresponde à contracção (despolarização) da aurícula, pelo complexo QRS, indicando a contracção (despolarização) do ventrículo, e pela onda T, que representa o relaxamento (repolarização) ventricular. O registo electrocardiográfico dos peixes é bastante semelhante ao ECG dos mamíferos havendo, no entanto, diferenças importantes relacionadas com diferenças morfológicas e hemodinâmicas. Nos elasmobrânquios pode ainda ser registada a onda B, no intervalo S-T, que é produzida pela despolarização do músculo cardíaco do cone arterial (Satchell, 1971). Em espécies em que

o seio venoso é mais musculado, a sua contracção produz a onda V, no intervalo T-P, e foi registada para enguias e lampreias (Davic *et al.*, 1987; Farrell e Jones, 1992).

2.4. FUNÇÃO CARDÍACA

2.4.1. Débito cardíaco

O estudo da função cardíaca nos peixes tem sido feita principalmente com base na avaliação do débito cardíaco (DC), ou seja, do volume de sangue que o ventrículo bombeia, por unidade de tempo. Nos peixes, o DC apresenta variações apreciáveis entre espécies: em espécies sedentárias o DC apresenta valores muito reduzidos, entre 10 a 20 ml/min/kg, enquanto peixes activos, como os atuns, ou espécies com ventrículos de grande tamanho, como os peixes do antártico, apresentam DCs elevados, entre 100 e 300 ml/min/kg (Farrell e Jones, 1992; Tota e Gattuso, 1996). Este parâmetro pode ser calculado através do produto do volume de ejeção (VE) e da frequência cardíaca (FC) e, como tal, a sua regulação é obtida por alterações na FC e no VE, que são controlados por mecanismos intrínsecos, neuronais e hormonais.

A FC é estabelecida pelas células do *pacemaker* e é regulada primariamente pelo *tonus* simpático e parasimpático (ver secção 2.4.2). O volume de ejeção varia inversamente com a pressão arterial e directamente com o volume ventricular telediastólico (no fim da diástole) e com a contractilidade (ver secção 2.4.3) (Fig. 1.2.3).

Farrell (1991) referiu que, para os peixes, o principal factor que contribui para o aumento do DC é o aumento do VE, ao contrário de outros vertebrados, onde o principal factor que provoca este aumento é a FC. No entanto, esta regra parece ser restrita às espécies de águas temperadas, uma vez que peixes do Antártico e atuns tropicais revelam um aumento da FC em vez do aumento do VE, durante o exercício.

Ao longo das últimas duas décadas, muitos estudos foram desenvolvidos para caracterizar a regulação da função cardíaca nos peixes, nomeadamente através da determinação do DC, em diferentes espécies e diferentes condições experimentais. O princípio de Fick tem sido utilizado para calcular o DC de forma indirecta, com base no consumo de oxigénio. No entanto, vários trabalhos apontam para que a aplicação deste princípio aos peixes não seja fiável, uma vez que os erros introduzidos pelo método podem alterar significativamente o cálculo do DC (Randall, 1985; Farrell, 1991; Farrell e Jones, 1992). Como tal, a aplicação de sondas Doppler tem sido recomendada em alternativa para

a determinação de parâmetros de funcionais, como o VE e o DC, uma vez que permitem determinações directas destes parâmetros. Este método foi aplicado para estudar uma diversidade de espécies com diferentes características ecofisiológicas e numa variedade de condições ambientais e experimentais.

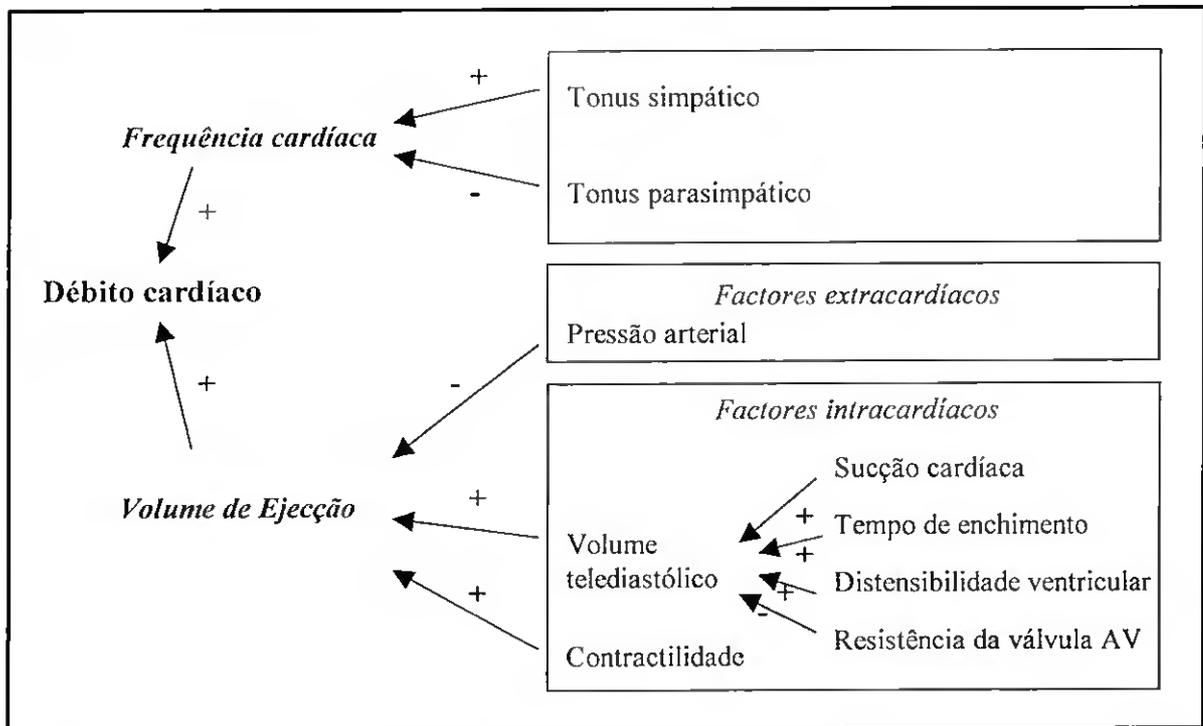


Figura 1.2.3 – Esquema dos factores que controlam o débito cardíaco nos peixes: “+” representa relações directas; “-” representa relações inversas (adaptado de Olson, 1998).

Vários estudos demonstraram que o DC nos peixes é influenciado por vários factores externos, como a actividade, a temperatura e a disponibilidade de oxigénio. Geralmente, os peixes com actividade elevada têm um DC de repouso mais elevado do que as espécies com baixa actividade (Farrell e Jones, 1992). Nestes animais, o exercício anaeróbio é acompanhado geralmente de um decréscimo da FC, do DC e da pressão arterial. Durante a recuperação do exercício, verifica-se o aumento destes parâmetros, até aos valores normais de repouso. A resposta à natação prolongada (exercício aeróbio) é distinta, verificando-se um aumento da ventilação e do DC, entre 40 e 300% (excepto nos ciclóstomos, Davie e Forster, 1980), para fazer face às necessidades metabólicas do músculo esquelético.

As variações de temperatura têm um efeito significativo no DC. Na maioria dos peixes, uma diminuição da temperatura externa é acompanhada por um decréscimo da

actividade metabólica e, conseqüentemente, do DC (Olson, 1998). Por outro lado, em espécies não polares, a diminuição da temperatura induz o aumento do tamanho do ventrículo, como resposta adaptativa ao frio, levando ao aumento do VE e à diminuição da FC (Driedzic *et al.*, 1996). As espécies polares possuem um DC similar às espécies de águas temperadas, por possuírem ventrículos maiores (VE elevados), mas a sua FC é normalmente bastante reduzida (10-11 bpm, Axelsson *et al.*, 1992).

O estudo do efeito da hipóxia ambiental na função cardíaca tem sido avaliado experimentalmente através da diminuição da pressão de oxigénio (PO_2) para 30 a 50 mmHg. Estes estudos demonstraram que esta diminuição acentuada na PO_2 provoca normalmente uma diminuição na FC (bradicárdia), mediada colinergicamente e, conseqüentemente, uma diminuição do débito cardíaco em várias espécies, sendo os ciclóstomos a única excepção conhecida (Axelson *et al.*, 1990; Forster *et al.*, 1991; Farrell e Jones, 1992; Claireaux *et al.*, 1995; Agnisola *et al.*, 1996). Por outro lado, em águas ligeiramente hipóxicas, os peixes geralmente mantêm o DC constante, ao compensarem a bradicárdia com um aumento do VE. As espécies mais activas (ex.: atuns) são especialmente sensíveis à hipóxia, ocorrendo uma diminuição do débito cardíaco, pois verifica-se bradicárdia sem o aumento correspondente do VE.

2.4.3. Volume de ejeção

O volume de ejeção do ventrículo, volume bombeado em cada ciclo cardíaco, é estabelecido pela diferença entre o volume telediastólico (VTD) e o volume telesistólico (VTS). O VTD é determinado pelo volume de sangue que provém da aurícula, pelo volume do ventrículo e pela sua distensibilidade. O VTS é determinado primeiramente pela sua força de contracção (contractilidade, pressão gerada pela contracção ventricular) e também pela pressão sanguínea na aorta ventral (região à saída do ventrículo) durante a diástole. O aumento da pressão arterial aumenta o VTD e o VTS.

Nos peixes, ao contrário dos mamíferos, o VTS ventricular normalmente aproxima-se de zero, de tal modo que as variações do VE dependem essencialmente de variações no VTD (Farrell, 1993).

Volume telediastólico

De acordo com o mecanismo de Frank-Starling, o aumento do VTD (ou da pressão de enchimento do ventrículo) induz um aumento no VE (ou do trabalho mecânico do coração). Os estudos desenvolvidos até ao momento, para avaliar os determinantes do

VTD, demonstraram que este depende essencialmente da pressão de enchimento (pressão venosa + pressão da contracção auricular + sucção ventricular), do tempo de enchimento (dependente da FC), da distensibilidade ventricular e da resistência para o enchimento, oferecida pela válvula aurículo-ventricular.

Enchimento cardíaco

A pressão para o enchimento cardíaco tem sido atribuída a duas fontes: 1) energia transmitida ao sistema arterial e deste para a circulação venosa, pela contracção ventricular - enchimento *vis-a-tergo* (força de trás) e 2) energia gerada pela contracção do ventrículo que baixa a pressão pericárdica e distende a aurícula, seio venoso e veias no saco pericárdico (sucção cardíaca) - enchimento *vis-a-fronte* (força da frente). Farrell e Jones (1992) referiram que destes dois mecanismos, o *vis-a-tergo* é provavelmente utilizado pelos ciclóstomos e pela maioria dos teleósteos, enquanto os elasmobrânquios e os teleósteos activos utilizam os dois mecanismos de enchimento.

Tradicionalmente, considerava-se que o enchimento do ventrículo nos peixes era diferente dos mamíferos, sendo a contracção da aurícula o principal (senão único) determinante do enchimento ventricular (Farrell e Jones, 1992; Farrell, 1993). Estudos mais recentes (Coucelo *et al.*, 1996; Lai *et al.*, 1996 e 1998) demonstraram, que o enchimento ventricular é bifásico, tanto em teleósteos (com diferentes morfologias ventriculares) como elasmobrânquios, tal como nos mamíferos. No entanto, os mecanismos que regulam o enchimento auricular e, conseqüentemente, o enchimento ventricular, não estão ainda completamente compreendidos.

Tempo de enchimento

Olson (1998) referiu que nos peixes onde a sucção cardíaca é importante (peixes activos), a maior parte do enchimento seio-auricular ocorre durante a contracção ventricular e o enchimento ventricular ocorre após a contracção auricular. Por outro lado, em peixes em que enchimento *vis-a-tergo* não se verifica, o enchimento ventricular poderá ocorrer durante toda a diástole. No entanto, estas considerações não foram ainda confirmadas com estudos *in vivo*. Tendo em conta que a maioria dos peixes apresenta FCs relativamente baixas, o tempo de enchimento provavelmente só constituirá um factor limitante para o VTD em espécies com actividade elevada, como os grandes pelágicos.

Distensibilidade ventricular

Os factores que regulam a distensibilidade ventricular tem merecido pouca atenção, de tal modo que muito pouco se sabe sobre este assunto. Forster (observações não publicadas *in Farrell, 1991*) verificou que a distensibilidade ventricular diminui com o aumento do volume, o que também se observa nos vasos (Conklin e Olson, 1994a). Comparativamente com a aurícula, o ventrículo apresenta uma distensibilidade baixa, que tem sido atribuída às suas propriedades elásticas.

Contractilidade

A contractilidade, uma expressão do vigor de contracção, é definida como a alteração da força desenvolvida no comprimento de uma fibra cardíaca em repouso. Esta grandeza é normalmente medida *in vitro* pelo pico de tensão isométrica desenvolvida no comprimento fixo inicial de uma fibra. Pode também ser medida indirectamente *in vivo* pelo dP/dt ventricular, durante a fase isovolumica do ciclo cardíaco (contracção isométrica).

A força com que o ventrículo contrai é o principal factor que determina o VTS. A força de contracção aumenta proporcionalmente com o comprimento das fibras musculares cardíacas - mecanismo de Frank-Starling. Este mecanismo refere-se a uma propriedade intrínseca do músculo cardíaco e, por isso, aplica-se tanto ao ventrículo como à aurícula. Um aumento do VTD resulta num aumento da força de contracção e do VE.

A contractilidade é modelada por via neuronal (fibras nervosas vagais e adrenérgicas), hormonal e local. Farrel e Jones (1992) referiram uma série de factores que alteram a contractilidade da aurícula e do ventrículo, em peixes. Os factores que têm um efeito inotrópico positivo são: aumento da temperatura; estimulação β -adrenérgica; Ca^{2+} extracelular e os péptidos arginina, vasotocina, oxitocina, adenosina, prostaciclina e histamina. Os factores que têm efeito inotrópico negativo são: hipóxia, acidose, acetilcolina, estimulação α -adrenérgica, agentes purinérgicos e a adrenalina em combinação com a adenosina.

Apesar do efeito destes agentes ser o mesmo ao nível da aurícula e ventrículo, é importante ter em conta que a sensibilidade destas duas câmaras aos agentes inotrópicos pode ser bastante diferente (Farrell, 1984; Farrell, 1993).

A contractilidade *in vitro* depende também da duração dos períodos de contracção e relaxamento e da sua intensidade (taxa de contracção) (Farrell e Jones, 1992).

Pressão arterial

Uma das propriedades intrínsecas do músculo cardíaco dos peixes é sua habilidade de manter o VE constante numa vasta gama de valores da pressão arterial (medida na região à saída do coração, aorta ventral - P_{av}) (Farrell, 1984). No entanto, a partir dum valor crítico de P_{av} , usualmente mais de duas vezes superior à P_{av} de repouso, o VE diminui com o aumento da pressão, uma vez que a resistência nesta região aumenta consideravelmente.

2.4.3. Frequência cardíaca

A frequência cardíaca *in vivo* é determinada pelo ritmo intrínseco do *pacemaker* e é controlada por factores neuronais (fibras colinérgicas e adrenérgicas) e hormonais; a estimulação adrenérgica do coração geralmente aumenta a FC, enquanto a estimulação colinérgica tem um efeito inibitório. Assim, na maioria dos peixes, a FC basal é determinada pelo nível relativo do *tonus* adrenérgico e colinérgico do coração (Farrell, 1991). Por outro lado, a FC máxima é normalmente obtida inibindo os receptores colinérgicos e maximizando a excitação adrenérgica.

O controlo colinérgico da frequência cardíaca é efectuado através das fibras colinérgicas do nervo vago, que são responsáveis pela bradicárdia através do estímulo dos receptores muscarínicos das células do *pacemaker*. Na maioria dos peixes, o *tonus* colinérgico de repouso aumenta durante a exposição à hipóxia ambiental, no início do exercício anaeróbio e em presença de estímulos visuais ou olfactivos (Farrell, 1993).

A maioria dos peixes apresenta um coração com receptores β -adrenérgicos que, quando estimulados, produzem cronotropia positiva a nível do *pacemaker* e na condução aurícula-ventrículo (Farrell, 1984; Farrell e Jones, 1992; Farrell, 1993). Além disto, algumas espécies possuem receptores α -adrenérgicos que produzem cronotropia negativa. Nas espécies que possuem os dois tipos de receptores, o efeito da estimulação adrenérgica reflecte a composição relativa destes receptores na membrana e a taxa relativa de adrenalina e noradrenalina (Farrell, 1993). Nos peixes, ao contrário dos mamíferos, a adrenalina tem um efeito estimulante mais potente ao nível dos receptores β enquanto a noradrenalina estimula principalmente os receptores α (Farrell e Jones, 1992).

No geral, a FC *in vivo* é inferior nos ciclóstomos (22 a 27 bpm, *Myxime glutinosa*, Satchell, 1986; Axelsson *et al.*, 1990), superior nos elasmobrânquios e máxima nos teleósteos. Além disso, dentro de cada grupo filogenético, são geralmente peixes mais

activos que têm uma FC intrínseca mais elevada (Farrell e Jones, 1992). Os peixes do antártico são as espécies que apresentam a FC mais baixa (10-11 bmp), devido a um *tonus* vagal elevado, uma vez que a sua FC intrínseca é comparável aos outros teleósteos (Axelsson *et al.*, 1992). Geralmente, a FC máxima nos peixes não excede 120 bpm (Farrell, 1991). Os atuns constituem uma excepção, atingindo FC de 180 a 240 bpm.

Trabalhos efectuados com uma variedade de espécies demonstraram que a FC sofre alterações significativas quando ocorrem alterações na temperatura da água, durante o exercício aeróbio e anaeróbio e na presença de hipóxia ambiental.

3. ECOCARDIOGRAFIA

3.1. DESENVOLVIMENTO DA ECOCARDIOGRAFIA

A ecocardiografia é uma técnica não-invasiva que utiliza ultra-sons de elevada frequência para avaliar o estado estrutural, funcional e hemodinâmico do sistema cardiovascular. As grandes vantagens que derivam do carácter não invasivo desta técnica e os enormes avanços técnicos realizados nas últimas três décadas, fazem com que, hoje em dia, a ecocardiografia seja amplamente utilizada na prática clínica em cardiologia, bem como na investigação de doenças cardiovasculares.

A ultrasonografia aplicada ao coração deu os primeiros passos com Edler e Hertz (1954), que registaram pela primeira vez movimentos da válvula mitral por ecocardiografia. Posteriormente, Joyner e Reid (1963) foram responsáveis pela primeira análise ultrasonográfica do coração e Feigenbaum *et al.* (1965) introduziram os ultra-sons na prática clínica em cardiologia. Estes autores utilizavam a ecocardiografia em modo-M (MM), que apenas permitia visualizar os movimentos do coração numa linha de incidência do feixe de ultra-sons sendo, portanto, bastante limitada para uma análise global da dinâmica cardíaca. Nos anos 70 foi desenvolvida a ecocardiografia bidimensional (2D), que possibilitou a obtenção de imagens 2D de vários planos tomográficos das câmaras cardíacas em tempo real, abrindo caminho para o estudo não-invasivo da morfologia e função cardíaca (Feigenbaum, 1981).

A ecocardiografia 2D era essencialmente uma técnica de imagem que possibilitava visualizar as estruturas mas não permitia obter dados hemodinâmicos. O desenvolvimento da ecocardiografia Doppler, que também foi introduzida na prática clínica durante os anos 70, aumentou grandemente as potencialidades desta técnica, uma vez que, pela primeira vez, foi possível quantificar a velocidade de fluxos sanguíneos e determinar gradientes de pressão através de orifícios valvulares de forma não-invasiva (Holen *et al.*, 1976).

No início dos anos 80, com base no conceito Doppler, desenvolveu-se o Doppler-cor que permitiu, através de um código de cores associado à velocidade dos fluxos, visualizar os fluxos sanguíneos e a sua direcção, em conjunto com as imagens 2D (Omoto *et al.*, 1984).

Com base nas técnicas referidas, MM, 2D, Doppler pulsado e Doppler-cor, têm sido desenvolvidas várias aplicações no sentido de utilizar a ecocardiografia nas mais diversas áreas de diagnóstico e investigação em cardiologia: a ecocardiografia transesofágica, de stresse, de contraste, intravascular, intracardiaca, tecidual e tridimensional, são algumas das áreas de desenvolvimento desta técnica e exemplo da vasta aplicação que a ecocardiografia apresenta actualmente.

3.2. ECOCARDIOGRAFIA – PRINCÍPIOS E INSTRUMENTAÇÃO

A ecocardiografia baseia-se nos princípios teóricos da condução de ondas sonoras em meios de diferentes condutâncias acústicas. Os equipamentos de imagem ecocardiográfica, ecógrafos, utilizam para construção da imagem a reflexão do som produzida por descontinuidades da condutância acústica dos tecidos biológicos, como por exemplo, a descontinuidade entre uma parede e uma cavidade ventricular (Saini *et al.*, 1993, Oh *et al.*, 1994; Azpilicueta e Garcia-Fernandez, 1995).

3.2.1. Propriedades dos ultra-sons

Os ultra-sons são ondas mecânicas de frequência superior à dos sons audíveis. A frequência dos ultra-sons utilizados actualmente em ecocardiografia varia de 2 a 15 MHz. Os ultra-sons propagam-se em linha recta, durante uma curta distância, enquanto não sofrem reflexão, refacção e dispersão. Além disto, são parcialmente absorvidos pelos meios que atravessam, originando calor (Saini *et al.*, 1993).

A utilização de ultra-sons em ecocardiografia baseia-se no seu poder de penetrar os tecidos - penetração - e na sua capacidade de distinguir dois objectos que estão espacialmente muito próximos - resolução. Os ultra-sons de elevada frequência têm uma melhor resolução e uma penetração mais fraca que as ondas de baixa frequência (Oh *et al.*, 1994).

A penetração dos ultra-sons depende da frequência usada e das propriedades do meio atravessado. A penetração é inversamente proporcional à frequência, uma vez que frequências mais elevadas sofrem maior reflexão e absorção e, como correspondem a menores comprimentos de onda, reflectem-se e refractam-se em estruturas de menores dimensões. Este facto faz com que a quantidade de energia que continua a propagar-se, em linha recta e na direcção pretendida, se atenua mais rapidamente (Saini *et al.*, 1993).



A potência instantânea e a frequência normalmente utilizadas em ecocardiografia determinam penetrações na ordem de 4 a 25 cm, o que está perfeitamente adequado ao estudo do coração de diferentes espécies. Na prática, utilizam-se frequências mais baixas (ex.: 3 MHz) para fazer uma avaliação global das estruturas cardíacas e frequências mais elevadas (15 MHz) no estudo de estruturas e fluxos vasculares.

As propriedades acústicas dos meios atravessados pelos ultra-sons são um importante factor a ter em conta na aplicação da ultrasonografia ao estudo dos diversos tecidos. As estruturas ósseas absorvem fortemente os ultra-sons impedindo a sua penetração, pelo que as regiões que estiverem atrás dessas estruturas não são visíveis por ultrasonografia. Além disso, os ultra-sons propagam-se muito dificilmente em meios gasosos, tornando difíceis as observações de órgãos situados atrás de zonas com ar, como por exemplo os pulmões. Esta propriedade obriga ainda à utilização de um gel para melhorar o contacto entre o transdutor e a superfície do corpo e melhorar a propagação dos ultra-sons até às estruturas de interesse (Oliveira, 1988).

3.2.2. Transdutores

Em ecocardiografia, os ultra-sons são gerados e recebidos com o auxílio de transdutores piezoeléctricos, construídos actualmente a partir de cerâmicas sintéticas, concebidas especialmente para esse fim. Os elementos piezoeléctricos vibram muito rapidamente e quando activados por um sinal eléctrico emitem ondas sonoras. O ultra-som emitido propaga-se no meio obedecendo às leis da física, semelhantes às da luz. Estas ondas propagam-se, em cada ciclo, a uma distância igual à do comprimento de onda e não acarretam transporte de meio de propagação mas unicamente de energia (Saini *et al.*, 1993).

Quando o ultra-som atinge um objecto ou um meio, com diferentes propriedades acústicas, é reflectido para o transdutor. O elemento piezoeléctrico do transdutor, além de converter energia eléctrica em impulsos ultra-sónicos, converte também o sinal ultra-sónico recebido em energia eléctrica. Isto significa que, quando o ultra-som reflectido atinge o elemento piezoeléctrico da sonda, gera-se um sinal eléctrico. Tendo em conta o período de tempo que decorre desde que o ultra-som é emitido até que é de novo recebido no transdutor e a velocidade do som através do meio, é possível calcular a distância entre o transdutor e o objecto reflectido. Diferentes objectos, a diferentes distâncias à passagem do feixe de ultra-sons, reflectem ultra-sons que atingem o transdutor em diferentes intervalos de tempo.

3.3. ECOCARDIOGRAFIA BIDIMENSIONAL E MODO-M

Todos os ecocardiogramas se desenvolveram a partir do modo-A (de *Amplitude*) (Fig. I.3.1). Neste modo, os ecos são recebidos num osciloscópio e podem ser interpretados através de dois eixos, que medem a amplitude e a distância ao transdutor. O ecocardiograma em modo-B (de *Brightness*) é obtido a partir do modo-A, modulando a intensidade dos pontos luminosos que descrevem a imagem do osciloscópio, proporcionalmente às amplitudes dos ecos recebidos (Fig. I.3.1).

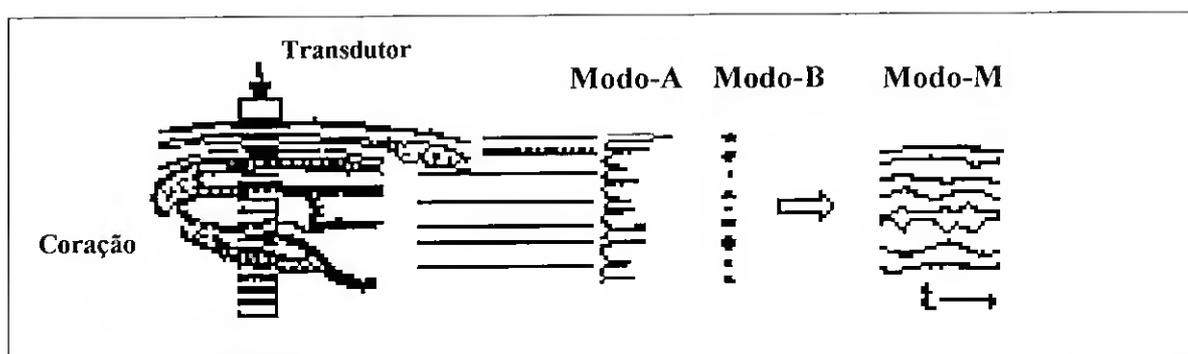


Figura I.3.1 - Esquema representativo de vários tipos de ecocardiogramas: modo-A, modo-B e modo-M. Os três modos estão representados num sistema de eixos "xyz": no modo-A, "x" mede a amplitude e "y" a distância; no modo-B, "y" mede a distância e "z", através de modulação de intensidade, representa a amplitude; o modo-M obtém-se do modo-B, adicionando-lhe um eixo de tempo (eixo "x") (adaptado de Oliveira, 1988).

A inexpressividade e a dificuldade de interpretação dos ecocardiogramas modo-A e modo-B levou ao desenvolvimento do modo-M (de *Motion*) (Fig. I.3.1). A ecocardiografia em modo-M (MM) é gerada a partir do modo-B, ao qual se associa um eixo de tempo. O MM tem como principal limitação, quando comparada com métodos 2D, o facto de, para uma dada posição do transdutor, apenas permitir visualizar estruturas ao longo de uma linha. As grandes vantagens da ecocardiografia MM decorrem da expressividade com que é possível visualizar a evolução das estruturas ao longo de vários ciclos cardíacos e da elevada taxa de amostragem com que se obtêm os registos (Oliveira, 1988). A ecocardiografia em MM foi o primeiro método a obter informações morfométricas do coração (Feigenbaum *et al.*, 1965).

A ecocardiografia 2D surgiu como resultado de um conjunto de ecos em múltiplos planos de um sector e fornece, em tempo real, imagens com elevada definição das câmaras

cardíacas e dos seus movimentos, com informação detalhada da anatomia e fisiologia do coração. Assim, a ecocardiografia 2D é a base do estudo morfológico e funcional do coração e fornece dados quantitativos relativamente às dimensões lineares, área e volumes das câmaras cardíacas. Além disso, as imagens de ecocardiografia 2D também são a base para os registos dos fluxos sanguíneos por Doppler espectral e Doppler-cor.

Desde que surgiu a ecocardiografia 2D, as imagens do MM são obtidas através da selecção de um plano, nas imagens 2D, que intersecta as estruturas cardíacas na zona que se pretende analisar em detalhe. A ecocardiografia em MM complementa a informação fornecida pelas imagens 2D, registando movimentos detalhados das estruturas cardíacas.

3.4. ECOCARDIOGRAFIA DOPPLER

As técnicas de ecocardiografia MM e 2D não permitem a quantificação de fluxos sanguíneos directamente, pelo que outra técnica foi criada e desenvolvida nas três últimas décadas - a ecocardiografia Doppler. Esta técnica consiste na aplicação do efeito de Doppler à ecocardiografia 2D e permite determinar a velocidade absoluta e o perfil da velocidade do fluxo sanguíneo em diferentes pontos do coração e vasos, com elevada resolução temporal (Baker, 1970; Hatler e Angelson, 1982). A técnica da ecocardiografia Doppler permite obter informações fisiológicas directas sobre o carácter laminar ou turbulento e sobre a direcção dos fluxos sanguíneos. Além disto, a ecocardiografia Doppler permite realizar um estudo hemodinâmico não-invasivo através da medição de gradientes de pressão, áreas das válvulas e pressões intracardíacas.

O efeito Doppler descreve a variação da frequência que ocorre entre um feixe de ondas ultra-sónicas emitido e recebido, após ser reflectido por uma superfície que se move, neste caso os eritrócitos. A variação da frequência dos ultra-sons contém informação acerca da velocidade das células sanguíneas que se deslocam no sangue. Na prática clínica, um cristal piezoeléctrico emite ultra-sons que sofrem variação de frequência ao embaterem nos eritrócitos em suspensão no sangue. Esta variação de frequência é detectada pelo transdutor (Hatle e Angelson, 1982; Saini *et al.*, 1993; Oh *et al.*, 1994).

O efeito de Doppler consiste na variação de frequência, ΔF , que se verifica quando o som que é emitido por uma fonte com frequência F_e e que é propagado num meio com velocidade c (para o sangue é aproximadamente 1560 m/s), embate num receptor que se move a uma velocidade v e cuja direcção de deslocamento faz um ângulo θ com a direcção

do feixe emitido, sendo retransmitido de volta, a uma frequência diferente, Fr . O desvio, ΔF (variação da frequência do som) é calculado pela equação:

$$\Delta F = Fr - Fe = 2 Fe \cdot v \cdot \cos \theta / c \quad [I.3.1]$$

A partir da equação indicada é possível determinar a velocidade do fluxo sanguíneo (Fig. I.3.2):

$$v = (\Delta F \cdot c) / (2 Fe \cdot \cos \theta) \quad [I.3.2]$$

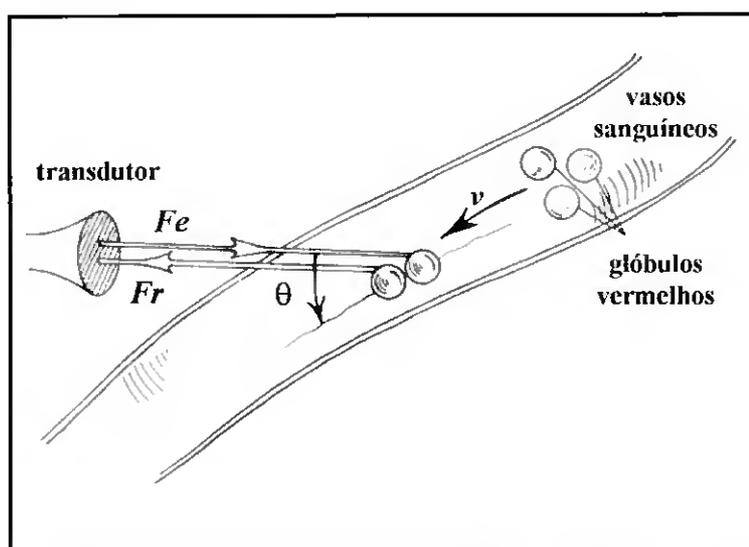


Figura I.3.2 - Esquema representativo do efeito Doppler (adaptado de Oh *et al.*, 1994): Fe , frequência dos ultra-sons emitidos; Fr , frequência dos ultra-sons reflectidos; v , velocidade das células sanguíneas (GV); θ , ângulo entre a direcção do feixe emitido e a direcção do deslocamento dos GV. A variação de frequência (ΔF) e a v , são calculados de acordo com as equações 1.3.1 e 1.3.2, respectivamente.

Da análise da equação apresentada, conclui-se que o ângulo de incidência do feixe Doppler na direcção do fluxo deve ser próximo de zero, para que o $\cos \theta$ seja aproximadamente 1 e nunca superior a 20° , para evitar subestimar a velocidade medida (Saini *et al.*, 1993; Oh *et al.*, 1994). Se o fluxo for perpendicular ao feixe Doppler não será registado, uma vez que o \cos de 90° é zero.

Os modos de ecocardiografia Doppler espectral mais comuns são o Doppler pulsado e Doppler contínuo. No modo pulsado um único cristal emite e recebe os ultra-sons (Oh *et al.*, 1994). O cristal emite um breve feixe de ultra-sons a determinada

frequência, frequência de repetição pulsada. A variação de frequência máxima que pode ser determinada, frequência de Nyquist, é então metade da frequência emitida.

As velocidades dos fluxos obtidas por doppler pulsado são representadas no eixo “y” dum espectro e o tempo no eixo “x”. Qualquer sinal registado acima da linha base do espectro significa que o fluxo se aproxima do transdutor. Pelo contrário, qualquer sinal registado abaixo da mesma linha significa que o fluxo se afasta do transdutor. Se a variação de frequência registada for superior à frequência de Nyquist, ocorrem ecos fantasma (*aliasing*), ao quais são registados no lado oposto da linha de base.

Neste modo, uma amostra de volume é posicionada numa zona escolhida da imagem 2D e permite determinar a velocidade instantânea do fluxo nesse local, bem como visualizar o espectro da velocidade do fluxo ao longo do tempo. Além disto, esta técnica permite escolher o local exacto nas estruturas anatómicas onde se pretende estudar a velocidade dos fluxos, tendo como limitação o facto de só servir para a medição de velocidades baixas (não superiores a 1,5 m/s).

O Doppler contínuo surgiu quando se aumentou a frequência de repetição da emissão pulsada, até à emissão ser contínua. Neste modo o transdutor tem dois cristais, um que emite e outro que recebe o sinal ultra-sónico (Oh *et al.*, 1994). Relativamente ao Doppler pulsado, o Doppler contínuo possui uma melhor relação sinal-ruído e permite a medição de velocidades elevadas sem ambiguidades (Fragata, 1991).

3.5. DOPPLER-COR

As imagens do Doppler-cor baseiam-se nos mesmos princípios do Doppler pulsado (Omoto e Kasai, 1987) e representam a velocidade dos fluxos num código de cores sobre as imagens 2D. O Doppler-cor utiliza múltiplos campos de amostragem, em conjunto com múltiplos feixes de ultra-sons. Em cada campo de amostragem é medida a variação de frequência, que é posteriormente convertida em formato digital e automaticamente correlacionada com um código de cores e apresentada sobre a imagem 2D (Oh *et al.*, 1994). Os fluxos que se aproximam do transdutor são codificados a cor vermelha e os fluxos que se afastam são codificados a cor azul. A velocidade destes fluxos é simulada por uma escala de intensidade de cor: quanto mais intensa é a cor, mais elevada é a velocidade do fluxo (Farcot, 1986). Fluxos turbulentos, caracterizados por movimentos do sangue em

múltiplas direcções e com múltiplas velocidades, apresentam elevada variância e, em alguns mapas, são codificados a verde.

O fenómeno de *aliasing*, que limita a capacidade de medida no Doppler espectral, também se verifica no modo Doppler-cor, apesar de não ser limitante. Pelo contrário, o *aliasing* resulta num efeito gráfico que ajuda a identificação de distintas áreas de velocidade no mapa de cores. O objectivo do Doppler-cor num exame ecocardiográfico é distinto do Doppler espectral: este último tem uma missão quantitativa, enquanto o Doppler-cor tem objectivos essencialmente qualitativos.

3.6. ECOCARDIOGRAFIA - VANTAGENS E LIMITAÇÕES

Vários trabalhos têm demonstrado as enormes vantagens da ecocardiografia como técnica para o estudo da morfologia e função cardíaca: esta técnica tem um carácter não-invasivo, o que elimina os riscos para os indivíduos em análise (pacientes ou animais), permitindo a sua utilização sobre vastas camadas de pacientes, e/ou repetidos exames sobre o mesmo paciente, facultando assim a execução de ensaios populacionais e de acompanhamento de patologias; as imagens ecocardiográficas contêm dados directos, específicos e quantitativos, sobre a anatomia e a fisiologia cardíacas. Os estudos ecocardiográficos apresentam baixos custos, quando comparados com outras técnicas, e permitem a obtenção de dados comparativos; apresentam uma grande reproductibilidade e uma baixa variação intra e inter-observadores e podem ser realizados numa grande variedade de condições experimentais (Kloster, 1977; Coucelo *et al.*, 1996).

A ecocardiografia é uma técnica interactiva que envolve o operador, o equipamento de ultra-som e o indivíduo a examinar (Oh *at al.*, 1994). A boa qualidade das imagens ecocardiográficas depende de cada um destes factores e qualquer um deles pode constituir um factor limitante na utilização desta técnica e comprometer o sucesso do exame. Relativamente à experiência do operador, é essencial que este tenha um treino adequado quer na manipulação da sonda e do aparelho, quer na leitura e interpretação das imagens.

O sucesso dos exames ecocardiográficos também está altamente dependente do desempenho técnico do ecógrafo e, principalmente, da utilização de sondas adequadas.

As características físicas do indivíduo a estudar também são determinantes para a qualidade das imagens a obter. Como já foi referido, os ultra-sons não atravessam tecido ósseo e o seu transporte através de meios gasosos é bastante limitado; conseqüentemente,

a presença de estruturas ósseas ou aéreas nas regiões a examinar, comprometem a visualização de outras estruturas.

Há ainda a ter em conta algumas limitações inerentes à aplicação das bases físicas do sistema Doppler, nomeadamente a direcção dos fluxos relativamente à incidência dos ultra-sons, pois o feixe de ultra-sons não deverá fazer um ângulo superior a 20° com a direcção do fluxo sanguíneo. Em alguns casos poderá não ser possível medir rigorosamente a velocidade do fluxo devido a esta limitação.

3.7. ULTRASONOGRAFIA EM VERTEBRADOS NÃO MAMÍFEROS

A ultrasonografia é uma técnica de reconhecido valor no estudo e diagnóstico de doenças cardíacas, uma vez que permite a análise pormenorizada, *in vivo*, da actividade cardíaca. Apesar das enormes vantagens desta técnica, a sua utilização no estudo dos sistemas cardiovasculares de vertebrados inferiores está ainda muito pouco explorada.

Os ultra-sons têm sido utilizados em alguns estudos em vertebrados não mamíferos e invertebrados para a identificação de várias estruturas: Pennich *et al.* (1991), Sainsbury e Gill (1991), Isaza *et al.*, (1993) e Snyder *et al.* (1999) descreveram a posição e estruturas do coração em vários répteis (cobras - *Varanus exanthematicus*, *Boa constrictor* e *Python molurus bivittatus* - e tartarugas - *Xerobates agassazi*); Davenport (1993) aplicou a ultrasonografia como ferramenta não-invasiva para o estudo de vários organismos marinhos e registou imagens das gónadas do halibut *Hippoglossus hippoglossus* L., das estruturas internas da ascídia *Ascidia mentula* e do polvo *Eledone cirrhosa*; Reimers *et al.*, (1987) avaliaram o sexo e o estado de maturação de salmonídeos, nomeadamente na truta arco-íris.

Relativamente ao estudo do coração dos peixes, Lai *et al.* (1990) publicaram o primeiro trabalho com utilização de ultra-sons para a avaliação da função cardíaca em elasmobrânquios. Posteriormente, utilizaram os ultra-sons para estudar os mecanismos de retorno venoso e enchimento ventricular em elasmobrânquios e teleósteos (Lai *et al.*, 1996, 1998). No entanto, estes trabalhos foram realizados em animais sujeitos a cirurgia, com e sem pericárdio intacto.

Franklin e Davie (1992) determinaram pela primeira vez variações volumétricas do coração de peixes por ecocardiografia. Estes autores obtiveram imagens 2D a partir de uma preparação com pericárdio intacto mas em animais canulados e parcialmente abertos;

estimaram o volume de ejeção ventricular da espécie *Onchorhynchus mykiss* (truta arco-íris) aplicando o modelo piramidal e calcularam o volume telesistólico e telediastólico de forma indirecta, uma vez que não obtiveram um delineamento do endocárdio satisfatório nas imagens.

Posteriormente, Sande e Pope (1995) aplicaram a ecocardiografia em salmões provenientes de cultivo e do meio selvagem para identificar e separar animais com cardiomiopatias. Neste estudo, a ecocardiografia em MM aplicada foi complexa, demorada e não foi possível calcular a fracção de encurtamento, devido a também não ter sido possível obter um delineamento satisfatório do endocárdio nas imagens.

Coucelo *et al.* (1996) realizaram o primeiro trabalho de caracterização da morfologia e hemodinâmica cardíacas em vários grupos de vertebrados, por ecocardiografia, de forma totalmente não-invasiva. Estes autores identificaram as câmaras cardíacas e os fluxos cardíacos em peixes teleósteos e batráquios e referem pela primeira vez o enchimento bifásico em peixes teleósteos. Desde essa altura, têm vindo a desenvolver a aplicação da ecocardiografia ao estudo de vários parâmetros de função cardíaca, em diferentes condições experimentais e em vários grupos de vertebrados (Coucelo *et al.*, 1997; Joaquim *et al.*, 1999; Joaquim *et al.*, 2000a, b; Coucelo *et al.*, 2000).

CAPÍTULO II

METODOLOGIA APLICADA NOS EXAMES

ECOCARDIOGRÁFICOS

1. POPULAÇÃO

1.1. BIOLOGIA DO MODELO EXPERIMENTAL

Neste trabalho estudou-se a morfologia e a função cardíaca por ecocardiografia da espécie *Halobatrachus didactylus* (nome vulgar: charroco, Fig. II.1.1). Este teleósteo marinho pertence à família *Batrachoidae* e possui um corpo robusto, com cabeça grande e o corpo achatado dorsoventralmente; apresenta barbatanas peitorais largas, em posição lateral e as barbatanas pélvicas encontram-se implementadas ventral e anteriormente em relação às barbatanas peitorais. Interiormente, a inserção das barbatanas pélvicas divide a cavidade abdominal da região cardíaca.

O charroco é uma espécie sedentária, bentónica, que vive em fundos vasosos ou arenosos, geralmente abrigada sob rochas ou em tocas, em profundidades inferiores a 50m; encontra-se amplamente distribuída no Atlântico, desde o Golfo da Biscaia até à Costa do Gana, incluindo a Madeira, e ainda no Mediterrâneo ocidental e no Adriático (Muzavor *et al.*, 1993).

No sistema lagunar da Ria Formosa (Costa Sul de Portugal), a espécie *H. didactylus* apresenta uma larga distribuição, onde é considerada uma espécie permanente, uma vez que o seu ciclo de vida decorre inteiramente no seu interior (Muzavor, *et al.* 1993).

Muzavor *at al.* (1993) referem que, na Ria Formosa, os indivíduos desta espécie atingem o comprimento de 27 cm ao fim dos 4 anos, medindo em média 12 cm com 1 ano de idade e 18 cm no fim do 2º ano de vida. Nesta espécie, a primeira maturação ocorre durante o 2º ano de vida.

Este teleósteo marinho apresenta uma série de características que favorecem a sua utilização como modelo experimental neste estudo. A forma do seu corpo, achatado dorsoventralmente, é a forma ideal para realização dos exames ecocardiográficos, pois que permite o fácil posicionamento da sonda ecocardiográfica sobre a região cardíaca, situada na região anterior do corpo. Além disso, é uma espécie fácil de obter na região sul de Portugal, apresenta uma elevada resistência, o que faz com que seja também fácil de manter em cativeiro por longos períodos, mantendo as condições fisiológicas normais. É ainda de referir que, dentro dos teleósteos, esta espécie apresenta o coração mais simples,

de forma sacular e constituído exclusivamente por miocárdio esponjoso, o que faz com que seja um bom representante das espécies com menores requisitos metabólicos.

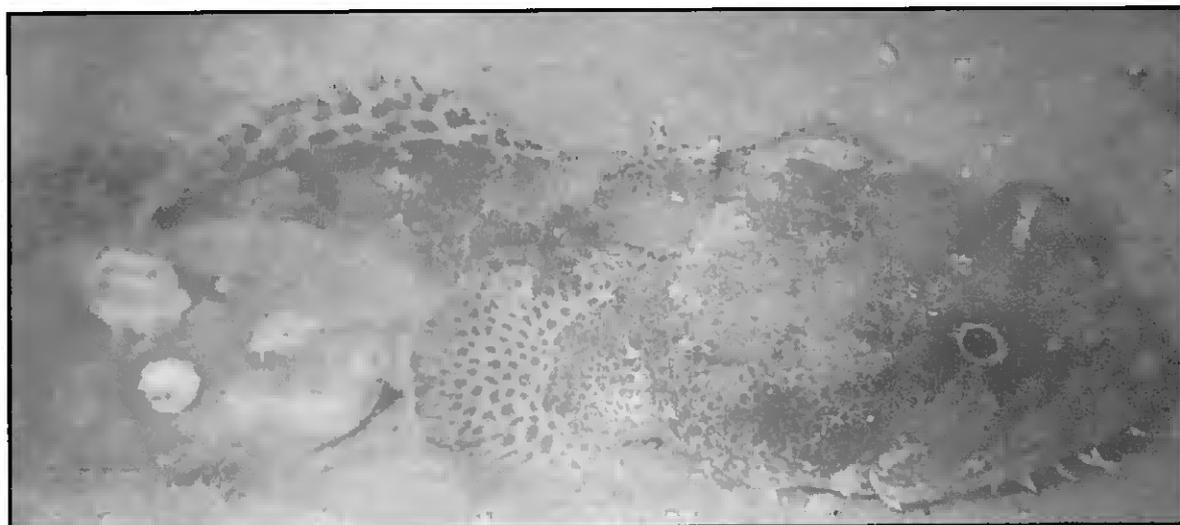


Figura II.1.1 – Exemplar da espécie *H. didactylus* no seu meio natural (cortesia de José Vieira, *Hidrospaço*).

1.2. GRUPO EXPERIMENTAL E MANUTENÇÃO

Neste trabalho foram realizados exames ecocardiográficos *in vivo* a 47 indivíduos incluídos neste estudo, 7 fêmeas e 40 machos, com pesos entre 270 e 1540 g (22-44 cm). O número de machos amostrados é muito superior ao de fêmeas, uma vez que foram incluídos neste trabalho preferencialmente indivíduos de grandes dimensões, que são na sua maioria machos.

Os exemplares utilizados foram capturados na Ria Formosa, entre Março de 1996 e Janeiro de 2000, e depois do seu transporte para as instalações da Universidade do Algarve, foram mantidos em tanques com água salgada, com renovação de água e arejamento constantes e controlo regular dos parâmetros de qualidade da água. Os animais estiveram sujeitos a um fotoperíodo natural e a temperatura similar à do seu meio natural, variando entre o mínimo de 17 °C no Inverno e máximo de 24 °C no Verão. Antes dos exames, os animais foram aclimatados a 20 °C, temperatura que foi mantida em todos os estudos realizados.

2. METODOLOGIA ECOCARDIOGRÁFICA

2.1. PREPARAÇÃO DOS EXAMES ECOCARDIOGRÁFICOS

Os exames ecocardiográficos foram realizados no Centro de Cardiologia de Portimão e no laboratório de ecocardiografia do Hospital Particular do Algarve, no Alvor. Os animais foram transportados em tanques com água salgada, com temperatura e oxigénio controlados.

Antes de cada exame os indivíduos foram ligeiramente sedados com metoxietanol (éter etilnoglicomonofenicol - Merck), na concentração de 1 ml/l em água do mar, até cessarem os movimentos operculares. Os animais foram então colocados com a face ventral para cima, numa mesa de exame, provida de um sistema de recirculação de água, com água do mar arejada e contendo uma dose de anestésico de 0,5 ml/l (Fig. II.2.1). Foi introduzido um tubo na cavidade bucal, com débito de água controlado, para manter as brânquias constantemente irrigadas.

O electrocardiograma foi monitorizado continuamente, para seguir as variações da frequência cardíaca (FC) ao longo do exame. Antes de se iniciar o registo de imagens cada indivíduo foi sujeito a um período de observação de aproximadamente 20 minutos, durante o qual a FC foi estável. Alguns indivíduos apresentaram variações significativas durante o período de observação e foram retirados deste estudo. A temperatura da água e da sala foram mantidas a 20 °C. Depois de cada exame, os animais retornavam para os tanques de transporte com água limpa, onde recuperavam da anestesia, em 1 a 5 minutos.

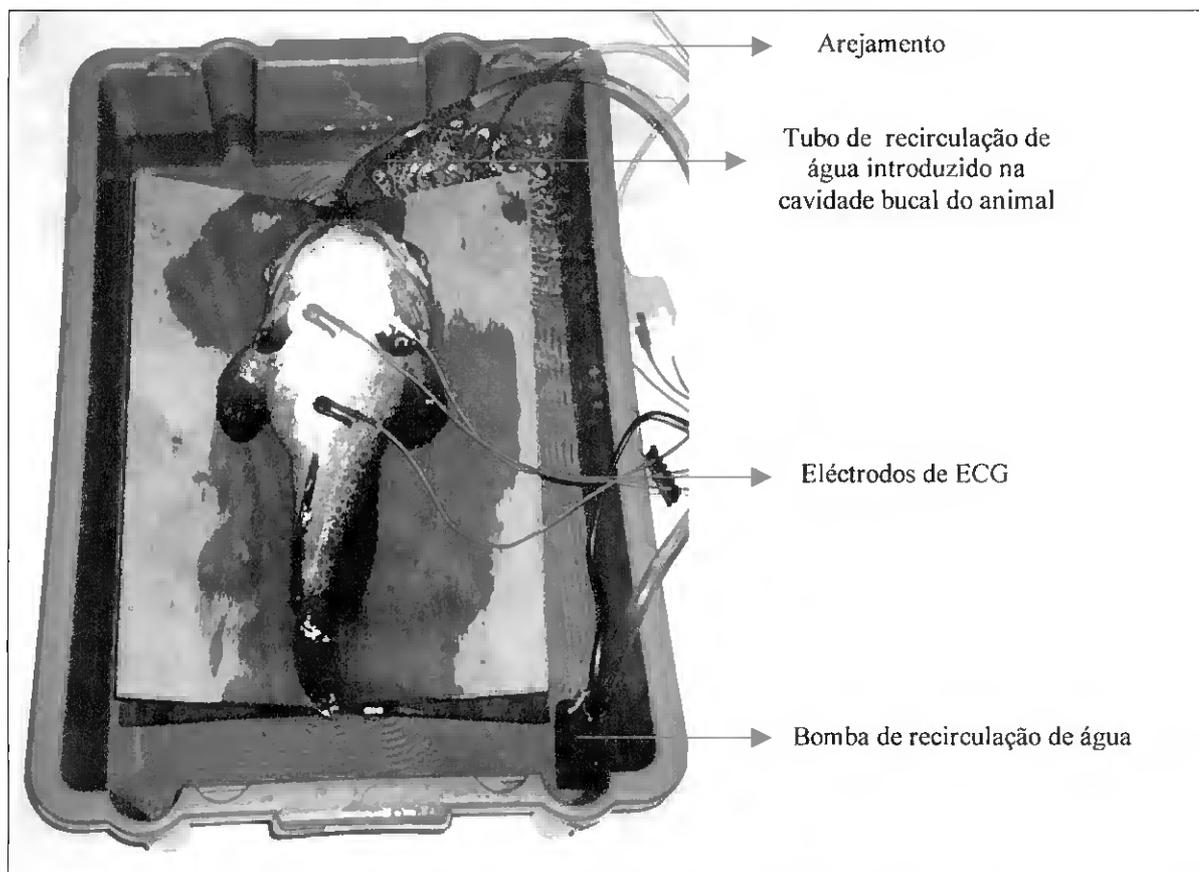


Figura II.2.1 – Sistema de recirculação de água utilizado durante os exames ecocardiográficos. O animal foi posicionado com a face ventral para cima, com um tubo introduzido na cavidade bucal, com débito de água controlado. Os eléctrodos para registo do ECG foram colados na face ventral.

2.2. INSTRUMENTAÇÃO

Os exames ecocardiográficos realizados neste estudo foram efectuados com dois equipamentos de ultra-som: o ecógrafo *Aloka SSD 830*, com sonda de 5 MHz com adaptador vascular e o ecógrafo *Acuson Sequoia 512*, com sondas de 8 e 15 MHz (Figs. II.2.2 e II.2.3).

Ambos os ecógrafos estão equipados com os vários modos ecocardiográficos - modo-M (MM), bidimensional (2D), Doppler espectral e Doppler-cor - que foram utilizados para obter imagens 2D em várias incidências das câmaras cardíacas e também para o registo do espectro Doppler de velocidade dos principais fluxos cardíacos. Foram utilizadas sondas vasculares tendo em conta as reduzidas dimensões do coração e a reduzida velocidade dos fluxos sanguíneos da espécie em estudo. Estas sondas de elevada frequência permitem uma menor profundidade de penetração de ultra-sons no organismo e

uma maior resolução das estruturas, o que está perfeitamente adequado ao estudo deste coração.

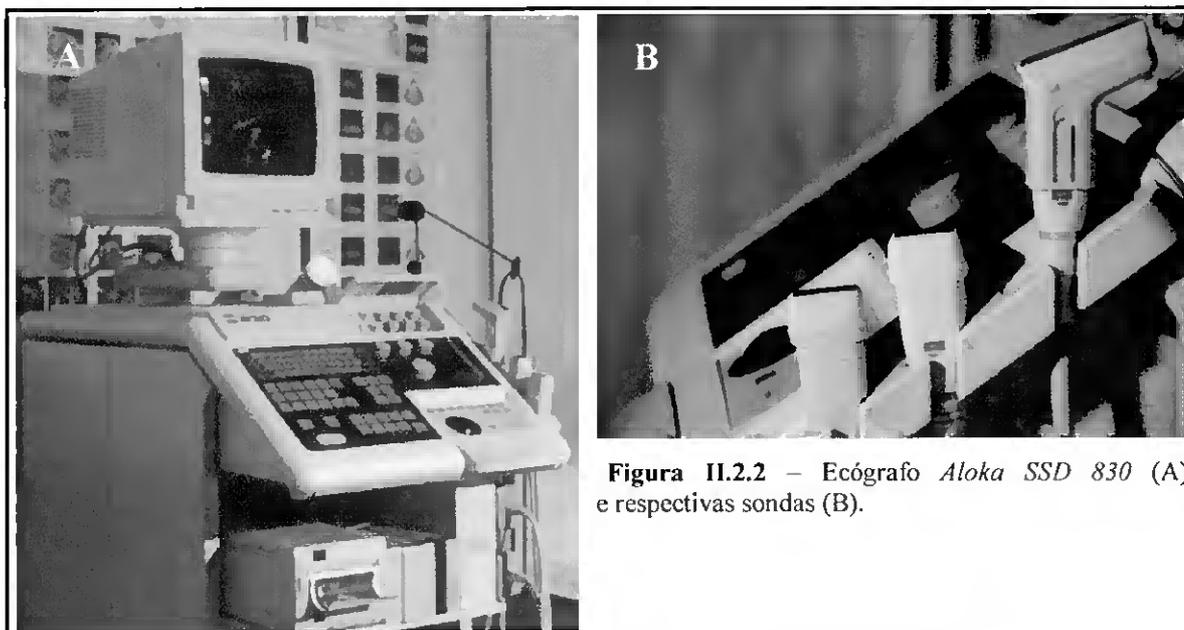


Figura II.2.2 – Ecógrafo *Aloka SSD 830* (A) e respectivas sondas (B).

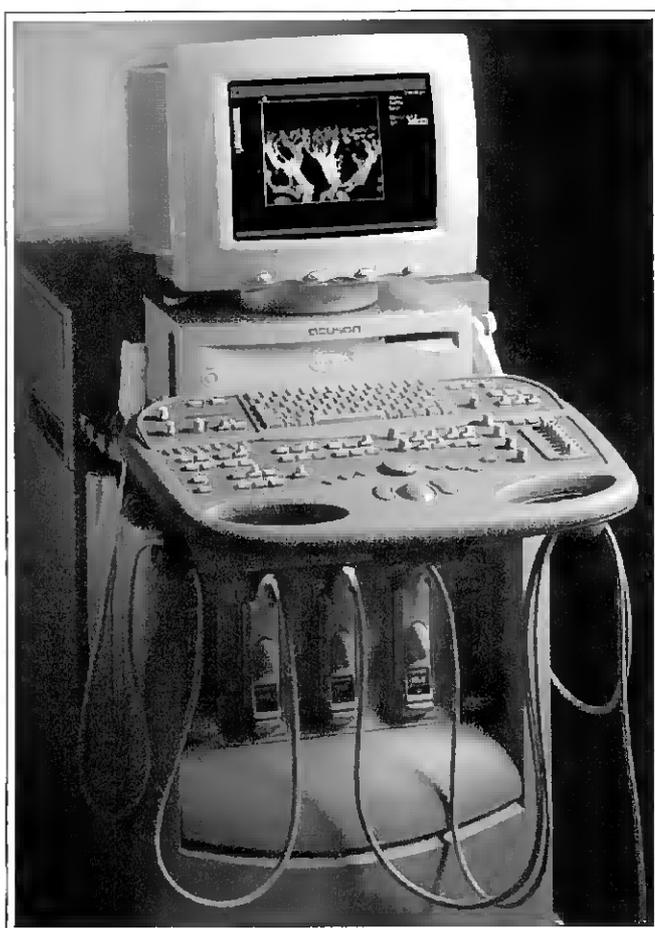


Figura II.2.3 – Ecógrafo *Acuson Sequoia 512*(© 2000 Acuson).

2.3. ELECTROCARDIOGRAMA

Em todos os exames, e simultaneamente a todos os registos de imagens, foi efectuado o registo da actividade eléctrica do coração através do electrocardiograma. Este registo foi efectuado utilizando os eléctrodos dos ecógrafos. Os três eléctrodos foram fixados através de adaptadores pediátricos e colocados triangularmente: dois na região das barbatanas pélvicas e o terceiro sobre a região anal (Fig. II.2.4).



Figura II.2.4 – Posicionamento dos eléctrodos para registo do electrocardiograma: os três eléctrodos foram fixados através de adaptadores pediátricos e colocados triangularmente: o verde sobre a barbatana pélvica direita, o branco sobre a barbatana pélvica esquerda e o preto sobre a região anal.

2.4. POSICIONAMENTO E ORIENTAÇÃO DA SONDA

O coração da espécie *H. didactylus* encontra-se na região ventral anterior, à frente da inserção das barbatanas pélvicas. Tendo em conta que os ultra-sons não atravessam as estruturas ósseas, a melhor janela para obter imagens das várias câmaras e dos fluxos cardíacos nesta espécie é através da face ventral.

A sonda foi colocada sobre a linha média ventral, na região do coração e obtiveram-se múltiplas imagens tomográficas das câmaras cardíacas, em longo e curto eixo (Fig. II.2.5), por rotação e angulação manual da sonda.

Foi utilizado gel para aumentar a condução do sinal ultrasónico entre a sonda e a pele do animal.

Na obtenção de imagens ecocardiográficas a orientação do transdutor em relação às estruturas a estudar é de extrema importância. Tendo em conta que a ecocardiografia se baseia na reflexão de ondas sonoras, o feixe de ultra-sons deve ser orientado o mais perpendicularmente possível às estruturas que se pretendem observar. Imagens em planos oblíquos poderão levar a interpretações erróneas das estruturas a estudar e foram excluídas dos protocolos quantitativos.

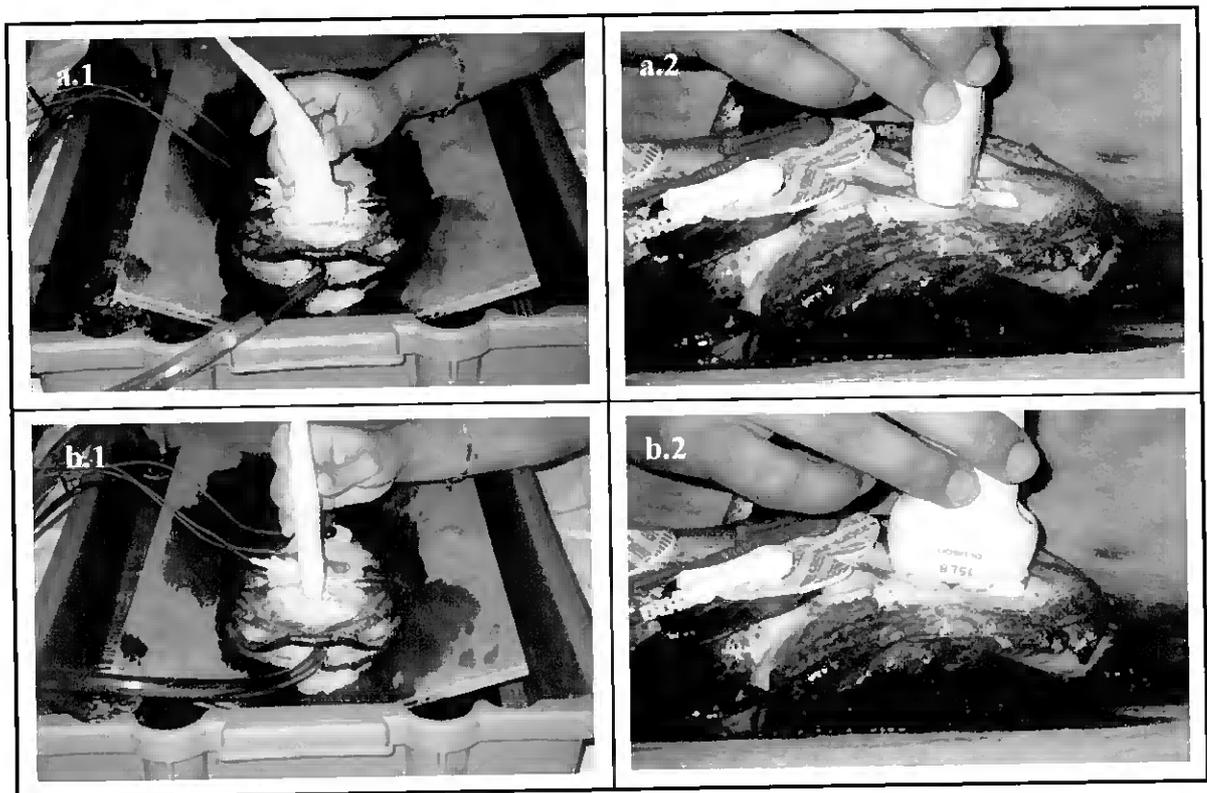


Figura II.2.5 – Posicionamento da sonda sobre a região cardíaca, para obtenção de imagens ecocardiográficas do coração de *H. didactylus*, em curto eixo (a) e em longo eixo (b), em vista frontal (1) e lateral (2).

2.5. ECOCARDIOGRAFIA BIDIMENSIONAL E MODO-M

A ecocardiografia 2D fornece imagens 2D das câmaras cardíacas no plano atravessado pelo feixe de ultra-sons. Com a sonda colocada sobre a região do coração, foram registadas imagens 2D longitudinais e transversais, em diversos planos das câmaras cardíacas, durante vários ciclos cardíacos consecutivos, com registo electrocardiográfico simultâneo. As imagens longitudinais (longo-eixo) representam uma secção sagital do coração, que o bissecta desde a zona mais anterior do bulbo até ao apex ventricular (Fig. II.2.6). As imagens transversais (curto-eixo) são perpendiculares ao longo-eixo e bissectam o coração em discos (Fig. II.2.7).

A profundidade de campo das imagens registadas variou entre 2 e 6 cm, de modo a obter a melhor definição das estruturas. A resolução espaço-tempo foi ajustada para enfatizar a resolução espacial, uma vez que se tratam de estruturas de pequenas dimensões e com frequências cardíacas baixas. A escala de cinzentos e o ganho foram ajustados para minimizar o ruído e maximizar o delineamento das estruturas.

Foram também registadas, em simultâneo com imagens 2D, imagens em MM de várias zonas da parede ventricular (Fig. II.2.8). As imagens em MM foram obtidas a partir de eixos transversos escolhidos nas imagens 2D, quer em incidências sagitais, quer transversais. Estas imagens constituem registos da cinética das paredes do ventrículo em função do tempo e são particularmente sensíveis a pequenos movimentos das estruturas.

As imagens 2D e em MM foram posteriormente utilizadas para determinar as dimensões lineares das câmaras cardíacas. Estas medições permitiram estudar o padrão de movimento das paredes do ventrículo e a variação das suas dimensões e volumes ao longo do ciclo cardíaco.



Figura II.2.6 - Imagem ecocardiográfica 2D em corte longitudinal do coração de *H. didactylus*, obtida com o ecógrafo *Acuson Sequoia*, com sonda de 15 MHz (profundidade 20 mm). Na imagem visualiza-se o ventrículo (V), o lúmen ventricular (L_v) e o bulbo (B).

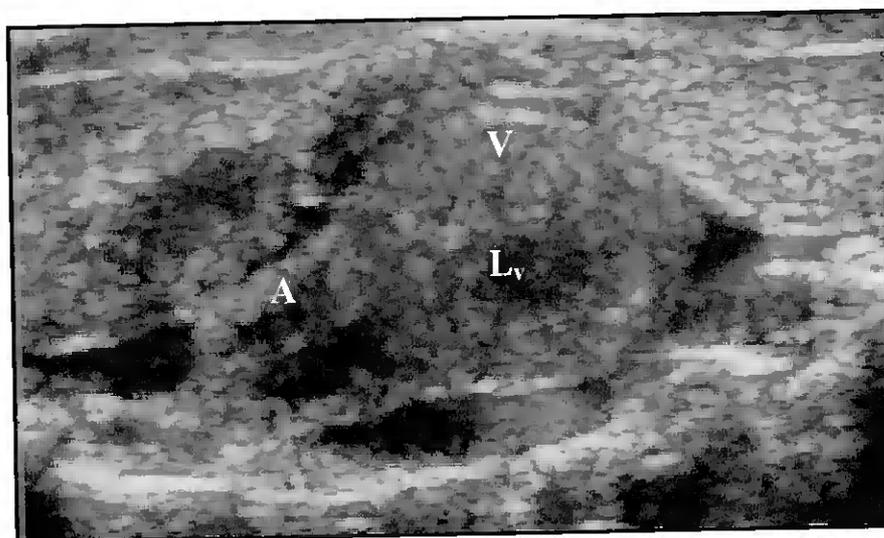


Figura II.2.7- Imagem ecocardiográfica 2D em corte transverso do coração de *H. didactylus*, onde se visualiza a parede do ventrículo (V), o lúmen ventricular (L_v) e a aurícula (A).

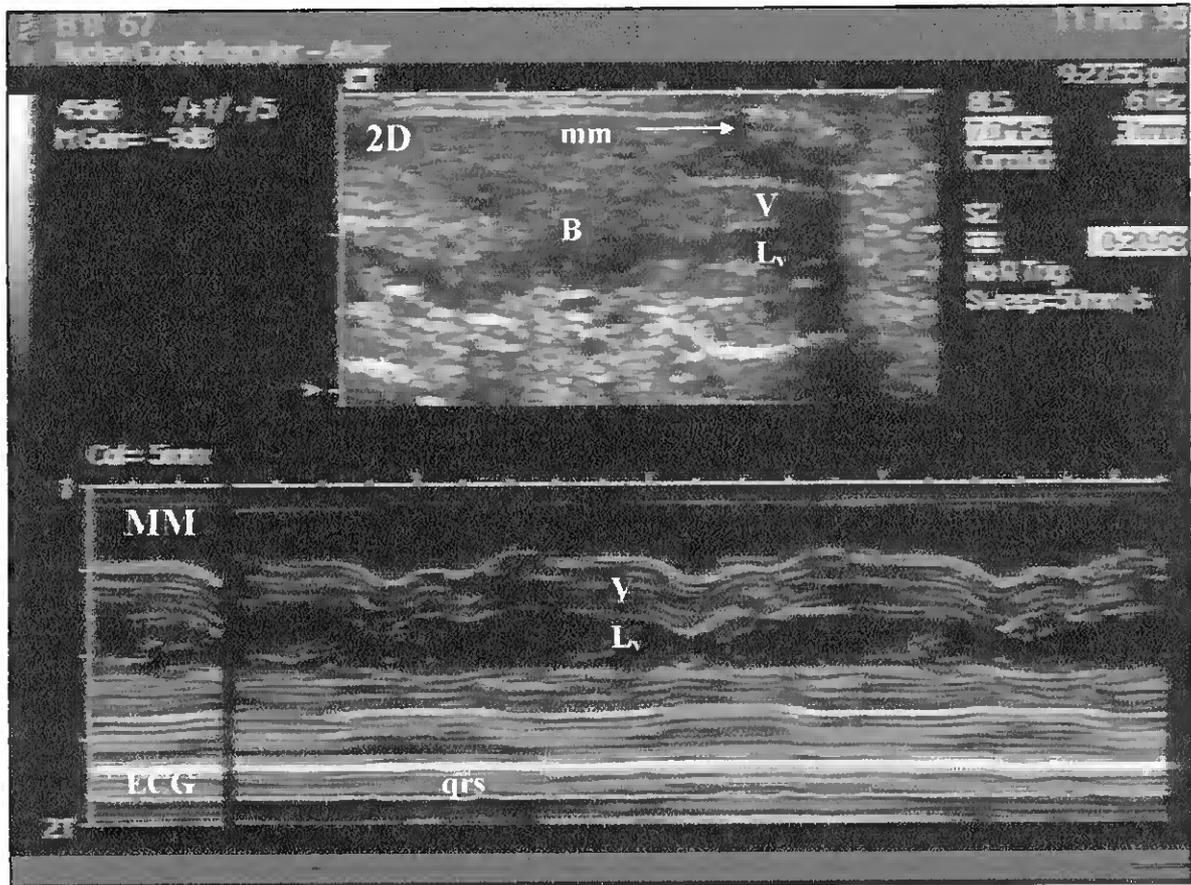


Figura II.2.8 - Imagem ecocardiográfica 2D e MM do coração de um exemplar de *H. didactylus*, com registo electrocardiográfico (ECG) simultâneo: V - parede do ventrículo; L_v- lúmen ventricular; B - bulbo. Em MM regista-se a variação da cinética da parede do ventrículo em função do tempo, no eixo vertical indicado em 2D (seta branca).

2.6. DOPPLER-COR

O Doppler-cor permite visualizar os fluxos cardíacos, a sua direcção e velocidade através de um código de cores. Os ecógrafos utilizados permitem registar os fluxos cardíacos em simultâneo com as imagens 2D e em MM. No estudo do coração da espécie *H. didactylus*, o Doppler-cor revelou-se de extrema utilidade para uma correcta identificação da melhor orientação da sonda e do melhor posicionamento da amostra para registo do espectro de velocidade dos fluxos. Esta técnica permitiu visualizar e registar os vários fluxos cardíacos: fluxo de ejeção ventricular (Capítulo III.3), fluxo de enchimento ventricular (Capítulo III.4), fluxo de enchimento auricular (dados não apresentados) e fluxo coronário (Capítulo III.7). Estes fluxos são registados quer em curto quer em longo eixo, em simultâneo com imagens 2D.

O ganho foi ajustado para o máximo e diminuído até desaparecer o ruído. A profundidade do campo utilizado nestas imagens foi a mínima (2 cm) uma vez que nessas condições o limite de *Nyquist* (velocidade máxima a ser registada sem *aliasing*) é máximo.

2.7. ECOCARDIOGRAFIA DOPPLER

A ecocardiografia Doppler permite registar o espectro de velocidade dos fluxos sanguíneos. Neste trabalho foram registadas imagens em tempo real do espectro Doppler de velocidade do fluxo sistólico de ejeção ventricular (Capítulo III.3), fluxo diastólico de enchimento ventricular (Capítulo III.4), fluxo de enchimento auricular (dados não apresentados) e fluxo diastólico coronário (Capítulo III.7). Para os vários fluxos foram registados vários ciclos cardíacos consecutivos, com registo electrocardiográfico simultâneo.

Para o registo dos fluxos a amostra Doppler foi posicionada na imagem 2D o mais próximo possível do orifício atravessado pelo fluxo, de forma registar a sua velocidade máxima. Assim, para registo do fluxo de ejeção ventricular, a amostra foi colocada sobre o orifício ventrículo-bulbar em imagens longitudinais; também é possível medir este fluxo a partir de imagens transversais, as quais devem ser obtidas exactamente sobre o referido orifício.

Para registo do fluxo de enchimento ventricular a amostra foi colocada sobre o orifício aurículo-ventricular. A partir da imagem longitudinal o orifício não é visualizado e a amostra é colocada sobre o lúmen ventricular, na região do apex, onde o fluxo é visualizado por Doppler-cor. No entanto, a melhor abordagem para registar este fluxo é a partir da imagem transversal, que corta a aurícula e o ventrículo no plano valvular. Este fluxo é facilmente registado, dependendo da orientação do coração na cavidade pericárdica; pequenas angulações manuais da sonda permitiram registar estes fluxos em todos os casos.

O espectro de velocidade do fluxo de enchimento da aurícula foi registado apenas a partir de imagens transversais oblíquas, que cortam a zona mais anterior do coração, permitindo a visualização do seio venoso. A amostra foi colocada sobre orifício sino-auricular.

O fluxo dum vaso superficial na parede do ventrículo, com características de coronária, é visualizado através do Doppler-cor junto ao endocárdio no plano da válvula

ventrículo-bulbar. Para registo do espectro de velocidade deste fluxo, a amostra é colocada exactamente sobre o vaso identificado pelo Doppler-cor.

Tal como referido no ponto anterior relativamente às imagens de Doppler-cor, o ganho foi ajustado para o máximo e diminuído até desaparecer o ruído dos espectros de velocidade dos fluxos.

Os registos Doppler dos espectros de velocidade dos fluxos foram posteriormente utilizados para avaliar a função sistólica e diastólica do ventrículo e no estudo da reserva coronária.

2.8. ARMAZENAMENTO E PROCESSAMENTO DE IMAGENS

Todos os exames efectuados foram integralmente registados em vídeo VHS, em condições óptimas de ganho e contraste. Algumas sequências com imagens de melhor qualidade foram também registadas no disco rígido do ecógrafo, para posterior revisão e análise.

Foram seleccionadas as melhores imagens 2D e de fluxos para determinação dos parâmetros referentes à morfologia e função cardíacas. Estas imagens, digitalizadas através da placa de vídeo *Miro DC 30*, foram gravadas com 704×576 pixels, 24 bits de resolução (RGB), em ficheiros de formato BMP.

Posteriormente, estas imagens foram tratadas *off-line* através dum programa de análise de imagem, *Optimas 6.2*, de modo a determinar os parâmetros de morfologia e função cardíaca em estudo.

2.9. LIMITAÇÕES

Alguns animais apresentam um posicionamento oblíquo do ventrículo, que impossibilita a obtenção de imagens 2D longitudinais completas. Outra dificuldade deriva do facto do apex ventricular se encontrar por baixo das estruturas ósseas da inserção das barbatanas pélvicas. Este facto faz com que em alguns animais se crie uma zona escura que impede a visualização do apex ventricular. Tendo em conta estas dificuldades, em 13 % dos animais examinados não se obtiveram imagens satisfatórias e foram retirados dos estudos.

Embora não tenham sido incluídas neste trabalho, as novas sondas de maior resolução (8 e 15 MHz) permitem obter imagens com boa qualidade de indivíduos a partir de 50 g. Imagens de óptima qualidade são obtidas para indivíduos a partir de 150 g de peso. No entanto, é importante salientar que a qualidade das imagens em indivíduos com peso superior a ≈ 150 g, não está directamente relacionada com o tamanho e nem sempre os indivíduos maiores são os que fornecem imagens com estruturas melhor definidas. Estas diferenças estão relacionadas com as diferentes ecodensidades dos indivíduos e com a orientação do ventrículo na cavidade pericárdica.

CAPÍTULO III

**CARACTERIZAÇÃO ECOCARDIOGRÁFICA DA
MORFOLOGIA E FISILOGIA CARDÍACA DE**

Halobatrachus didactylus

1. CARACTERIZAÇÃO DA ANATOMIA E HISTOLOGIA DO CORAÇÃO

1.1. INTRODUÇÃO

A aplicação da ecocardiografia, para a visualização dinâmica e em tempo real das estruturas cardíacas e posterior quantificação de parâmetros funcionais, está dependente do conhecimento da localização, anatomia e relação topográfica das estruturas a visualizar. De facto, a correcta interpretação das imagens obtidas por esta técnica não-invasiva, é o primeiro passo para o sucesso da sua aplicação e depende completamente do conhecimento da morfologia do órgão *in situ*. Além dos aspectos mencionados, outros índices cardíacos quantitativos não ecocardiográficos, como a massa relativa do coração e do ventrículo e a densidade específica do miocárdio, fornecem dados essenciais para caracterizar o modelo experimental em estudo.

Por outro lado, a caracterização histológica do tecido cardíaco é essencial para compreender a dinâmica da contracção e para correlacionar parâmetros ecocardiográficos de caracterização tecidual. Os componentes do tecido cardíaco existem normalmente num estado de equilíbrio, baseado nas suas proporções relativas, integridade estrutural, arranjo físico e características bioquímicas. Este equilíbrio é responsável pelo comportamento mecânico do miocárdio e garante a sua viabilidade celular.

Assim, foi objectivo deste estudo caracterizar a anatomia e histologia do coração de *Halobatrachus didactylus* e fornecer dados que favoreçam uma correcta interpretação dos dados ecocardiográficos.

1.2. MATERIAL E MÉTODOS

Depois dos estudos ecocardiográficos, alguns indivíduos foram sacrificados com vista a obtenção parâmetros morfométricos do coração a partir da peça. Outros indivíduos foram ainda incluídos nesta parte do trabalho, perfazendo um total de 143 indivíduos, utilizados para determinar a massa relativa do coração e do ventrículo e a massa volúmica do ventrículo. Foi igualmente realizado o processamento histológico de algumas peças (n=10), para permitir uma caracterização geral do tecido cardíaco desta espécie.

1.2.1. Morfometria

Os animais foram sacrificados com uma sobre-dosagem de anestésico e foi efectuada uma incisão ventral ao longo da cavidade abdominal, até à região do coração (Fig. III.1.1). O coração fica localizado na região anterior do corpo, inserido na cavidade pericárdica, que se encontra à frente do fígado, por trás da inserção das barbatanas pélvicas.

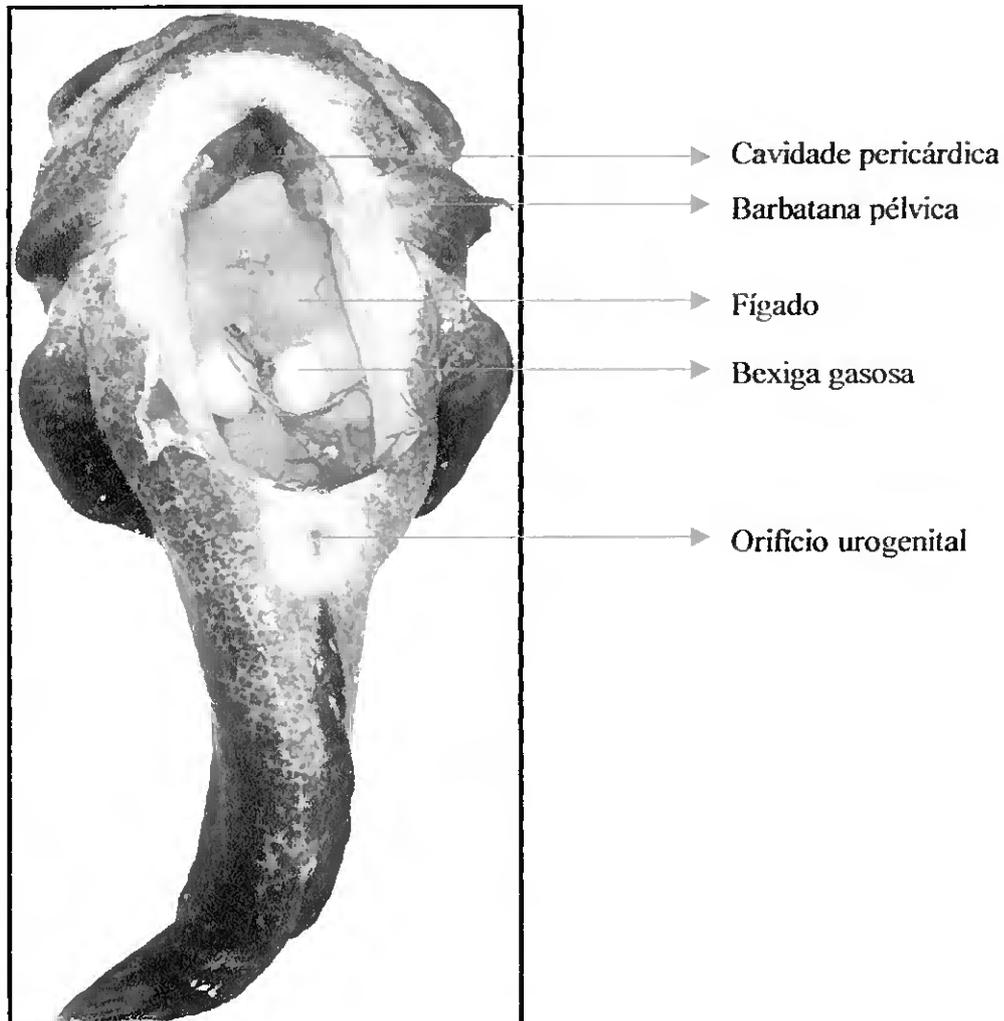


Figura III.1.1 – Exemplo de *H. didactylus* (macho, 31 cm, 560 g), com evidência dos órgãos internos e a localização do coração, na cavidade pericárdica.

O coração foi recolhido inteiro, através de uma incisão anterior ao seio venoso e posterior ao bulbo, ao nível da aorta ventral. Posteriormente, procedeu-se à recolha de dados morfométricos do coração e do ventrículo, nomeadamente o peso e o volume (através do método gravimétrico de deslocação de volume).

Foram ainda determinados a **massa cardíaca relativa** (MCR), a **massa ventricular relativa** (MVR) e a **massa volúmica** (MV) do músculo cardíaco:

$$\text{Massa Cardíaca Relativa (\%)} = \frac{\text{Massa do coração}}{\text{Massa corporal}} \times 100 \quad [\text{III.1.1}]$$

$$\text{Massa Ventricular Relativa (\%)} = \frac{\text{Massa do ventrículo}}{\text{Massa corporal}} \times 100 \quad [\text{III.1.2}]$$

$$\text{Massa Volúmica (g/ml)} = \frac{\text{Massa do Ventrículo}}{\text{Volume do Ventrículo}} \quad [\text{III.1.3}]$$

1.2.2. Processamento histológico

Os corações recolhidos para processamento histológico foram cortados em diferentes orientações - transversal, longitudinal e nos planos valvulares - e posteriormente foram fixados em formol a 10 %.

Os tecidos foram desidratados numa série de álcoois de concentrações crescentes (70 a 100 %) e de seguida incluídos em parafina. Efectuaram-se cortes de 5 µm dos vários fragmentos, os quais foram sujeitos a diferentes colorações: Hematoxilina-eosina, reacção do ácido periódico-Schiff, coloração para os lípidos e PicroSirius. As preparações foram montadas em Entellan.

1.2.3. Colorações

Hematoxilina-eosina

A coloração de Hematoxilina-eosina (HE) é normalmente utilizada como rotina para diferenciação não específica de constituintes celulares. A hematoxilina é um corante básico que cora as estruturas ácidas de azul. Os núcleos, ribossomas e o retículo endoplasmático rugoso têm grande afinidade para este corante por possuírem grandes quantidades de ADN e ARN. Em contraste, a eosina cora as estruturas básicas: o citoplasma e o colagénio adquirem diferentes tonalidades de vermelho.

Reacção do ácido periódico-Schiff

A técnica de coloração histoquímica do ácido periódico-Schiff (PAS) é específica para os carboidratos. O glicogénio e outros carboidratos periodate-reactivos coram de magenta, enquanto os núcleos adquirem uma coloração azul. A reacção de coloração envolve a oxidação dos grupos hidroxilo a grupos aldeído pelo ácido periódico e a consequente reacção do reagente de Schiff com os grupos aldeído livres, que origina a cor magenta.

Coloração para lípidos

A coloração para lípidos é uma técnica específica, na qual o tetróxido de ósmio é utilizado como segundo fixador. Este oxida a ligação $—CH=CH—$ e é reduzido a uma substância de cor preta, o dióxido de ósmio. Como o tetróxido de ósmio é solúvel, tanto em solventes polares como em solventes apolares, cora os lípidos hidrofílicos e os lípidos hidrofóbicos.

PicroSirius

A coloração de PicroSirius é uma técnica de histoquímica específica para a birefringência do colagénio, sendo possível distinguir, através da observação dos cortes histológicos ao microscópio óptico com luz polarizada, os diferentes tipos de colagénio: o colagénio do tipo I (col I) cora de vermelho, o colagénio do tipo III (col III) cora de verde. É ainda possível distinguir o tecido muscular, que cora de cinzento escuro, e as zonas lacunares de azul escuro.

1.2.4. Análise histológica

Identificação de estruturas celulares

Os cortes corados com HE, PAS e coloração para lípidos foram analisados ao microscópio óptico (1000×), para identificar os componentes celulares e a estrutura normal do tecido cardíaco.

Cálculo da fração de área dos componentes do miocárdio

Através da análise computadorizada das imagens dos cortes histológicos corados com PicroSirius e visualizados ao microscópio óptico com luz polarizada, foi possível determinar a fração de área ocupada pelos vários componentes celulares do miocárdio (colagénio do tipo I, colagénio do tipo III, tecido muscular e zonas lacunares). Estudaram-se imagens com ampliação de 400× para individualizar os vários componentes. Escolheram-se aleatoriamente três eixos diferentes e seleccionaram-se todas as imagens sucessivas de modo a abranger a totalidade da espessura da parede ventricular, desde o epicárdio ao endocárdio. Estas imagens foram capturadas por uma câmara de vídeo *Sony DC30* acoplada ao microscópio óptico, digitalizadas com uma placa de vídeo *Miro DC30* (704×576 pixels) e gravadas em ficheiros BMP.

A fração de área ocupada pelos diferentes componentes da parede ventricular foi calculada aplicando o programa de análise de imagem *Optimas 6.5*. Este programa permite seleccionar padrões de cor no sistema HSL 24 bits (8 bits *Hue*, *Saturation*, *Luminance*), que distinguem os vários componentes, e calcula a percentagem de pixels na imagem correspondente a cada componente.

1.2.5. Análise estatística

Os resultados relativos à MCR, MVR e MV representam a média de dados obtidos de 143 indivíduos. Os valores da fração de área dos componentes do tecido ventricular correspondem à média dos dados obtidos de todas as imagens sucessivas em três eixos aleatórios na parede ventricular, em três zonas distintas – epicárdio, miocárdio e endocárdio. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi aplicado para comparar a fração de área dos componentes do tecido ventricular nas três regiões referidas. O nível de significância utilizado foi de 5% ($\alpha=0,05$).

1.3. RESULTADOS

1.3.1. Descrição macroscópica do coração de *H. didactylus*

O coração de *H. didactylus* encontra-se inserido na cavidade pericárdica e é constituído por quatro câmaras sequenciais: seio venoso, aurícula, ventrículo e bulbo arterial (Fig. III.1.2).

O seio venoso é uma câmara de pequenas dimensões, com aspecto de um vaso amplo, que antecede a aurícula. A aurícula apresenta paredes finas e aspecto flácido e localiza-se do lado esquerdo do ventrículo. A aurícula e o ventrículo têm dimensões semelhantes, apesar de serem morfologicamente muito diferentes. O ventrículo tem paredes espessas, aspecto rígido e musculado e forma sacular. O bulbo arterial é uma câmara elástica com paredes espessas, de coloração branca, de menores dimensões relativamente à aurícula e ao ventrículo. O orifício aurículo-ventricular ocupa uma posição lateral no ventrículo, enquanto que o orifício existente entre o ventrículo e o bulbo arterial se situa na parte anterior do ventrículo.

O coração recebe sangue venoso proveniente dos ductos de Cuvier, o qual passa sequencialmente pelas quatro câmaras e flui para a aorta ventral, que é bastante curta (2 a 5 mm) e se ramifica em três pares de artérias branquiais (Fig. III.1.3). Estes vasos conduzem o sangue até às brânquias, onde é oxigenado.

Relativamente à massa cardíaca relativa, massa ventricular relativa e massa volúmica, verificou-se um valor de 0,133 %, 0,067 % e 1,013 g/ml, respectivamente.

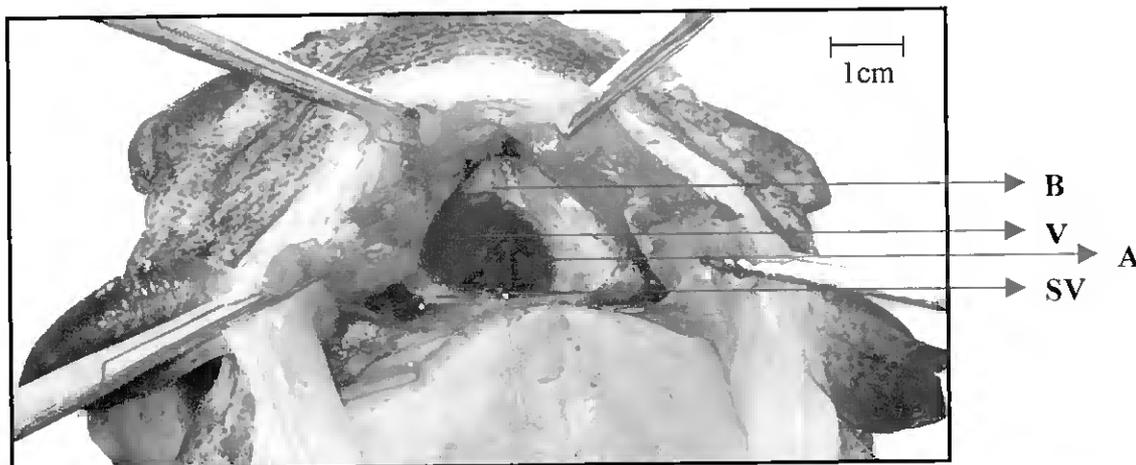


Figura III.1.2 - Coração *in situ* de *H. didactylus*, após remoção do pericárdio, evidenciando as quatro câmaras: SV - seio venoso; A - aurícula; V - ventrículo; B - bulbo arterial.

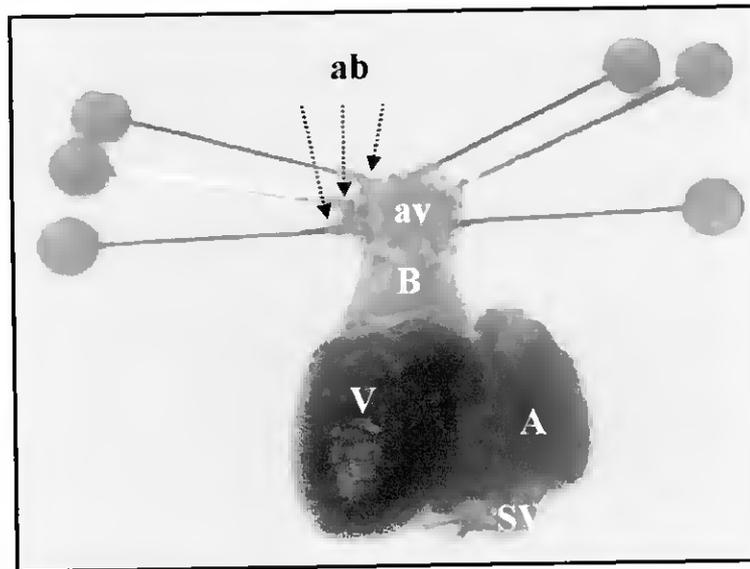


Figura III.1.3 – Coração e aorta ventral de um exemplar da espécie *H. didactylus*: SV - seio venoso; A - aurícula; V - ventrículo; B - bulbo; av - aorta ventral; ab - artérias branquiais.

1.3.2. Descrição microscópica do coração de *H. didactylus*

A observação ao microscópio óptico de preparações histológicas do ventrículo de *H. didactylus*, permitiu definir três zonas, morfologicamente distintas: i) zona **subepicárdica**, ii) zona **miocárdica** e iii) zona **subendocárdica** (Fig. III.1.4).

O epicárdio é constituído por uma camada de células epiteliais achatadas, visíveis no tecido corado com HE. A região subepicárdica é composta por uma camada de tecido conjuntivo, na qual existem fibroblastos, observando-se, por vezes, vasos sanguíneos (Fig. III.1.8). Em cortes corados com PicroSirius, verifica-se que o colagénio é muito abundante nesta região, podendo distinguir-se no tecido conjuntivo dois tipos de colagénio: o col I, mais abundante e corado de vermelho, e o col III, menos abundante e corado de verde (Fig. III.1.7a). Numa posição inferior relativamente ao tecido conjuntivo, situam-se algumas células adiposas (Fig. III.1.4a).

A região do miocárdio é constituída essencialmente por tecido muscular trabeculado, sem orientação específica das fibras musculares. Nesta zona abundam os espaços lacunares, dentro dos quais existem células sanguíneas. Na observação das lâminas com ampliação 1000×, não é possível diferenciar os miócitos mas, no entanto, os seus núcleos são bem visíveis (Fig. III.1.4b). Em todo o miocárdio ocorrem focos de col I e III, sendo o primeiro o mais abundante (Fig. III.1.7b).

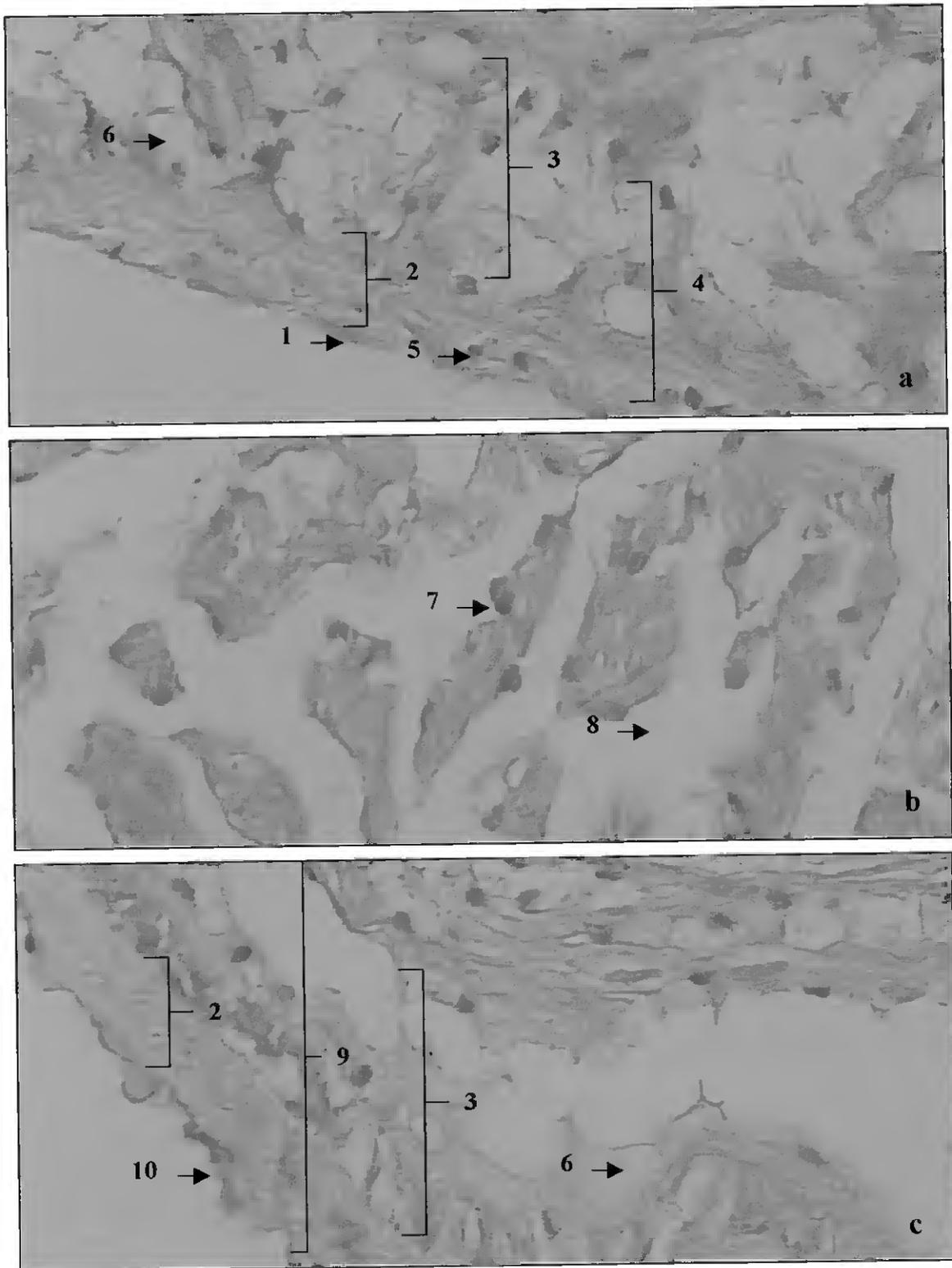


Figura III.1.4 – Imagens obtidas ao microscópio óptico (ampliação 400×) de um corte transverso de ventrículo de *H. didactylus* corado com Hematoxilina-eosina, correspondentes às diferentes zonas da parede: a) epicárdio; b) miocárdio; c) endocárdio; 1 – células epiteliais; 2 – camada de tecido conjuntivo; 3 – camada fibroadiposa; 4 – região subepicárdica; 5 – fibroblasto; 6 – célula adiposa; 7 – núcleo do miócito; 8 – lacuna; 9 – região subendocárdica; 10 – células endoteliais.

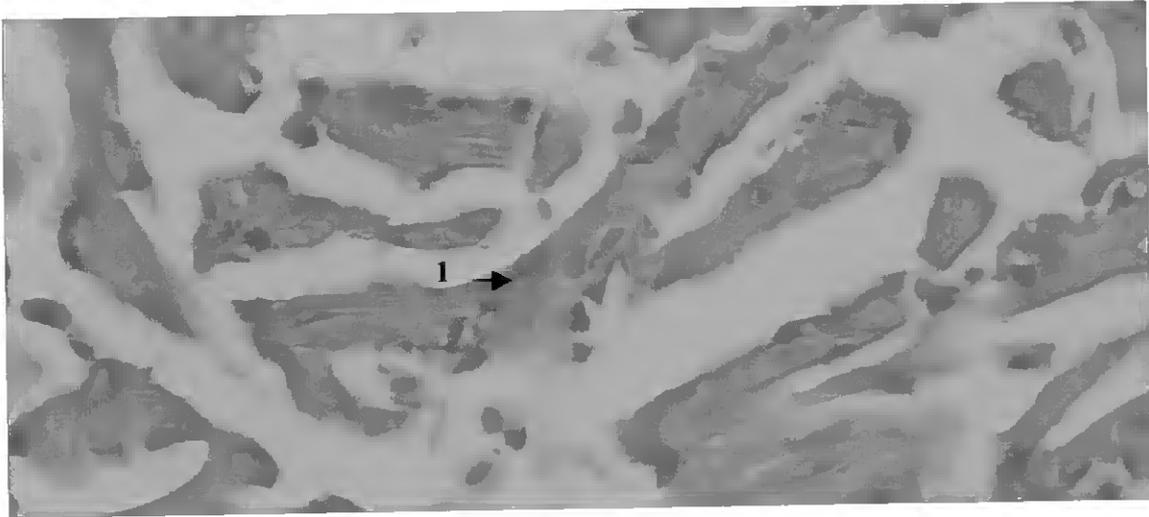


Figura III.1.5 - Imagem obtida ao microscópio óptico (ampliação 400×) da região miocárdica de um corte transverso de ventrículo de *H. didactylus* corado pela reacção do ácido periódico-Shiff: 1 - grânulos de glicogénio no sarcoplasma.

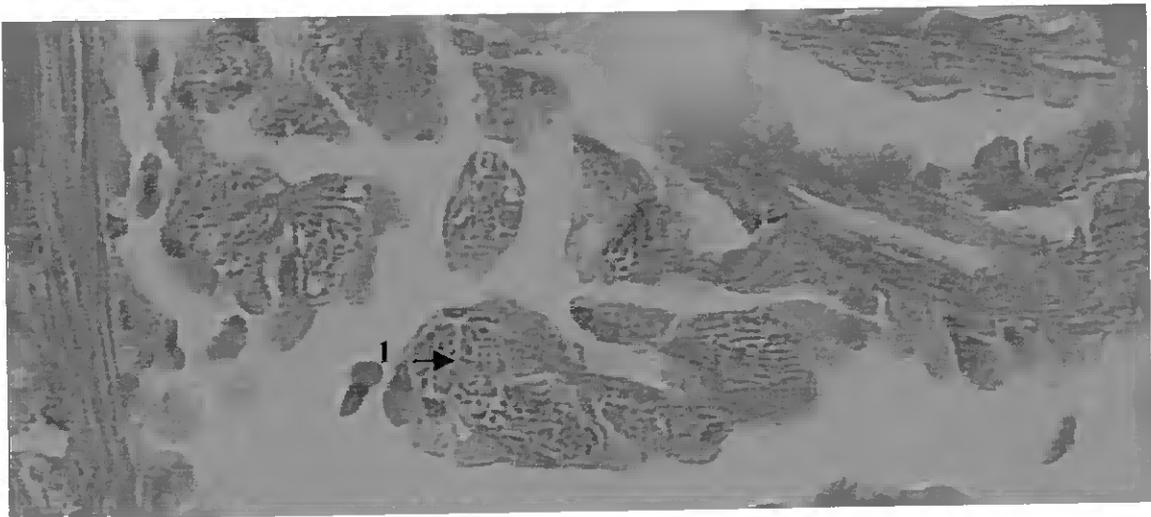


Figura III.1.6 - Imagem obtida ao microscópio óptico (ampliação 400×) da região miocárdica de um corte transverso de ventrículo de *H. didactylus* sujeito à coloração para lípidos: 1 - Gotas lipídicas no sarcoplasma.

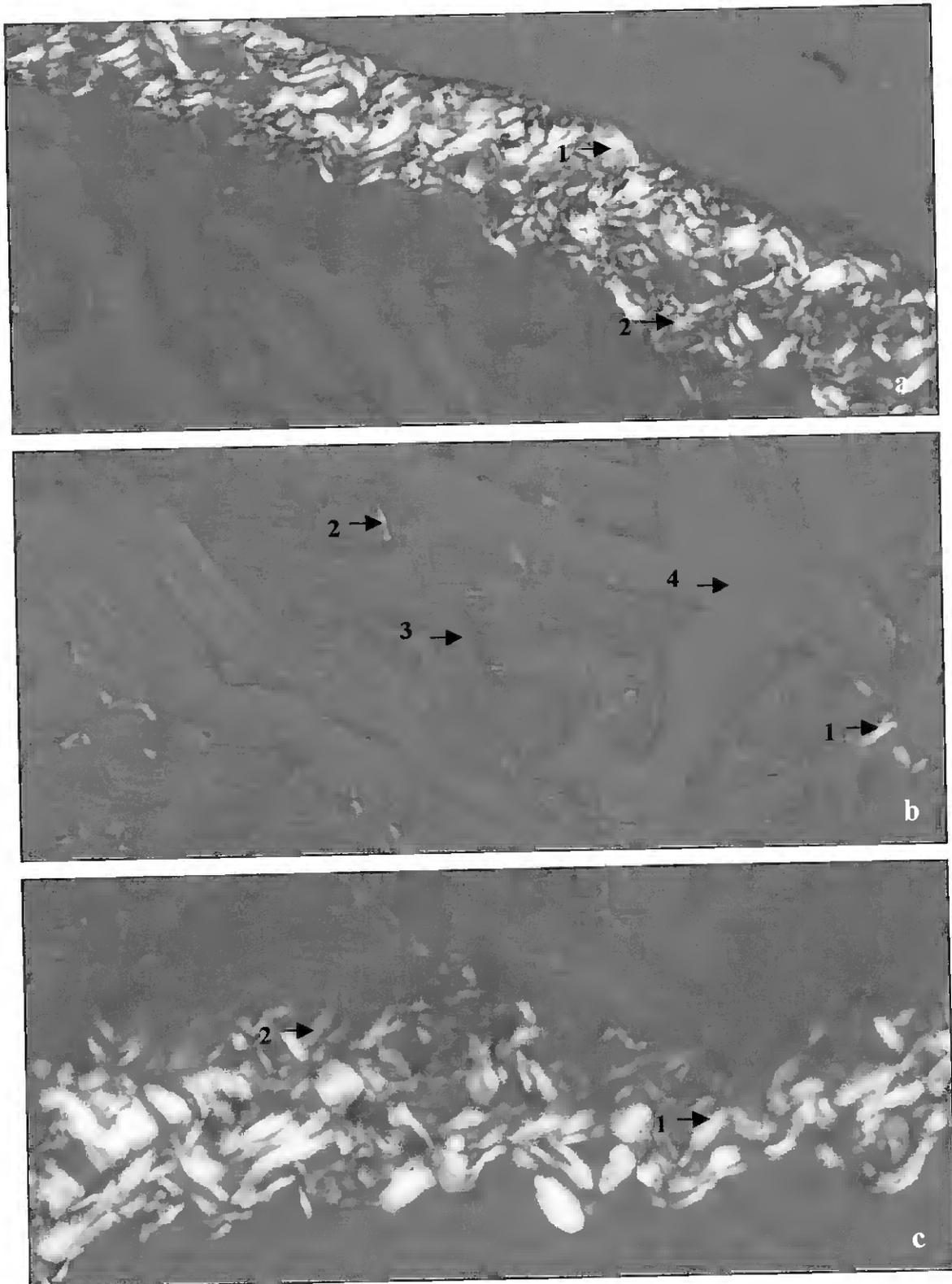


Figura III.1.7 – Imagens obtidas ao microscópio óptico com luz polarizada (ampliação 400×) de um corte transverso de ventrículo de *H. didactylus* corado com Picrosirius, correspondentes às diferentes zonas do ventrículo: a) epicárdio; b) miocárdio; c) endocárdio; 1 - colagénio do tipo I; 2 - colagénio do tipo III; 3 – músculo; 4 - lacuna.

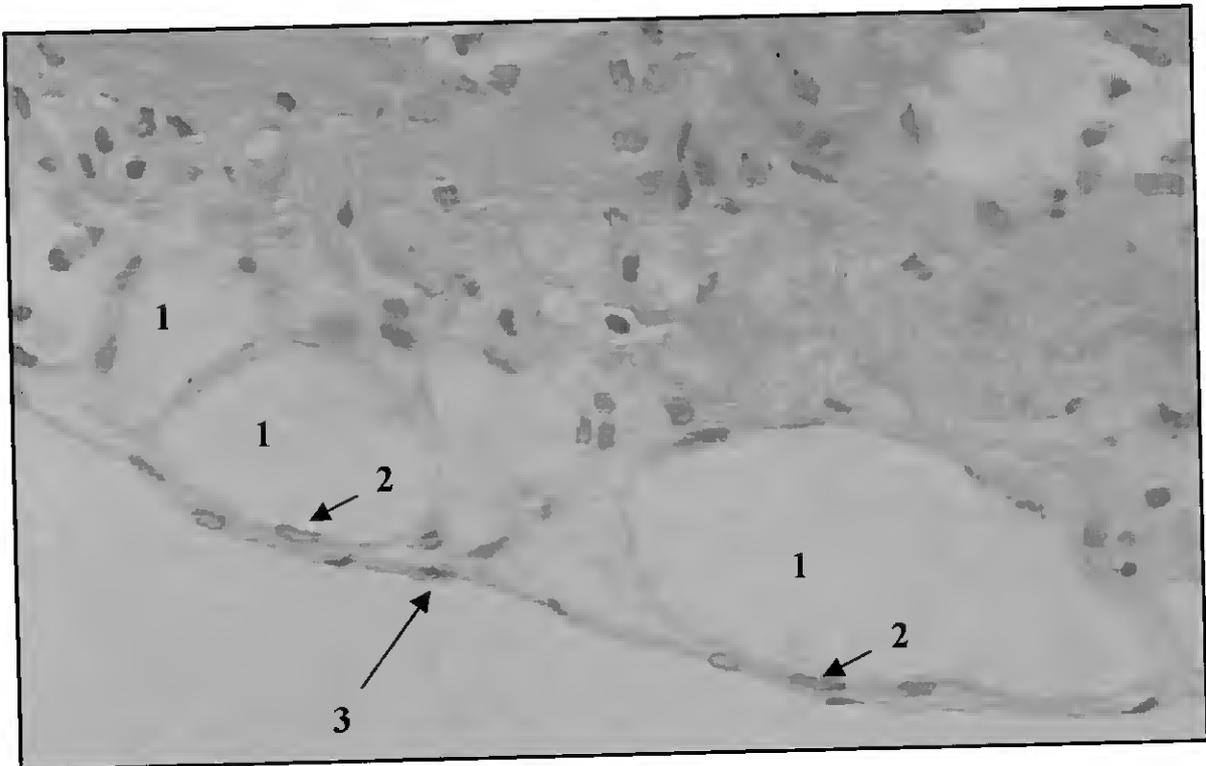


Figura III.1.8 - Imagem obtida ao microscópio óptico de um corte transverso do ventrículo de *H. didactylus* corado com Hematoxilina-eosina (ampliação 1000×): 1 - capilares subendocárdicos; 2 - célula endotelial da parede do capilar; 3 - células endoteliais endocárdicas.

No sarcoplasma do miocárdio corado com PAS, identificam-se pequenas granulações coradas de magenta, que correspondem a glicogénio (Fig. III.1.5). Por outro lado, no sarcoplasma do tecido miocárdico sujeito a coloração para gordura, podem observar-se pequenas gotas lipídicas dispersas, coradas de preto. Estas acumulações de lípidos são mais facilmente visíveis nas fibras musculares cortadas transversalmente (Fig. III.1.6).

A região endocárdica é formada por uma camada de células endoteliais achatadas. A constituição da zona subendocárdica é correspondente à da zona subepicárdica, embora as camadas descritas sejam, por vezes, mais finas (Fig. III.1.4c, III.1.7c).

Tendo em conta que a espécie *H. didactylus* apresenta um ventrículo sacular, totalmente constituído por tecido esponjoso, com pequenos vasos apenas na região mais externa da parede, o seu coração insere-se no tipo I b, segundo a classificação de Tota *et al.* (1983).

1.3.3. Fracção de área dos componentes da parede ventricular

Neste trabalho foi também determinada a fracção de área dos componentes da parede ventricular, tendo por base os cortes histológicos corados com PicroSirius. Neste cortes

distinguem-se três componentes: o col I, de cor vermelha, o col III, de cor verde e o tecido muscular, de cor azul escura. As lacunas apresentam uma coloração azul clara (Fig. III.1.7a).

Tendo em conta que a distribuição de colagénio não é uniforme em toda a parede, foram analisadas separadamente imagens contendo as regiões subepicárdica, miocárdica e subendocárdica. As regiões da periferia da parede, regiões subepicárdica e subendocárdica, são extremamente ricas em colagénio, principalmente o col I. Na primeira, a percentagem de col I varia entre 14,0 e 27,6 %, o col III constitui 0,43 a 1,87 % e o tecido muscular ocupa a maior parte da área total, de 37,7 a 61,1%. As imagens que contêm a região subendocárdica possuem 5,4 a 27,2 % de col I, 0,14 a 3,05 % de col III e 29,7 a 70,5 % de tecido muscular (tabela III.1.1, Fig. III.1.9).

No miocárdio ocorrem menores percentagens de col I (0,26 e 8,8 %), no entanto as percentagens de col III são semelhantes às encontradas nas regiões epicárdica e subepicárdica (0,77 a 1,18 %). O tecido muscular ocupa no miocárdio, entre 28,4 a 66,2 % da área total (tabela III.1.1, Fig. III.1.9). Verificaram-se diferenças significativas para o col I e III ao longo da parede ventricular ($p < 0,05$).

Tabela III.1.1 – Percentagem de área ocupada pelos componentes do tecido cardíaco de *H. didactylus* (n=10), nas três regiões da parede ventricular: subepicárdica, miocárdica e subendocárdica.

Região do ventrículo	Componente	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
Subepicárdica	Col I ¹	14,00	27,65	19,48	4,57
	Col III ²	0,43	1,87	1,07	0,51
	Músculo	37,68	61,06	45,76	8,35
Miocárdica	Col I	0,26	8,83	2,76	2,66
	Col III	0,18	0,77	0,32	0,18
	Músculo	28,37	66,18	50,81	11,99
Subendocárdica	Col I	5,35	27,17	17,89	8,33
	Col III	0,14	3,05	1,59	1,04
	Músculo	29,69	70,48	50,08	11,75

¹ colagénio do tipo I, ² colagénio do tipo III

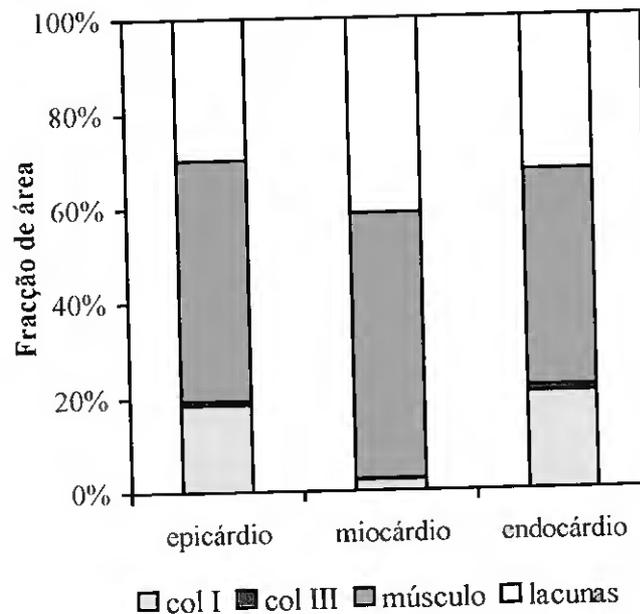


Figura III.1.9 – Fração de área dos elementos estruturais do tecido ventricular de *H. didactylus* (n=10): colagénio I (col I), colagénio III (col III), tecido muscular (músculo) e espaços lacunares (lacunas), em três regiões da parede - epicárdio, miocárdio e endocárdio.

1.4. DISCUSSÃO

Neste estudo abordaram-se alguns aspectos morfológicos do coração de *H. didactylus*. Esta espécie apresenta um coração com ventrículo de forma sacular, totalmente constituído por tecido esponjoso e com pequenos vasos na região mais externa da parede. Estas características estão de acordo com as descritas para os corações do tipo Ib, segundo a classificação de Tota *et al.* (1983). Os corações do tipo I são os mais simples dentro do grupo dos peixes, cuja complexidade máxima é representada pelos corações do tipo IV, característicos de espécies de elevada actividade, como os grandes pelágicos (Tota *et al.*, 1983; Farrell, 1991a). O coração do tipo I é característico de espécies pouco activas, de vida sedentária, como se verifica na espécie *H. didactylus*.

Outro aspecto importante, que apresenta grande variabilidade dentro do grupo dos peixes, é a MVR. Normalmente as espécies de elevada actividade possuem corações com grandes ventrículos e uma MVR elevada. Neste estudo verificou-se que a espécie *H. didactylus* apresenta uma MVR baixa (0,067 %) quando comparada com outros peixes de

elevada actividade (Farrell e Jones, 1992), mas similar a outras espécie com as mesmas características ecofisiológicas.

Foi observado que os vários elementos estruturais do miocárdio se distribuem de forma distinta, apresentando dois padrões de distribuição característicos: o col I, distribui-se de forma heterogénea, com valores de percentagem de área superiores no epicárdio e no endocárdio; o col III, com distribuição homogénea e valores de percentagem de área inferiores aos de col I. O tecido muscular, também apresenta distribuição homogénea e é o elemento mais abundante da parede. Estas diferenças estruturais provavelmente interferem com a construção da imagens ecocardiográficas uma vez que constituem descontinuidades de densidade do tecido e, por isso, vão ajudar à definição das estruturas. De facto, as imagens ecocardiográficas deste modelo experimental apresentam uma excelente definição, tanto do contorno externo do ventrículo, quanto do endocárdio, provavelmente devido à elevada abundância de colagénio nestas regiões. Vários trabalhos sugeriram que o conteúdo em colagénio do tecido pode influenciar o comportamento dos ultra-sons e contribuir de forma determinante para a construção da imagem ultrasonográfica (O'Brien, 1977; Mimbs *et al.*, 1980).

1.5. CONCLUSÕES

A espécie *H. didactylus* apresenta um coração do tipo Ib, com forma sacular, miocárdio exclusivamente esponjoso e baixa massa ventricular relativa. Em termos histológicos distinguem-se três regiões com características distintas ao longo da parede ventricular: epicárdio, miocárdio e endocárdio. A maior abundância de colagénio nas regiões externa e interna da parede, pode ser responsável por uma maior ecodensidade dessas zonas e, conseqüentemente, por uma boa definição contorno da câmara ventricular nas imagens ecocardiográficas 2D. Por outro lado, o arranjo aleatório das fibras musculares, além da presença de zonas lacunares que permitem a irrigação das células do miocárdio ventricular, deve ser tido em conta na avaliação do padrão de contracção do ventrículo desta espécie.

2. CARACTERIZAÇÃO TECIDULAR DO MIOCÁRDIO VENTRICULAR - ANÁLISE DENSITOMÉTRICA

2.1. INTRODUÇÃO

Os componentes do tecido cardíaco existem normalmente num estado de equilíbrio, baseado nas suas proporções relativas, integridade estrutural, arranjo físico e características bioquímicas. Este equilíbrio é responsável pelo comportamento mecânico do miocárdio e garante a sua viabilidade celular. Alterações deste equilíbrio podem ser induzidas por várias situações fisiopatológicas e podem comprometer toda a estrutura e interferir na função cardíaca. Deste modo, a caracterização tecidular do miocárdio contribui de forma importante para a compreensão dos factores que determinam a função cardíaca.

Nos peixes, a câmara ventricular apresenta várias formas e mioarquitecturas que diferem de acordo com a actividade metabólica das espécies: espécies de elevada actividade metabólica apresentam corações piramidais, com miocárdio misto (ex: atum), enquanto espécies de baixa actividade metabólica apresentam corações saculares, com miocárdio exclusivamente trabecular (ex: charroco) (Tota *et al.*, 1983; Tota, 1989; Davie e Farrell, 1991; Harrison *et al.*, 1991; Sanchez-Quintana *et al.*, 1996; Tota e Gattuso, 1996). A maior eficiência contráctil associada aos corações piramidais, poderá resultar não só dum arranjo mais organizado das fibras do miocárdio, mas também da crescente complexidade da rede de tecido conjuntivo intramiocárdico. Até ao presente, a caracterização do tecido cardíaco nestes animais foi sempre efectuada por análise histológica, o que implica o sacrificio do animal. Esta abordagem tem permitido descrever o arranjo tecidular do ventrículo, mas não possibilita o acompanhamento das alterações estruturais do miocárdio ventricular num determinado indivíduo, ao longo do tempo.

A ecocardiografia bidimensional (2D), além de permitir obter parâmetros hemodinâmicos e morfométricos indicadores da função cardíaca, apresenta também potencialidades para a caracterização tecidular do miocárdio. As imagens ecocardiográficas 2D são definidas por convenção segundo uma distribuição espectral de cinzentos correspondente à estrutura parietal tecidular miocárdica, epicárdica, endocárdica e valvular. Uma vez que o meio sanguíneo é não ecogénico, em condições normais de fluxo, as cavidades cardíacas e o lúmen vascular são integralmente preenchidos pela cor

negra, segundo um padrão homogéneo (Coucelo *et al.*, 1996). Pelo contrário, a constituição tecidual do órgão cardíaco é heterogénea e de grande complexidade, mesmo em indivíduos sem evidência de patologia cardíaca. A ultraestrutura deste tecido apresenta uma correspondência directa com as características da imagem em relação à distribuição da intensidade densitométrica de cinzentos na imagem ecocardiográfica 2D. Assim, as características ecogénicas dos componentes celulares da parede do ventrículo podem ser avaliadas mediante a análise densitométrica da escala de cinzentos das imagens de ecocardiografia 2D.

A densitometria miocárdica ecocardiográfica 2D é uma das novas técnicas disponíveis para a caracterização tecidual do miocárdio, apresentando um enorme potencial na avaliação de patologias cardiovasculares que envolvam alterações tecidulares (Azevedo *et al.*, 1995). Distintas variáveis estatísticas, descritivas da distribuição de valores de cinzentos de regiões de interesses seleccionadas nas imagens, têm sido utilizadas para caracterizar aspectos estruturais do miocárdio e para avaliar alterações fisiopatológicas. No entanto, a falta de uniformização das condições técnicas de recolha e de análise das imagens tem dificultado a sua implementação clínica. De entre as condicionantes deste método destacam-se as condições técnicas da imagem e do operador. Assim, torna-se importante determinar a reproductibilidade da técnica, nomeadamente avaliando a variabilidade inter e intra-observador e ainda verificar a homogeneidade das características densitométricas da imagem nas diferentes regiões da parede ventricular e ao longo do ciclo cardíaco.

O objectivo deste estudo foi analisar a reproductibilidade da avaliação densitométrica de imagens ecocardiográficas 2D do ventrículo de *Halobatrachus didactylus*, de modo a definir critérios de utilização desta técnica para a análise tecidual não-invasiva. Os factores analisados foram a variabilidade inter e intra-observador, a localização axial da região de interesse e ainda a variação fásica ao longo do ciclo cardíaco.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Grupo experimental

Neste estudo foram incluídos 6 indivíduos da espécie *H. didactylus*, 3 machos e 3 fêmeas, com pesos entre 270 e 940 g. A metodologia utilizada nos exames

ecocardiográficos encontra-se descrita no Capítulo II e, para este estudo em particular, foi utilizado o ecógrafo *Aloka SSD 830* com sonda de 5 MHz, com adaptador vascular.

2.2.2. Metodologia ecocardiográfica

Foram registadas imagens 2D, em incidência transversal, na zona média do ventrículo, com escala de profundidade de 6 cm. Todas as imagens foram captadas nas mesmas condições e consideradas óptimas em termos de ganho e contraste. Foram seleccionadas imagens individuais que foram digitalizadas para equipamento informático *IBM PC* com placa *Truevision Targa+ M8*, com 512×512 pixels e 8 bits de resolução e foram gravadas em ficheiros TIFF (*Tagget Image File Format*).

2.2.3. Metodologia densitométrica

O estudo densitométrico baseia-se na análise de frequência de pixels, numa região de interesse (RI) na imagem, na escala adimensional de cinzentos. A escala de cinzentos abrange um intervalo de 256 valores, desde o negro (valor 0 na escala de intensidade luminosa) até ao branco (valor 255 na escala de intensidade luminosa). Nas imagens ecocardiográficas o negro corresponde ao meio sanguíneo (ex: lúmen ventricular), enquanto o branco corresponde às zonas mais ecodensas. Como tal, o aumento do valor de cinzento corresponde a um aumento de densidade do tecido. A análise densitométrica foi realizada com aplicação de um programa de análise de imagem, *Optimas 5.0 Bioscan*. Este programa disponibiliza para cada RI seleccionada, um histograma de perfil espectral de intensidade luminosa, em que o eixo das abcissas apresenta a escala de cinzentos e o eixo das ordenadas apresenta a frequência de pixels da imagem para cada valor de intensidade luminosa (Fig. III.2.1). Além disso, são ainda disponibilizados vários parâmetros estatísticos da distribuição: média, desvio padrão, variância, máximo e mínimo e número de pixels da RI analisados.

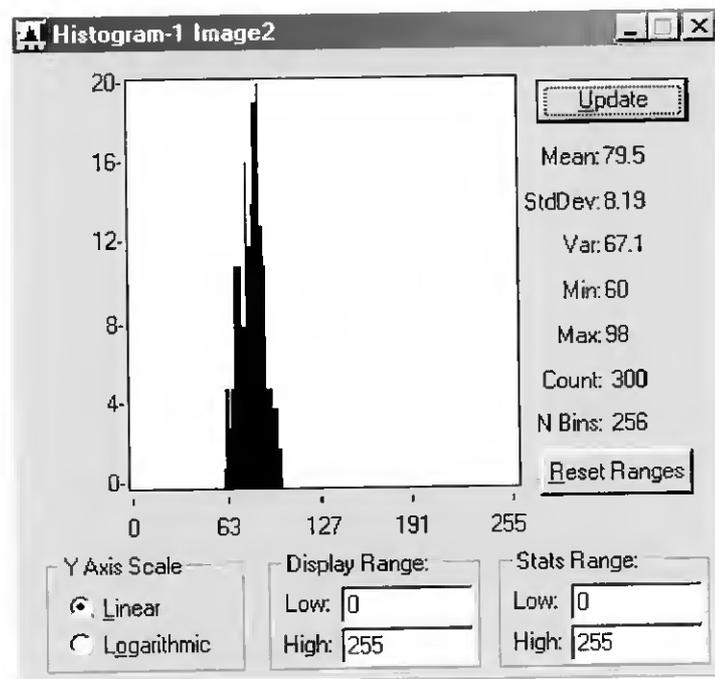


Figura III.2.1 – Janela do programa *Optimas* com histograma de frequência de pixels (yy), em função da escala adimensional de cinzentos (xx), da região de interesse seleccionada e respectivos parâmetros estatísticos da distribuição: média (mean), desvio padrão (stddev), variância (var), máximo (max) e mínimo (min), número de pixels (counts) analisados e número de valores da escala apresentados no histograma e utilizados na estatística (n bins).

2.2.4. Variação inter-axial e cíclica

Para verificar a homogeneidade densitométrica das várias regiões da parede ventricular, em cada imagem foram analisados regiões de interesse que abrangessem aproximadamente a totalidade da espessura da parede, com tamanhos entre 15×20 e 20×40 pixels, em quatro pontos fixos da imagem: 0, 3, 6 e 9 horas, correspondendo à região ventral, lateral direita, dorsal e lateral esquerda, respectivamente (Fig. III.2.2).

A variação densitométrica das imagens ecocardiográficas ao longo do ciclo cardíaco foi avaliada em imagens seleccionadas no fim da sístole (telesístole) e no fim da diástole (telediástole) (Fig. III.2.3). Estes intervalos do ciclo cardíaco foram reconhecidos através do registo electrocardiográfico e da observação visual do movimento das estruturas. Foram seleccionadas imagens individuais em três ciclos cardíacos consecutivos e para cada uma das fases.

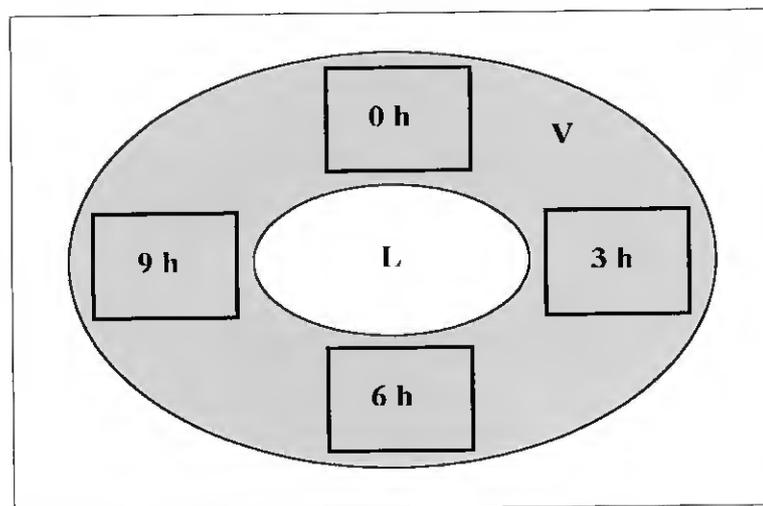


Figura III.2.2 – Representação esquemática de uma imagem em curto eixo do ventrículo de *H. didactylus* obtida por ecocardiografia 2D, indicando a localização das regiões de interesse: 0, 3, 6 e 9 horas, correspondendo à região ventral, lateral direita, dorsal e lateral esquerda, respectivamente; V – parede ventricular e L – lúmen ventricular.

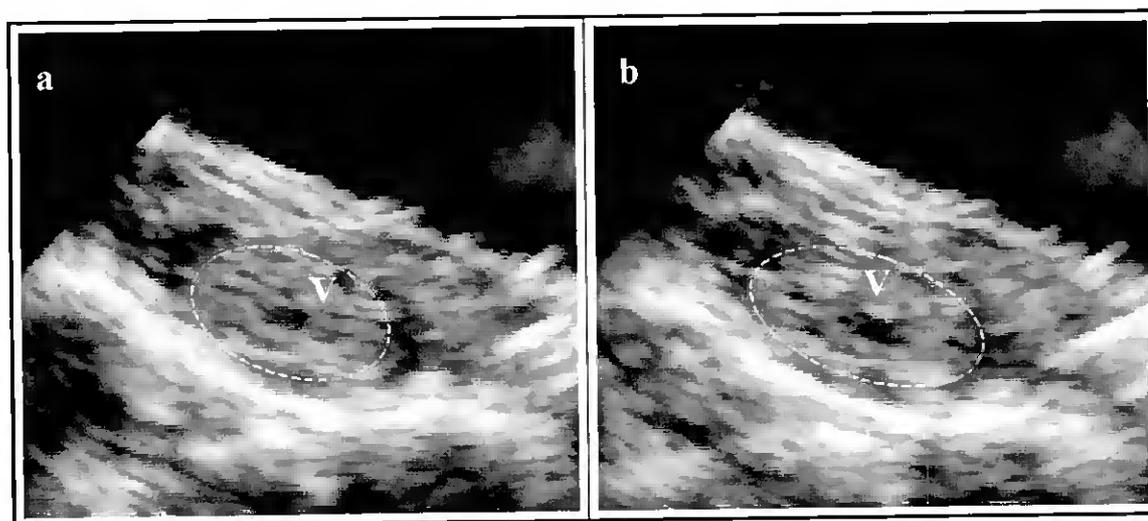


Figura III.2.3 – Imagens ecocardiográficas 2D em curto eixo do ventrículo de *H. didactylus* utilizadas no estudo densitométrico em telesístole (a) e telediástole (b): V – parede ventricular.

2.2.5. Variação intra e inter-observador

Para avaliar a interferência do observador na avaliação densitométrica realizada, após a escolha e digitalização das imagens, todas as determinações densitométricas foram efectuadas por dois observadores (variação inter-amostrador) e pelo mesmo observador em duas ocasiões distintas (variação intra-amostrador).

2.2.6. Análise estatística

Os valores densitométricos apresentados representam valores médios de medições efectuadas em 5 ciclos cardíacos consecutivos. Foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis para verificar a variabilidade inter-axial em sístole e diástole e o teste de Mann-Whitney foi aplicado para analisar a variação cíclica, por comparação dos valores densitométricos de RIs na mesma zona da parede em sístole e diástole. A análise de regressão linear simples foi aplicada para avaliar a correlação intra e inter-observador. As correlações foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Variação inter-axial e cíclica

No presente estudo foi efectuada a análise densitométrica das paredes do ventrículo de *H. didactylus* em imagens ecocardiográficas 2D, em incidência transversal. Os valores médios das distribuições obtidas em regiões de interesse seleccionadas em quatro zonas axiais da parede (0, 3, 6 e 9 horas, correspondendo às zonas ventral, lateral direita, dorsal e lateral esquerda, respectivamente), em imagens seleccionadas em telesístole e telediástole, encontram-se resumidos na tabela III.2.1. Verificou-se que, quer em telesístole como em telediástole, o valor de cinzentos mais elevado foi obtido na região dorsal do ventrículo (101,7 e 115,1, respectivamente), correspondendo à zona inferior do ventrículo na imagem ecocardiográfica 2D. A análise comparada dos valores obtidos nas várias regiões da parede revelou diferenças axiais significativas ($p < 0,05$) em ambos os momentos do ciclo cardíaco analisados. Considerando todos os valores densitométricos obtidos, independentemente da localização da RI, não se verificaram diferenças significativas entre as imagens seleccionadas em telesístole e telediástole (78,8 e 81,9, respectivamente). No entanto, tendo em conta a localização da região de interesse verificaram-se diferenças cíclicas significativas ($p < 0,05$) para a região dorsal da parede ventricular. Estes resultados revelam que existem diferenças das características densitométricas das imagens ecocardiográficas 2D do ventrículo de *H. didactylus*, em diferentes regiões da parede e em diferentes momentos do ciclo cardíaco.

Tabela III.2.1 – Valores densitométricos adimensionais obtidos de imagens ecocardiográficas bidimensionais do ventrículo de *H. didactylus* (n=6), em telesístole e telediástole em quatro zonas da parede.

Indiv.	Telesístole				Telediástole			
	0h ¹	3h ²	6h ³	9h ⁴	0h ¹	3h ²	6h ³	9h ⁴
1	84,7	85,0	92,7	76,0	80,7	73,7	102,7	70,7
2	82,8	80,6	99,7	89,6	96,9	85,6	119,4	81,8
3	81,1	90,3	114,6	102,2	92,3	81,2	123,0	79,9
4	98,0	98,0	101,4	89,6	97,8	95,1	119,9	94,3
5	96,7	88,3	105,0	96,4	103,0	87,0	124,5	102,3
6	81,7	78,9	96,9	79,4	94,1	87,6	101,3	81,4
Média	87,5	86,8	101,7	88,9	94,1	85,0	115,1	85,0
Desvio p.	7,7	7,0	7,6	9,9	7,5	7,1	10,4	11,3

¹ zona ventral, ² zona lateral direita, ³ zona dorsal, ⁴ zona lateral esquerda.

2.3.2. Variação intra e inter-observador

Para avaliar a interferência do observador na avaliação densitométrica realizada, foram estudadas as variações intra e inter-observador (Fig. III.2.4). Verificou-se que os dados densitométricos obtidos, quer pelo mesmo observador em duas ocasiões distintas, quer por dois observadores diferentes, apresentam uma correlação positiva ($p < 0,05$) indicando a independência dos dados obtidos relativamente ao observador.

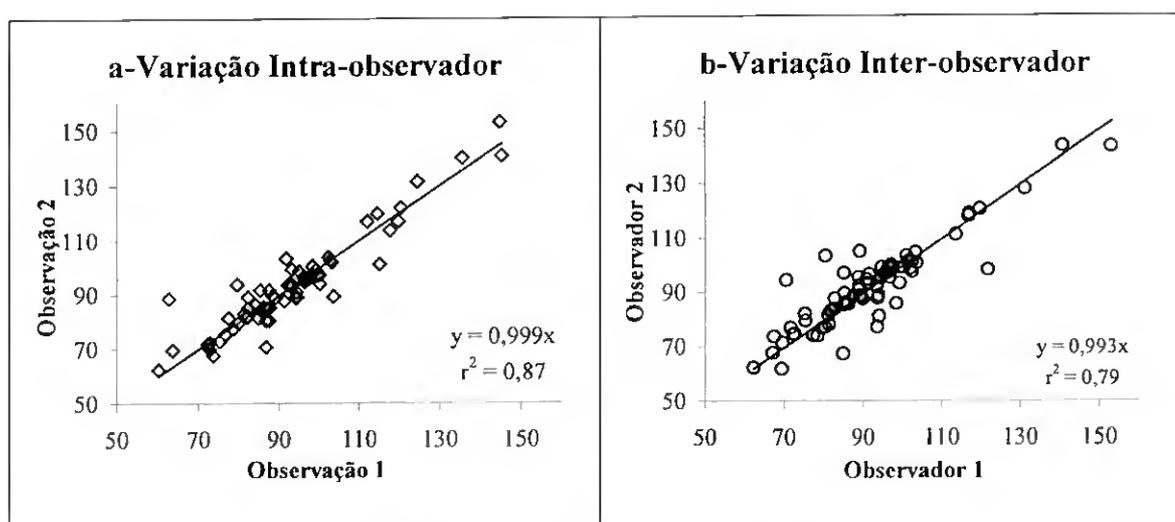


Figura III.2.4 – Gráficos representativos da correlação dos valores densitométricos de imagens ecocardiográficas 2D da parede do ventrículo de *H. didactylus*, obtidos pelo mesmo observador em duas ocasiões distintas (a - variação intra-amostrador) e por dois observadores diferentes (b - variação inter-observador).

2.4. DISCUSSÃO

O estudo da análise quantitativa da textura ecocardiográfica baseia-se na princípio de que qualquer alteração na textura da imagem é função de uma alteração ocorrida na estrutura tecidual (Skorton *et al.*, 1983a). Esta alteração poderá ser devida à modificação dos componentes tecidulares ou ainda a alterações introduzidas pelo processo de contractilidade (encurtamento das fibras musculares do miocárdio).

Este estudo pretendeu analisar a reproductibilidade da avaliação densitométrica de imagens ecocardiográficas 2D do ventrículo de *H. didactylus*, de modo a definir critérios de utilização desta técnica para detectar, não-invasivamente, alterações tecidulares ocorridas no tecido cardíaco devido a várias situações, quer de adaptação fisiológica, quer patológica. Os factores analisados foram a localização axial da região de interesse, a variação fásica ao longo do ciclo cardíaco e a variabilidade inter e intra-observador. Verificou-se que a análise espectral quantitativa densitométrica das imagens ecocardiográficas 2D do tecido das paredes do ventrículo é exequível e que existem diferenças das características densitométricas do ventrículo de *H. didactylus*, em diferentes regiões da parede e em diferentes momentos do ciclo cardíaco.

As imagens ecocardiográficas 2D do ventrículo são construídas segundo uma escala de cinzentos, em que as zonas mais escuras correspondem a zonas de tecido de menor densidade, como o tecido sanguíneo, enquanto as zonas mais claras correspondem a zonas mais densas. Neste trabalho, obtiveram-se diferenças significativas em diferentes zonas da parede ventricular, com valores densitométricos mais elevados na região dorsal, quer em sístole, quer em diástole. Estas observações poderão ser devidas a uma zona de maior ecodensidade da imagem, na zona mais externa da parede, gerada pelo elevado conteúdo em colagénio do epicárdio (ver Capítulo III.1). Este factor, em conjunto com a também elevada ecodensidade do pericárdio (zona inferior da imagem), poderá gerar um artefacto na construção da imagem, conduzindo aos valores densitométricos elevados, observados na região dorsal.

Por outro lado, o estudo comparado dos valores densitométricos obtidos de imagens em telesístole e telediástole revelou uma variação fásica da distribuição espectral de cinzentos da imagem da parede do ventrículo ao longo do ciclo cardíaco. Estes resultados traduzem as modificações introduzidas pelo processo contráctil do miocárdio ventricular e documentam a sensibilidade desta técnica. Observações similares foram descritas para o coração humano em várias situações consideradas normais e na presença de várias

patologias (Madaras *et al.*, 1983; Skorton *et al.*, 1983b; Olshansky *et al.*, 1984; Masuyama *et al.*, 1989; Azevedo *et al.*, 1995; Coucelo *et al.*, 1996). Estes estudos revelaram que, apesar da base fisiológica para a variação física da energia reflectida pelo miocárdio não estar esclarecida, a função contráctil dos miócitos deverá contribuir de forma determinante para esta variação.

A análise quantitativa da textura de imagens ecocardiográficas 2D foi efectiva na identificação de várias patologias com repercussão significativa sobre a estrutura do miocárdio, em modelos animais (Skorton *et al.*, 1983a e b) e no homem (Pinamonti *et al.*, 1989; Chandrasekaran *et al.*, 1989; Wong, 1992; Picano *et al.*, 1993; Azevedo *et al.*, 1995; Lieback *et al.*, 1996; Di Bello *et al.*, 1997 e 1999). Esta técnica poderá ser de grande utilidade para avaliar alterações tecidulares do ventrículo do modelo experimental utilizado neste estudo. A análise densitométrica de imagens ecocardiográficas 2D permite estudar alterações estruturais globais ou locais, dependendo da escolha da localização e do tamanho da RI na parede ventricular.

Tendo em conta que existem diferenças densitométricas das imagens obtidas ao longo do ciclo cardíaco e ainda em diferentes zonas da parede ventricular, estes aspectos devem ser tidos em consideração em estudos comparativos que pretendam avaliar alterações estruturais do miocárdio. Como tal, as regiões de interesse devem ser seleccionadas na mesma zona da parede ventricular e na mesma fase do ciclo cardíaco.

Para avaliar a reproductibilidade da técnica densitométrica relativamente ao observador foi efectuado o estudo da variação intra e inter-observador. A análise de imagem realizada foi feita a partir de imagens comuns, de tal modo que foi eliminado o erro da perda de sinal entre imagens. Na aplicação da técnica descrita, a intervenção do observador fica limitada à definição das características óptimas da imagem e à selecção da região de interesse. Neste trabalho, verificou-se uma correlação significativa intra e inter-observador para a análise espectral quantitativa densitométrica das imagens ecocardiográficas 2D do tecido das paredes do ventrículo do modelo experimental estudado. Este facto documenta a reproductibilidade e a aplicabilidade da técnica densitométrica aplicada a este modelo experimental.

A ecocardiografia 2D permite obter imagens do tecido cardíaco com diferentes graus de valor da escala de cinzentos, que reflectem as características estruturais dos tecidos. A densitometria ecocardiográfica 2D utilizada neste estudo revelou-se uma técnica aplicável, sensível e reprodutível para o estudo da caracterização tecidular do miocárdio da espécie *H. didactylus*, que permite realizar uma análise quantitativa das características da imagem.

Definindo o padrão densitométrico destas imagens ao longo do ciclo cardíaco, é possível avaliar alterações tecidulares fisiopatológicas. Portanto, esta técnica apresenta um enorme potencial na avaliação estrutural global e regional do ventrículo. Uma vez implementada, a técnica densitométrica aplicada a imagens ecocardiográficas do tecido cardíaco, permite avaliar alterações fisiopatológicas deste tecido induzidas por alterações ambientais, como a exposição a metais tóxicos.

2.5. CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que a análise espectral quantitativa densitométrica das imagens ecocardiográficas 2D do tecido das paredes do ventrículo é exequível e revelou diferenças nas características densitométricas do ventrículo de *H. didactylus*, em diferentes regiões da parede e em diferentes momentos do ciclo cardíaco. A variação fásica da distribuição espectral de cinzentos, das imagens da parede do ventrículo ao longo do ciclo cardíaco, traduz as modificações introduzidas pelo processo contráctil do miocárdio ventricular e documentam a sensibilidade desta técnica. Tendo em conta que existem diferenças densitométricas em diferentes zonas da parede ventricular, em estudos comparativos as regiões de interesse devem ser seleccionadas na mesma zona da parede.

Neste trabalho verificou-se uma baixa variabilidade intra e inter-observador, o que documenta a reproductibilidade e a aplicabilidade da técnica densitométrica aplicada a este modelo experimental.

3. ESTUDO HEMODINÂMICO NÃO-INVASIVO DA FUNÇÃO SISTÓLICA VENTRICULAR POR ECOCARDIOGRAFIA DOPPLER

3.1. INTRODUÇÃO

O estudo hemodinâmico dos fluxos cardíacos permite determinar importantes parâmetros para avaliar a eficiência cardíaca. Convencionalmente, a hemodinâmica cardíaca tem sido estudada por técnicas invasivas envolvendo o cateterismo. Com o desenvolvimento de técnicas não-invasivas, como a ecocardiografia Doppler, tornou-se possível o estudo dos fluxos intracardíacos, sem as desvantagens das técnicas interventivas (Hatle e Angelsen, 1985; Nishimura *et al.*, 1985). A exactidão dos parâmetros hemodinâmicos determinados por ecocardiografia Doppler tem sido confirmada por determinações simultâneas dos mesmos parâmetros por cateterismo (Pai *et al.*, 1993; Ho *et al.*, 1994; Oh *et al.*, 1994) de tal modo que, hoje em dia, a ecocardiografia Doppler é a técnica mais utilizada para estudos hemodinâmicos em cardiologia e medicina veterinária.

A sístole é a fase do ciclo cardíaco responsável pela contracção ventricular e por gerar a pressão necessária para bombear e distribuir o sangue para a circulação sistémica. O estudo da função sistólica permite avaliar a eficiência do coração na distribuição de oxigénio a todo o organismo.

O estudo hemodinâmico do fluxo sistólico de ejeção ventricular permite determinar importantes parâmetros para caracterizar a função ventricular sistólica, como o volume de ejeção e débito cardíaco, velocidade do fluxo e gradientes de pressão através do orifício de saída do ventrículo, e ainda os intervalos sistólicos (IS). O estudo do volume de ejeção e do débito cardíaco revela a capacidade do ventrículo para bombear sangue, enquanto o gradiente de pressão entre ventrículo e bulbo avalia a sua habilidade para gerar força. Os IS representam a duração das fases sequenciais (eléctricas e mecânicas) que ocorrem ao longo da sístole e reflectem a função ventricular global (Weissler, 1977; Boudoulas, 1990; Atkins e Snyder, 1992). Uma variedade de intervalos temporais, nomeadamente o tempo de pré-ejeção, o tempo de ejeção e o tempo total da sístole, tem sido utilizada para avaliar diversas situações de adaptação fisiopatológica em mamíferos mas nunca foram estudados nos peixes.

Em vertebrados não mamíferos, os estudos hemodinâmicos efectuados por técnicas não-invasivas são muito escassos (Coucelo *et al.*, 1996; Lai *et al.*, 1996 e 1998). Nos peixes, o estudo hemodinâmico do fluxo de ejeção ventricular tem sido feito em preparações de corações isolados perfundidos e *in vivo* através do implante de transdutores Doppler de pressão na aorta ventral.

O objectivo deste trabalho foi a aplicação da ecocardiografia Doppler para o estudo hemodinâmico não-invasivo da função sistólica ventricular, na espécie *H. didactylus*, através da caracterização da velocidade e do gradiente de pressão do fluxo sistólico, do volume de ejeção e débito cardíaco, e ainda dos intervalos sistólicos.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Grupo experimental

Neste estudo foram incluídos 14 indivíduos da espécie *H. didactylus*, 10 machos e 4 fêmeas, com pesos entre 270 e 940 g. A metodologia utilizada nos exames ecocardiográficos encontra-se descrita no Capítulo II e para este estudo em particular foi utilizado o ecógrafo *Acuson Sequoia* com a sonda linear 8L5 (8 MHz de emissão).

3.2.2. Metodologia ecocardiográfica

Para todos os animais foi registado o espectro Doppler de velocidade do fluxo de ejeção ventricular, em vários ciclos cardíacos consecutivos e com registo electrocardiográfico simultâneo, em abordagens sagital e transversal. As imagens foram registadas por Doppler pulsado com 4 MHz de emissão, com a amostra colocada sobre o orifício ventrículo-bulbar a uma profundidade de 7 a 12 mm, com tamanho de 1 a 1,5 mm e ganho de -5 a 2 dB.

3.2.3. Velocidade máxima e gradiente de pressão

A partir dos registos de velocidade do fluxo de ejeção ventricular foi determinada a velocidade máxima do fluxo (m/s), correspondendo ao pico de ejeção (Fig. III.3.1).

O registo de velocidade do fluxo sanguíneo pode ser convertido a gradiente de pressão pela **equação de Bernoulli**, que define hidrodinamicamente o gradiente de pressão gerado através de um orifício (Richards, 1993; Oh *et al.*, 1994; García-Fernández, 2000). Este teorema é complexo mas, do ponto de vista prático, tem sido aplicado à

ecocardiografia Doppler por uma fórmula simplificada, em que o gradiente de pressão (ΔP), em qualquer ponto do coração, se relaciona com a velocidade do fluxo nesse ponto (V):

$$\text{Gradiente de pressão } (\Delta P) = 4V^2 \quad [\text{III.3.1}]$$

A forma simplificada da equação de Bernoulli foi aplicada para determinar o gradiente de pressão entre o ventrículo e o bulbo (mmHg), com base na velocidade máxima do fluxo de ejeção ventricular, registada por ecocardiografia Doppler.

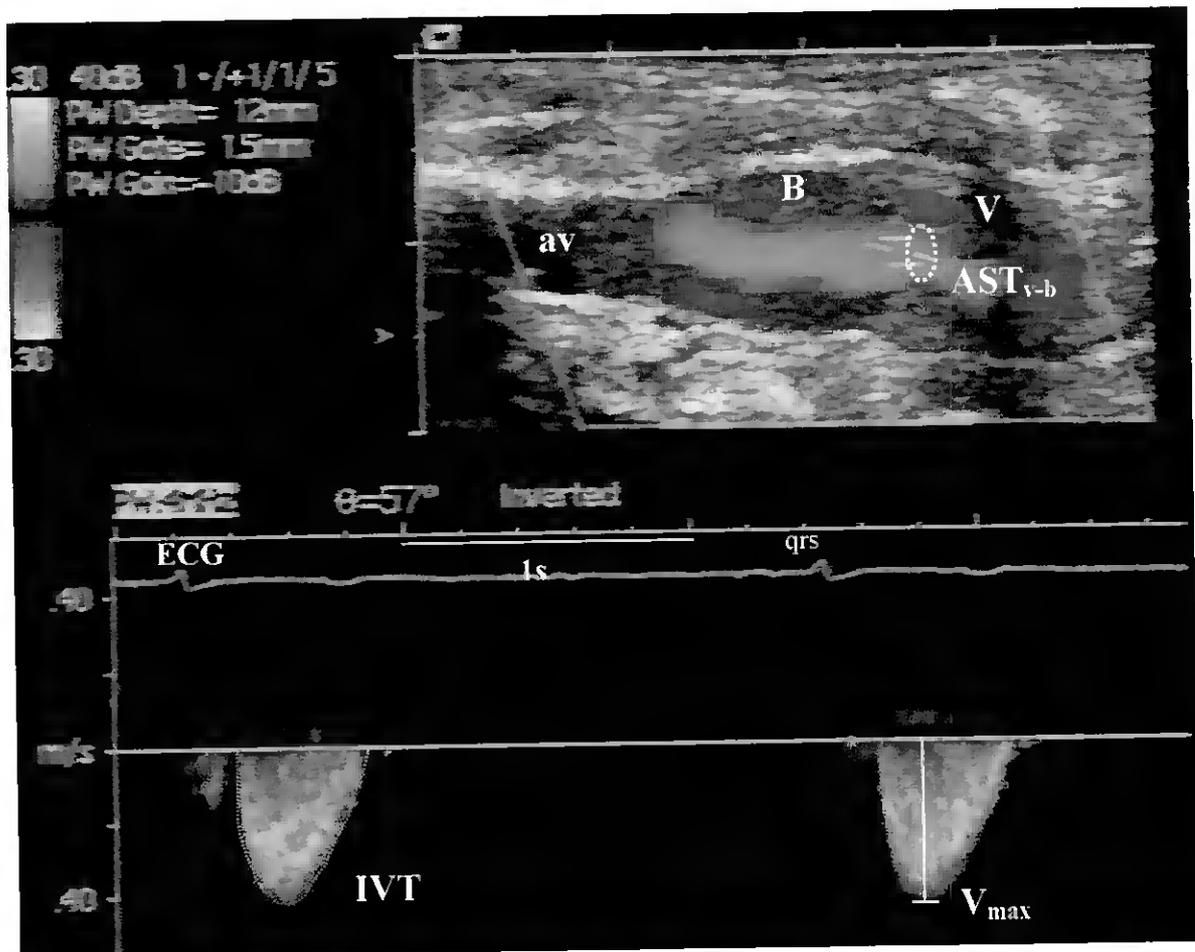


Figura III.3.1 – Imagem ecocardiográfica bidimensional com registo de Doppler-cor e espectro Doppler de velocidade do fluxo de ejeção ventricular de *H. didactylus*, com registo electrocardiográfico (ECG) e indicação da determinação da velocidade máxima do fluxo (V_{\max}), do integral velocidade-tempo (IVT) e da área da secção transversal do orifício ventrículo-bulbar (AST_{v-b}): V - ventrículo; B - bulbo; av - aorta ventral.

3.2.4. Integral velocidade-tempo e volume de ejeção

O volume de um fluxo através de um orifício é igual ao produto da área de secção do orifício pela velocidade do fluxo (Oh *et al.*, 1994; Pai e Shah, 1995). Uma vez que a velocidade do fluxo sistólico varia ao longo do período de ejeção, o fluxo total é obtido por integração das velocidades individuais do espectro Doppler. O volume de ejeção (VE, medido em ml) foi calculado como o produto da área do orifício ventrículo-bulbar (AST_{v-b}) e o integral velocidade-tempo (IVT) do espectro Doppler do fluxo sistólico de ejeção ventricular (Fig. III.3.1):

$$VE = AST_{v-b} \times IVT \quad [III.3.2]$$

A área do orifício (cm^2) é calculada a partir da medição do seu diâmetro, considerando que possui forma circular:

$$AST_{v-b} = \pi r^2 \quad [III.3.3]$$

O IVT (cm) foi calculado utilizando o programa de cálculo do ecógrafo, tendo em conta a área do gráfico velocidade-tempo encerrada pela linha base do espectro Doppler do fluxo.

Nos peixes, tendo em conta que a massa cardíaca apresenta variações intra e inter-específicas consideráveis, o volume de ejeção é normalmente expresso por quilograma de peso corporal, VE_c .

Obtido o valor do VE_c , o **Débito Cardíaco** (DC_c) é calculado como o produto do volume de ejeção pela frequência cardíaca (FC), expresso em ml/min/kg:

$$DC_c = VE_c \times FC \quad [III.3.4]$$

3.2.5. Intervalos sistólicos

A partir dos registos Doppler do fluxo de ejeção ventricular foram definidas quatro fases distintas, dentro do período sistólico do ciclo cardíaco (Fig. III.3.2):

1. **tempo de pré-ejeção** (TPEj), desde o início da despolarização ventricular (onda Q) até ao início da ejeção (iEj);

2. **tempo de ejección** (TEj), desde o início (iEj) até ao fim do registo do fluxo de ejección ventricular (fEj);
3. **tempo de aceleração** (TAcel), desde o início da ejección (iEj) até ao pico de velocidade de ejección ventricular (pEj);
4. **tempo de desaceleração** (TDesacel), desde o pico de velocidade de ejección até ao fim do registo do fluxo de ejección ventricular (fEj).

Foram determinados, em condições basais, os intervalos sistólicos referidos e ainda os tempos totais de sístole e diástole. Estes intervalos foram ainda calculados percentualmente em relação ao intervalo RR e correlacionados com a frequência cardíaca basal de cada indivíduo estudado. A frequência cardíaca foi calculada a partir do intervalo RR.

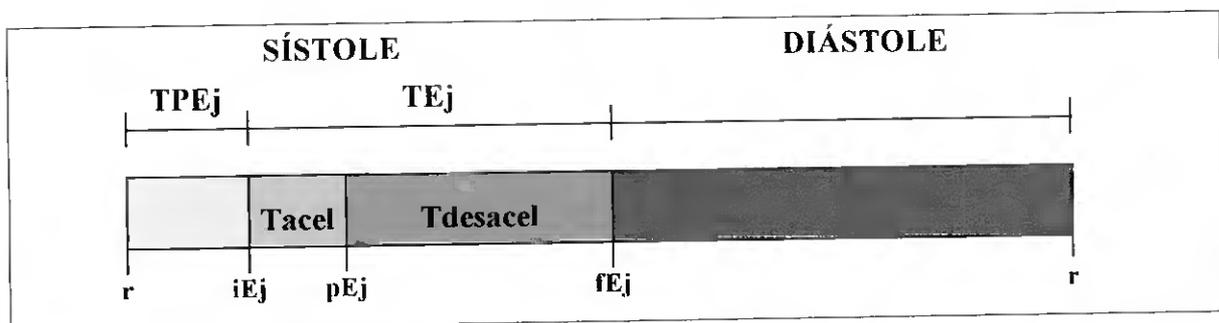


Figura III.3.2 - Esquema representativo dos intervalos sistólicos estudados: tempo de pré-ejeção - TPEj, tempo de ejeção - TEj, com tempo de aceleração - TAccl e tempo de desaceleração - TDesaccl e tempos totais de sístole e diástole (r - onda r; iEj - início de ejeção; pEj - pico de ejeção; fEj - fim de ejeção).

3.2.6. Análise estatística

Os valores apresentados para os vários parâmetros representam valores médios de medições efectuadas em 5 ciclos cardíacos diferentes. Foi efectuada uma análise de regressão linear simples, para avaliar a significância deste modelo, entre a velocidade máxima do fluxo de ejeção e o peso corporal do animal, entre a velocidade máxima do fluxo e a frequência cardíaca e entre os intervalos sistólicos e a frequência cardíaca. As correlações foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Velocidade máxima e gradiente de pressão

Neste trabalho estudaram-se alguns índices de função ventricular sistólica do coração da espécie *H. didactylus*, que foram obtidos a partir do registo espectral de velocidade do fluxo sistólico de ejeção ventricular, efectuado por ecocardiografia Doppler. Este fluxo apresentou um perfil típico, caracterizado por duas fases: aceleração rápida e desaceleração lenta. A V_{\max} deste fluxo variou entre 0,13 e 0,25 m/s e não apresentou uma correlação significativa nem com o peso corporal do animal, nem com sexo, nem com a FC ($p > 0,05$).

A medição da velocidade permitiu determinar, através da equação simplificada de Bernoulli, o gradiente de pressão entre o ventrículo e o bulbo. Este gradiente variou entre 0,07 e 0,25 mmHg (tabela III.3.1).

Tabela III.3.1 – Registo da velocidade máxima e do gradiente de pressão do fluxo de ejeção ventricular de *H. didactylus* (n=14).

Indivíduo	Peso Corporal kg	FC ³ bpm	V_{\max} ¹ m/s	ΔP ² mmHg
1	0,270	44,1	0,15	0,09
2	0,300	40,6	0,13	0,07
3	0,380	53,2	0,18	0,13
4	0,450	47,5	0,15	0,09
5	0,470	55,8	0,22	0,19
6	0,475	34,0	0,20	0,16
7	0,655	26,7	0,23	0,21
8	0,680	36,5	0,13	0,07
9	0,690	46,2	0,18	0,13
10	0,830	44,6	0,20	0,16
11	0,850	27,5	0,18	0,13
12	0,860	50,0	0,22	0,19
13	0,890	32,7	0,25	0,25
14	0,940	51,1	0,20	0,16
Média	0,624	42,2	0,19	0,15
Desvio p.	0,231	9,4	0,04	0,06

¹ Velocidade máxima, ² Gradiente de pressão, ³ Frequência cardíaca

3.3.2. Integral velocidade-tempo e volume de ejeção

Outro importante parâmetro de função sistólica que pode ser determinado a partir do registo hemodinâmico do fluxo de ejeção ventricular, é o volume de ejeção (VE). A partir do registo de velocidade foi calculado o IVT que foi multiplicado pela área do orifício atravessado pelo fluxo para determinar o VE. Com esta abordagem, o VE calculado variou entre 0,054 e 0,304 ml. O VE_c e o DC_c apresentaram valores médios de $0,245 \pm 0,066$ ml/kg e $9,9 \pm 2,0$ ml/min/kg, respectivamente (Tabela III.3.2).

Tabela III.3.2 – Registo do volume de ejeção e do débito cardíaco de *H. didactylus* (n=14).

Indiv.	Peso Corporal kg	FC ⁴ bpm	Diâmetro valvular cm	AST _{v-b} ³ cm ²	IVT ² cm	VE ¹ ml	VE _c ¹ ml/kg	DC _c ¹ ml/min/kg
1	0,270	44,1	0,15	0,018	3,041	0,054	0,199	8,8
2	0,300	40,6	0,17	0,023	2,901	0,066	0,220	8,9
3	0,380	53,2	0,16	0,020	2,412	0,048	0,128	6,8
4	0,450	47,5	0,16	0,020	3,149	0,063	0,141	6,7
5	0,470	55,8	0,17	0,023	4,309	0,098	0,208	11,6
6	0,475	34,0	0,19	0,028	4,400	0,125	0,263	8,9
7	0,655	26,7	0,22	0,038	5,995	0,228	0,348	9,3
8	0,680	36,5	0,25	0,049	3,430	0,168	0,248	9,0
9	0,690	46,2	0,25	0,049	3,736	0,183	0,266	12,3
10	0,830	44,6	0,23	0,042	4,855	0,202	0,243	10,9
11	0,850	27,5	0,25	0,049	5,719	0,281	0,330	9,1
12	0,860	50,0	0,25	0,049	4,502	0,221	0,257	12,8
13	0,890	32,7	0,26	0,053	5,730	0,304	0,342	11,2
14	0,940	51,1	0,30	0,071	3,180	0,225	0,239	12,2
Média	0,624	42,2	0,22	0,038	4,097	0,162	0,245	9,9
Desvio p.	0,231	9,4	0,05	0,016	1,159	0,086	0,066	2,0

⁽¹⁾ determinados a partir do ² integral velocidade-tempo do registo Doppler do fluxo de ejeção ventricular e da ³ área de secção transversal do orifício atravessado pelo fluxo; ⁴ Frequência cardíaca

3.3.3. Intervalos sistólicos

Outro parâmetro que permite avaliar a função sistólica ventricular são os intervalos sistólicos (IS). Neste estudo, foram caracterizados quatro IS e ainda a duração total da sístole e da diástole (Tabela III.3.3). A fase sistólica do ciclo cardíaco é caracterizada por um TPEj curto ($0,163 \pm 0,035$ s), seguido da ejeção (TEj), que ocupa o resto da sístole. O

tempo de ejeção é caracterizado por um período de aceleração curto ($0,092 \pm 0,027$ s) e um tempo de desaceleração longo ($0,273 \pm 0,058$ s).

Tendo em conta que estes intervalos temporais dependem da FC, foi feito o estudo da correlação entre os vários intervalos e a FC (Fig. III.3.3). Verificou-se que os intervalos mais longos – TDesacel, TEj e Sist – diminuem com o aumento da FC, enquanto os intervalos mais curtos – TPEj e TAccl – apresentam uma duração mais ou menos constante, independente das variações da FC. Tendo em conta todo o ciclo cardíaco, verificou-se que a diástole é o intervalo que apresentou a diminuição mais acentuada com a diminuição da duração do ciclo cardíaco, ou seja, com o aumento da FC.

Para verificar se a fracção do ciclo cardíaco ocupada pelos vários intervalos depende da FC, estudou-se a variação percentual de cada intervalo com a FC (Fig. III.3.4). A percentagem do ciclo ocupada pelos diferentes intervalos sistólicos não varia com a FC, com excepção do TPEj, que aumentou com a FC ($p < 0,05$). Relativamente à sístole e diástole, verificou-se também uma correlação significativa com a FC ($p < 0,05$), com um aumento da fracção ocupada pela sístole e uma diminuição para a diástole.

Tabela III.3.3 – Registo dos intervalos sistólicos do coração de *H. didactylus* (n=14).

Indiv.	Peso Corporal kg	FC ⁷ bpm	TPEj ¹ s	TAccl ² s	Tdesacel ³ s	Tej ⁴ s	Sístole ⁵ s	Diástole ⁶ s
1	0,270	44,1	0,159	0,073	0,265	0,338	0,498	0,863
2	0,300	40,6	0,152	0,102	0,264	0,366	0,518	0,960
3	0,380	53,2	0,190	0,043	0,180	0,223	0,413	0,717
4	0,450	47,5	0,129	0,089	0,261	0,350	0,479	0,785
5	0,470	55,8	0,191	0,069	0,257	0,326	0,518	0,558
6	0,475	34,0	0,193	0,087	0,280	0,367	0,560	1,207
7	0,655	26,7	0,191	0,138	0,296	0,434	0,625	1,618
8	0,680	36,5	0,180	0,121	0,319	0,440	0,620	1,027
9	0,690	46,2	0,153	0,114	0,232	0,346	0,499	0,799
10	0,830	44,6	0,113	0,116	0,289	0,405	0,517	0,827
11	0,850	27,5	0,082	0,095	0,434	0,530	0,612	1,569
12	0,860	50,0	0,157	0,089	0,252	0,341	0,498	0,702
13	0,890	32,7	0,197	0,099	0,283	0,382	0,579	1,256
14	0,940	51,1	0,188	0,052	0,213	0,265	0,453	0,727
Média	0,624	42,180	0,163	0,092	0,273	0,365	0,528	0,973
Desvio p.	0,231	9,391	0,035	0,027	0,058	0,075	0,064	0,326

¹ Tempo de pré-ejecção, ² Tempo de aceleração, ³ Tempo de desaceleração, ⁴ Tempo de ejeção, ⁵ Tempo total da sístole, ⁶ Tempo total da diástole, ⁷ Frequência cardíaca

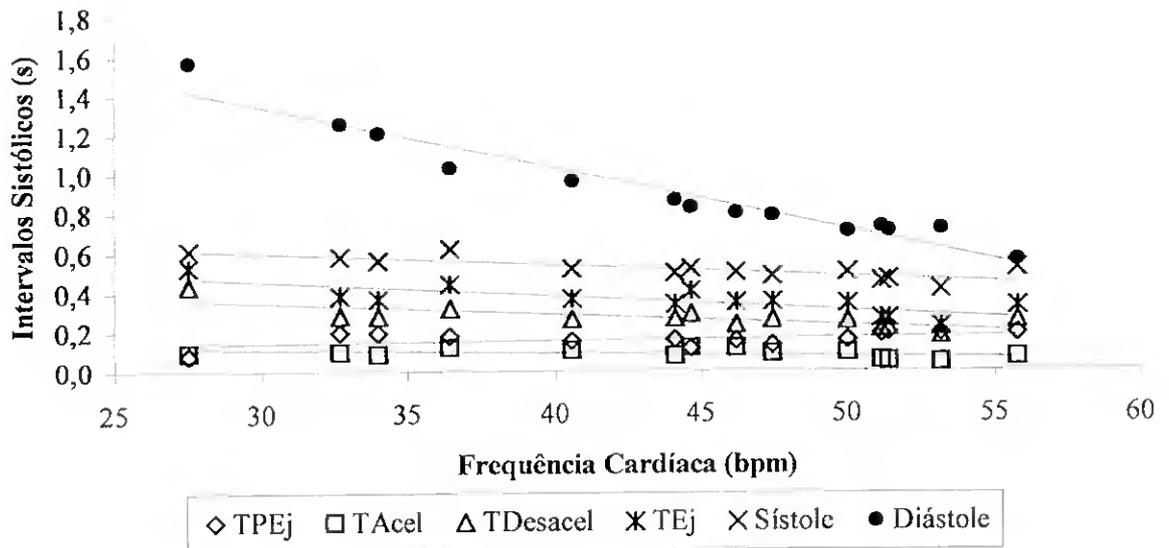


Figura III.3.3 – Variação dos intervalos sistólicos em função da frequência cardíaca do coração de *H. didactylus* (n=14). As linhas representam rectas de regressão entre os intervalos sistólicos e a frequência cardíaca: $y(\text{TPEj})=0,0014x+0,10$; $r^2=0,12$ $y(\text{TAccl})=-0,0017x+0,16$; $r^2=0,34$; $y(\text{TDesaccl})=-0,006x+0,51$; $r^2=0,64$; $y(\text{TEj})=-0,007x+0,66$; $r^2=0,66$; $y(\text{Sístole})=-0,0059x+0,77$; $r^2=0,72$; $y(\text{Diástole})=-0,03x+2,27$; $r^2=0,94$ (ver tabela III.3.3).

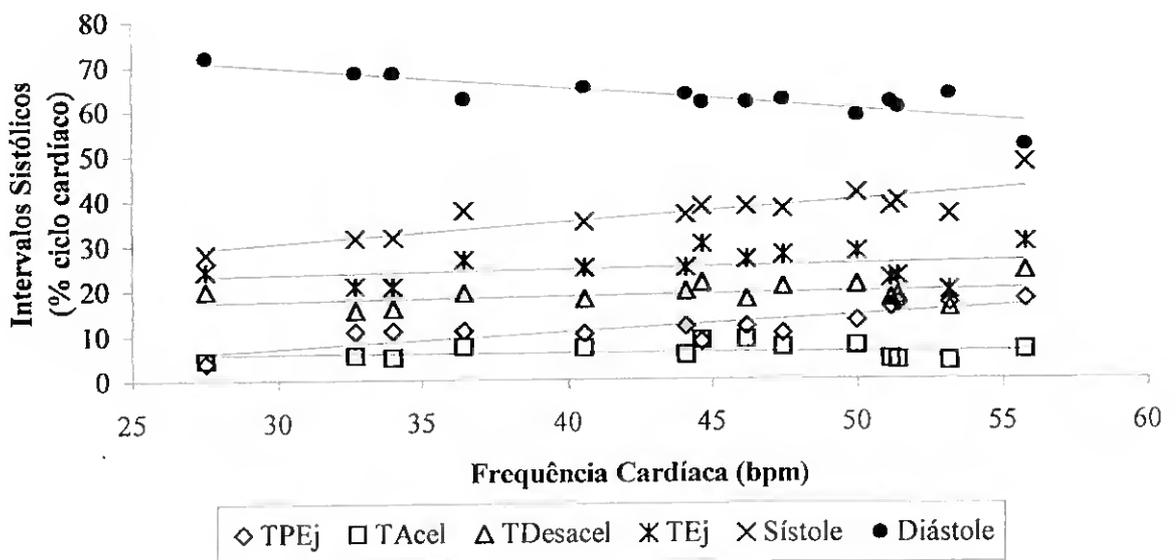


Figura III.3.4 – Variação dos intervalos sistólicos (em porcentagem ocupada no ciclo cardíaco) em função da frequência cardíaca do coração de *H. didactylus* (n=14). As linhas representam rectas de regressão entre os intervalos sistólicos e a frequência cardíaca: $y(\text{TPEj})=0,366x-3,99$; $r^2=0,68$; $y(\text{TAccl})=0,012x+5,54$; $r^2=0,004$; $y(\text{TDesaccl})=0,101x+14,5$; $r^2=0,13$; $y(\text{TEj})=0,11x+20,1$; $r^2=0,08$; $y(\text{Sístole})=0,48x+16,1$; $r^2=0,72$; $y(\text{Diástole})=-0,48x+83,9$; $r^2=0,72$ (ver tabela III.3.3).

3.4. DISCUSSÃO

3.4.1. Velocidade máxima e gradiente de pressão

No presente estudo, aplicou-se a técnica de ecocardiografia Doppler para efectuar, pela primeira vez, o estudo hemodinâmico não-invasivo do fluxo sistólico ventricular de um teleósteo, nomeadamente da espécie *H. didactylus*. A técnica de ecocardiografia Doppler tem sido utilizada para obter vários dados hemodinâmicos, como o gradiente de pressão através das válvulas. Ao longo das últimas décadas, muitos estudos foram desenvolvidos para validar a utilização da técnica Doppler para fornecer dados hemodinâmicos e provaram que os resultados obtidos por ecocardiografia Doppler são exactamente sobreponíveis aos dados hemodinâmicos invasivos, em relação ao cálculo da pressão através das válvulas (García-Fernandéz, 2000). Assim, hoje em dia, esta técnica é utilizada como rotina no estudo de patologias valvulares.

No presente estudo, obteve-se o perfil de velocidade do fluxo de ejeção ventricular que apresentou um espectro típico, caracterizado por duas fases: aceleração rápida e desaceleração lenta. Este perfil apresenta exactamente o mesmo aspecto do perfil de velocidade do fluxo sistólico dos mamíferos, o que indica que, apesar das diferenças morfológicas e funcionais dos corações dos mamíferos e dos peixes, a ejeção ventricular é gerada de acordo com os mesmos determinantes. No entanto, apesar da similaridade do perfil de velocidade do fluxo sistólico de *H. didactylus* e dos mamíferos, a velocidade máxima registada neste trabalho é claramente mais baixa que nos mamíferos. A variação verificada na velocidade máxima do fluxo sistólico entre os 14 indivíduos estudados parece estar relacionada com a variabilidade individual da espécie, reflectindo diferentes estados contrácteis, já que as variações observadas não se correlacionam com o tamanho do animal ou com o sexo, nem com a FC.

Através da aplicação da equação simplificada de Bernoulli foi determinado o gradiente de pressão entre o ventrículo e o bulbo, que variou entre 0,07 e 0,25 mmHg. Este gradiente de pressão é muito baixo, o que reflecte as propriedades elásticas do bulbo, que mantém a pressão elevada durante todo o ciclo cardíaco. O bulbo é constituído essencialmente por fibras elásticas e músculo liso e absorve a energia cinética da ejeção ventricular como energia potencial nas suas paredes, o que assegura uma pressão positiva para a circulação arterial durante a diástole (Olson, 1998). Esta câmara cardíaca é trinta vezes mais distensível que a aorta dos mamíferos e pode armazenar entre 30 a 100 % do débito cardíaco, mantendo a sua pressão elevada (Bushnell e Jones, 1994). O método

utilizado neste trabalho permite quantificar o gradiente de pressão gerado entre o ventrículo e o bulbo durante a sístole ventricular, mas não permite determinar a pressão sistólica ventricular nem a pressão absoluta na aorta ventral. Estes parâmetros tem sido quantificados em várias espécies de peixes por técnicas invasivas, o que permitiu determinar pressões da aorta ventral desde 7,8 mmHg para o ciclóstomo *Myxine glutinosa* (Axelsson *et al.*, 1990), até 91 mmHg para o atum *Thunnus albacares* (Jones *et al.*, 1993). A determinação destes parâmetros na espécie *H. didactylus* implica uma abordagem interventiva, pelo que não foi efectuada neste trabalho.

3.4.2. Integral velocidade-tempo e volume de ejeção

O estudo hemodinâmico do fluxo de ejeção ventricular permite também determinar parâmetros volumétricos de função ventricular, como o VE_c e o DC_c (Ihlen *et al.*, 1984; Lewis *et al.*, 1984). Com esta abordagem, o VE_c e o DC_c calculados neste trabalho para a espécie *H. didactylus*, apresentaram valores médios de $0,245 \pm 0,066$ ml/kg e $9,9 \pm 2,0$ ml/min/kg, respectivamente. Estes valores são similares aos obtidos para estes parâmetros, para esta espécie, a partir de dados volumétricos determinados por ecocardiografia bidimensional, que foram correlacionados com dados volumétricos obtidos a partir do peso do ventrículo (Capítulo III.5). Por outro lado, o VE_c calculado para a espécie *H. didactylus* neste estudo encontra-se dentro dos valores obtidos noutras espécie de peixes (Farrell e Jones 1992), com 100 % miocárdio trabecular e baixa massa ventricular relativa.

A técnica descrita permite determinar o VE_c e o DC_c independentemente da forma do ventrículo. No entanto, esta abordagem não permite calcular variações volumétricas ao longo do ciclo cardíaco, como o volume no fim da sístole (VTS) e no fim da diástole (VTD) e, por isso, também não permite determinar a fracção de ejeção (FE).

3.4.3. Intervalos sistólicos

Os intervalos sistólicos (IS) medem as fases sequenciais da sístole ventricular e, como tal, permitem avaliar a função cardíaca apenas por variações temporais.

Estes intervalos têm sido utilizados para estudar várias situações fisiopatológicas do ventrículo em mamíferos, onde foram correlacionados com índices de eficiência ventricular derivados invasivamente e demonstraram uma correlação significativa com o volume de ejeção, o débito cardíaco e a fracção de ejeção (Weissler, 1977; Hassan e Turner, 1983). Os IS são influenciados fisiologicamente pelas mesmas variáveis que

afectam outros parâmetros de função ventricular (Boudoulas, 1990); tal como o débito cardíaco, os IS são afectados pela contractilidade do miocárdio, pela frequência cardíaca e condições de carga (Hassan e Turner, 1983). Por estas razões, os IS não são indicadores da contractilidade do miocárdio mas sim indicadores mais gerais da eficiência global do miocárdio.

Neste estudo os IS foram determinados a partir de registos de velocidade do fluxo de ejeção ventricular obtidos por ecocardiografia Doppler. Verificou-se que, nesta espécie, a fase sistólica do ciclo cardíaco é caracterizada por um tempo de pré-ejeção (TPEj) curto, seguido do tempo de ejeção (TEj), que ocupa o resto da sístole, caracterizado por um período de aceleração (TAcel) curto e um tempo de desaceleração (TDesacel) longo. O TPEj corresponde à contracção isovolumétrica do ventrículo, período em que o ventrículo aumenta a sua pressão antes da ejeção do sangue, enquanto o TEj, corresponde à fase da sístole, durante a qual o ventrículo bombeia sangue para o sistema arterial.

Tendo em conta que estes intervalos medem as fases sequenciais da sístole, deverão ser afectados por variações da frequência cardíaca. Neste trabalho, verificou-se que os intervalos mais curtos, TPEj e TAcel, não se correlacionam com as variações da FC. Por outro lado, os intervalos mais longos - TDesacel, TEj e Sist - apresentaram uma correlação linear negativa com a FC. Vários estudos descreveram anteriormente a mesma relação entre estes IS e a FC em cães, gatos e no Homem (Spodick *et al.*, 1984; Boudoulas, 1990; Atkins e Snyder, 1992). Estas observações indicam que o encurtamento da sístole face ao aumento da FC é realizado à custa da diminuição da TDesacel, enquanto a TPEj e TAcel se mantêm constantes para valores basais da FC.

Tendo em conta a totalidade do ciclo cardíaco, verificou-se que a diástole apresentou a diminuição mais acentuada com o aumento da FC. Por outro lado, a variação percentual dos intervalos sistólicos relativamente à totalidade do ciclo cardíaco com a FC não é significativa para os intervalos estudados, excepto para a sístole total e a diástole total. Estes resultados sugerem que o aumento da FC é feita à custa do aumento da velocidade do enchimento ventricular (Capítulo III.4).

Uma vez caracterizados os IS em condições fisiológicas, é possível avaliar situações de adaptação fisiopatológica através de alterações dos IS. No homem a disfunção ventricular está associada a um aumento do TPEj e diminuição do TEj. O aumento do TPEj está normalmente associado à diminuição da taxa de aumento da pressão gerada pelo ventrículo durante esta fase (dP/dt) (Boudoulas, 1990; Lewis *et al.*, 1977). Nestas condições, embora a taxa de encurtamento da fibra diminua (o que aumentaria o TEj), a

diminuição simultânea e proporcional da extensão do encurtamento, encurta o TEj (Lewis *et al.*, 1977). Os intervalos sistólicos são alterados por qualquer factor que altere a frequência cardíaca e por isso são indicados para o estudo de situações que induzam alterações inespecíficas. No entanto, factores que alterem a transmissão da despolarização nas fibras miocárdicas terão efeitos específicos nos intervalos sistólicos.

Os intervalos sistólicos permitem determinar outros parâmetros, como a taxa de activação das pontes cruzadas (K_a), que corresponde à taxa de ligação do cálcio à troponina C nos miócitos e é calculada a partir do tempo total da sístole ventricular (Takeda *et al.*, 1991 e 1993). Este autores sugerem que a variação desta taxa depende do comprimento da fibra miocárdica e da frequência cardíaca. O estudo comparado dos intervalos sistólicos poderá contribuir para esclarecer os mecanismos da regulação da excitação-contracção em diferentes grupos de vertebrados. Joaquim *et al.* (1999) estudaram os intervalos sistólicos em vários grupos de vertebrados e verificaram uma notável sobreposição no padrão dos IS nos vários grupos estudados.

Vários estudos demonstraram que os IS são sensíveis a uma variedade de processos patológicos e intervenções farmacológicas (Atkins e Snyder, 1992). Devido à sua grande sensibilidade e facilidade de medição, os IS são indicados para o estudo do efeito de agentes farmacológicos sobre o coração (Boudoulas, 1990). Para os intervalos que variam com a FC tem sido recomendado o cálculo de índices dos intervalos sistólicos, que os corrigem para variações da frequência cardíaca, de modo a interpretar alterações destes índices em diferentes situações (Boudoulas, 1990; Atkins e Snyder, 1992).

3.5. CONCLUSÕES

No presente estudo, aplicou-se a ecocardiografia Doppler para efectuar, pela primeira vez, o estudo hemodinâmico não-invasivo do fluxo sistólico ventricular dum teleósteo, nomeadamente da espécie *H. didactylus*. O perfil de velocidade do fluxo de ejeção ventricular desta espécie apresentou um espectro típico, caracterizado por duas fases: aceleração rápida e desaceleração lenta. A velocidade máxima deste fluxo e o gradiente de pressão são bastante baixos, reflectindo as propriedades elásticas do bulbo, que mantém a pressão elevada durante todo o ciclo cardíaco.

O registo de velocidade permitiu determinar o integral velocidade-tempo do fluxo, que multiplicado pela área do orifício atravessado pelo fluxo, fornece o volume de ejeção

ventricular. O volume de ejeção e o débito cardíaco calculado por este método encontram-se dentro dos valores registados por outros métodos, para peixes com 100 % miocárdio trabecular e baixa massa ventricular relativa. A técnica descrita permite determinar o volume de ejeção e o débito cardíaco independentemente da forma do ventrículo e deduzir outros parâmetros hemodinâmicos importantes de função cardíaca de forma não-invasiva, tais como o gradiente de pressão e os intervalos sistólicos.

O estudo dos intervalos sistólicos demonstrou que os intervalos mais curtos (o tempo de pré-ejeção e o tempo de aceleração) são independentes da frequência cardíaca enquanto os intervalos mais longos (o tempo de desaceleração, o tempo de ejeção e o tempo total da sístole) apresentaram uma correlação linear negativa com a frequência cardíaca. Estas observações indicam que o encurtamento da sístole face ao aumento da frequência cardíaca é realizado à custa da diminuição do tempo de desaceleração. Estes resultados sugerem que o aumento da frequência cardíaca é feito à custa do aumento da velocidade do enchimento ventricular.

4. ESTUDO HEMODINÂMICO NÃO-INVASIVO DA FUNÇÃO DIASTÓLICA VENTRICULAR POR ECOCARDIOGRAFIA DOPPLER

4.1. INTRODUÇÃO

A função diastólica determina todo o processo de enchimento da câmara ventricular cujo produto final é o volume telediastólico, enquanto a função sistólica assegura a ejeção desse volume (ou pré-carga) para a circulação sistémica, contra uma impedância (ou pós carga), mediante a utilização de uma força contráctil (Fragata, 1991).

A função diastólica e os mecanismos que determinam o enchimento ventricular nos peixes tem sido um assunto difícil de estudar e com resultados por vezes contraditórios. Classicamente, considerava-se que o enchimento ventricular, quer em teleósteos quer em elasmobrânquios, era determinado primeiramente, senão exclusivamente, pela contracção auricular. Este dogma foi estabelecido com base na interpretação da anatomia cardíaca e no registo de pressões intracardíacas (Randall, 1968; Johansen e Gesser, 1986; Farrell, 1991b; Farrell e Jones, 1992). O facto de, na maioria dos peixes, a aurícula apresentar um tamanho semelhante ou superior ao do ventrículo, associado a registos de pressão que indicavam que a pressão diastólica ventricular se manteria superior à pressão auricular, excepto durante a sua sístole, suportavam a hipótese de que o enchimento ventricular só ocorreria através da contracção da aurícula. Este princípio colocava os peixes como grupo à parte dentro dos vertebrados, os quais, no geral, apresentam corações com um padrão de enchimento ventricular bifásico, caracterizado por um enchimento precoce, determinado pelo relaxamento ventricular (onda E) e por um enchimento tardio, determinado pela contracção da aurícula (onda A). Recentemente, estudos realizados por ecocardiografia Doppler vieram pôr em causa este dogma, uma vez que registaram enchimentos ventriculares bifásicos, semelhantes aos descritos para os mamíferos, em várias espécies de teleósteos com anatomias cardíacas distintas (Coucelo *et al.*, 1996; Lai *et al.*, 1998) e de elasmobrânquios (Lai *et al.*, 1996).

Tendo em conta que o enchimento ventricular é um dos principais determinantes do volume telediastólico do ventrículo, que por sua vez é responsável pelo débito cardíaco (Olson, 1998), é de extrema importância caracterizar os fenómenos eléctricos, mecânicos e

hemodinâmicos que ocorrem durante a diástole ventricular, para compreender os mecanismos que regulam uma função cardíaca normal e os fenómenos de adaptação fisiopatológica.

O enchimento é um processo dependente de fenómenos activos (relaxamento) e passivos (elasticidade da câmara ventricular) e no homem é caracterizado por quatro fases sucessivas (Fragata, 1991; Thomas e Weyman, 1991; Arrighi e Souger, 1995): relaxamento isovolumétrico; enchimento rápido ou precoce (onda E); diástase e enchimento lento ou tardio (onda A). Durante o relaxamento isovolumétrico o volume ventricular permanece constante, verificando-se contudo uma diminuição da sua pressão. A fase de enchimento rápido ocorre a partir do momento do relaxamento ventricular em que a sua pressão iguala a pressão auricular, induzindo a válvula aurículo-ventricular. Durante a diástase, a pressão entre a aurícula e o ventrículo equilibram-se e verifica-se um fluxo muito lento da aurícula para o ventrículo, o qual ocorre devido ao retorno venoso. Por fim, a fase de enchimento lento ocorre após a sístole auricular, que aumenta a pressão da aurícula, originando um gradiente de pressão que acelera o fluxo de sangue para o ventrículo.

O processo de enchimento ventricular é complexo e depende de vários factores como as condições de relaxamento, o gradiente hemodinâmico aurículo-ventricular, as condições de distensibilidade ventricular, a sístole auricular e a frequência cardíaca (Nishimura, 1989b).

Vários índices derivados do padrão do fluxo mitral têm sido utilizados como marcadores de função diastólica, como os intervalos diastólicos e a razão E/A. Os intervalos diastólicos representam os tempos despendidos durante o ciclo cardíaco por cada uma das fases da diástole. Esta avaliação temporal da diástole tem sido obtida por técnicas não-invasivas para obter informações sobre o relaxamento e distensibilidade ventricular (Thomas e Weyman, 1991).

A relação E/A, velocidade máxima da onda E (enchimento precoce) em relação à velocidade máxima da onda A (enchimento tardio), tem sido amplamente utilizada em cardiologia, como parâmetro de avaliação da função diastólica, e as alterações desta relação têm sido associadas a fenómenos de compensação e a diversos estados patológicos. Esta relação permite também avaliar a contribuição relativa do relaxamento ventricular e da contracção auricular para o enchimento ventricular (Thomas e Weyman, 1991; Arrighi e Soufer, 1995).

Até ao presente, a caracterização das diferentes fases da diástole e a sua contribuição para o enchimento ventricular não se encontra ainda descrita em peixes. Como tal, foi

objectivo deste estudo caracterizar o padrão de enchimento ventricular, os intervalos diastólicos e a razão E/A do coração da espécie *Halobatrachus didactylus* a partir de registos do fluxo aurículo-ventricular obtidos por ecocardiografia Doppler. Pretendeu-se ainda avaliar a contribuição relativa das duas fases de enchimento para o volume diastólico final do ventrículo e, conseqüentemente, para o débito cardíaco.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Grupo experimental

Neste estudo foram incluídos 14 indivíduos da espécie *H. didactylus*, do sexo masculino, com pesos entre 270 e 865 g. A metodologia utilizada nos exames ecocardiográficos encontra-se descrita no Capítulo II, tendo sido utilizado o ecógrafo *Acuson Sequoia*, equipado com a sonda linear 8L5 (8 MHz de emissão).

4.2.2. Metodologia ecocardiográfica

Para todos os animais foi registado o espectro Doppler de velocidade do fluxo de enchimento ventricular, em vários ciclos cardíacos consecutivos e com registo electrocardiográfico simultâneo, em abordagens sagital e transversal. As imagens foram registadas por Doppler pulsado com 4 MHz de emissão, com a amostra colocada sobre o orifício aurículo-ventricular a uma profundidade de 10 a 15 mm, com tamanho de 1 a 1,5 mm e ganho de -13 a 2 dB.

4.2.3. Velocidades máximas e razão E/A

A partir dos registos de velocidade do fluxo de enchimento ventricular foram determinadas as velocidades máximas do enchimento precoce (onda E) e tardio (onda A) (Fig. III.4.1). Os valores de velocidade obtidos foram ainda utilizados para cálculo da razão E/A:

$$E/A = \frac{\text{Velocidade máxima E}}{\text{Velocidade máxima A}} \quad [\text{III.4.1}]$$

Este parâmetro foi correlacionado com a frequência cardíaca (FC) basal dos indivíduos estudados.

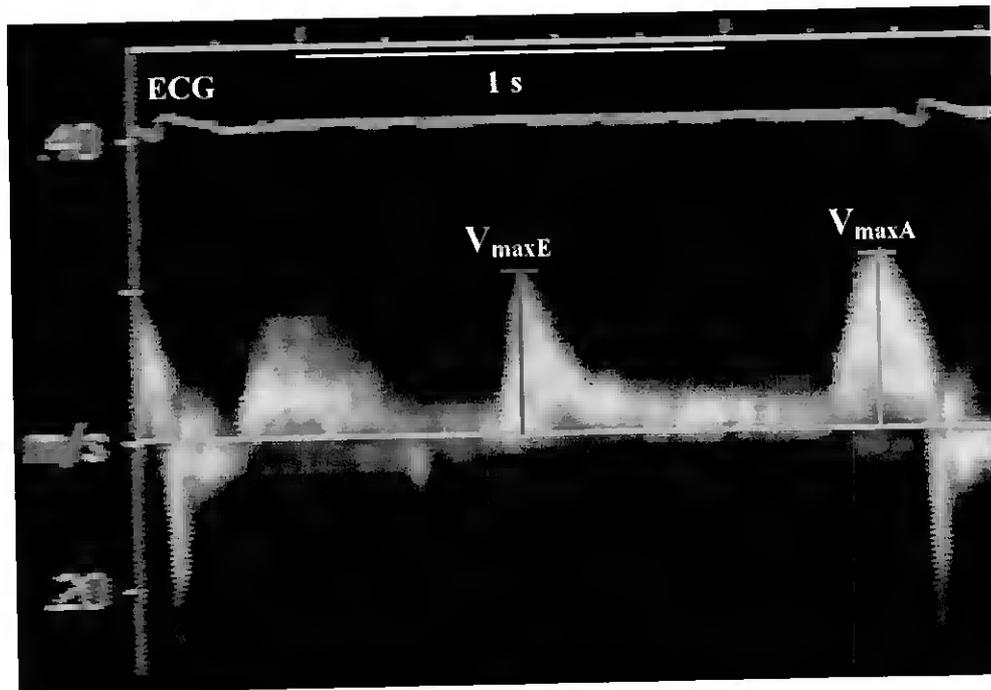


Figura III.4.1 – Imagem ecocardiográfica com registo Doppler de velocidade do fluxo de enchimento ventricular do coração de *H. didactylus*, com registo electrocardiográfico (ECG) simultâneo e indicação das medições efectuadas para determinação da velocidades máximas das ondas E e A (V_{maxE} , V_{maxA}).

4.2.4. Intervalos diastólicos

A partir dos registos Doppler do fluxo de enchimento ventricular foram definidas quatro fases distintas, dentro do período diastólico do ciclo cardíaco (Figs. III.4.2 e III.4.3):

1. **Tempo de relaxamento isovolumétrico (TRI)** – desde o fim da sístole ventricular (identificada pela onda T do ECG ou pelo fim do fluxo de ejeção ventricular em registos sistodiastólicos) até ao início da onda E;
2. **Tempo de enchimento precoce (TEP)** – período do fluxo aurículo-ventricular correspondente à onda E;
3. **Diastáse (Diast)** – desde o fim da onda E até ao início do fluxo da onda A ou onda P do ECG (contração auricular).
4. **Tempo de enchimento tardio (TET)** – período do fluxo aurículo-ventricular após a sístole auricular.

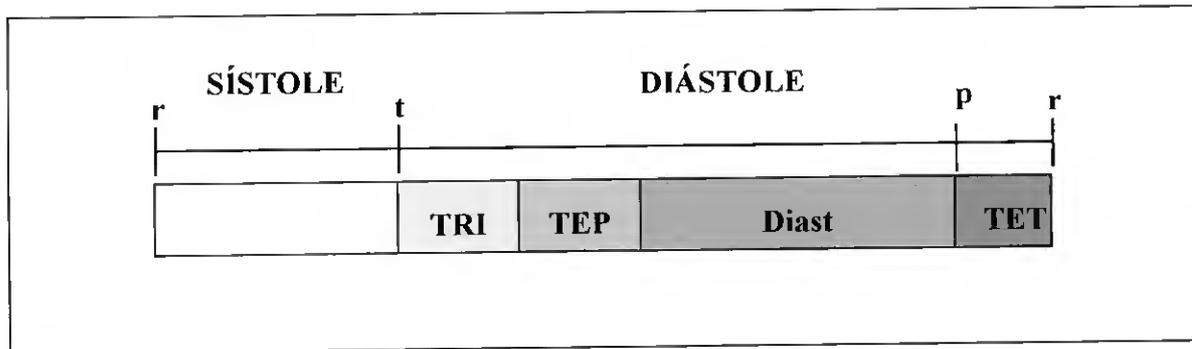


Figura III.4.2 - Esquema representativo dos intervalos diastólicos: tempo de relaxamento isovolumétrico (TRI); tempo de enchimento precoce (TEP); diastase (Diast) e tempo de enchimento tardio (TET) (r – onda R; p – onda P; t - onda T).

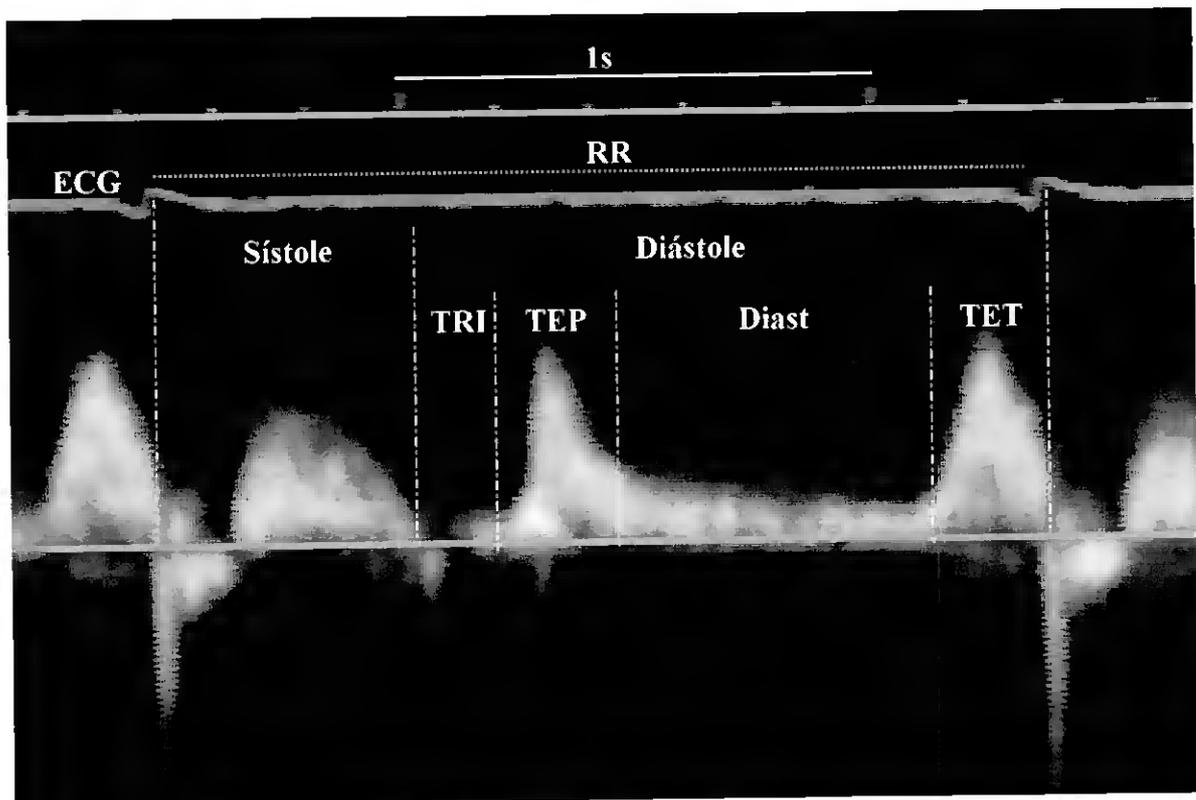


Figura III.4.3 – Registro Doppler do fluxo de enchimento ventricular do coração de *H. didactylus*, com registro electrocardiográfico (ECG) simultâneo e indicação dos intervalos diastólicos: tempo de relaxamento isovolumétrico (TRI); tempo de enchimento precoce (TEP); diastase (Diast) e tempo de enchimento tardio (TET) (um ciclo cardíaco – intervalo RR).

Foram definidos os tempos de cada um dos intervalos e calculadas as percentagens em relação ao intervalo RR, para cada um dos parâmetros referidos. Os intervalos diastólicos foram ainda correlacionados com a frequência cardíaca basal de cada indivíduo. A frequência cardíaca foi calculada a partir do intervalo RR (Fig. III.4.3).

4.2.5. Análise estatística

Os valores apresentados para os vários parâmetros representam valores médios de 3 a 5 medições, realizadas em ciclos cardíacos diferentes. Foi efectuada uma análise de regressão linear simples para avaliar a significância deste modelo entre os vários intervalos diastólicos e a razão E/A e a frequência cardíaca. As correlações foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Velocidades máximas e razão E/A

Para todos os indivíduos estudados foi registado um fluxo de enchimento ventricular com perfil bifásico, caracterizado por duas ondas, denominadas por onda E e onda A, semelhante ao descrito para os mamíferos. A velocidade máxima de cada onda apresentou grandes variações entre indivíduos, variando entre 4,8 e 25,0 cm/s para a onda E e entre 4,7 e 33,9 cm/s para a onda A, embora não tenham sido registadas variações para o mesmo indivíduo ao longo do exame ecocardiográfico.

O registo Doppler de velocidade do fluxo foi obtido em incidência longitudinal e transversal apresentando, para o mesmo indivíduo e para a mesma frequência cardíaca (FC), o mesmo perfil de velocidade e razão E/A sem variações significativas ($p < 0,05$) (Fig. III.4.4).

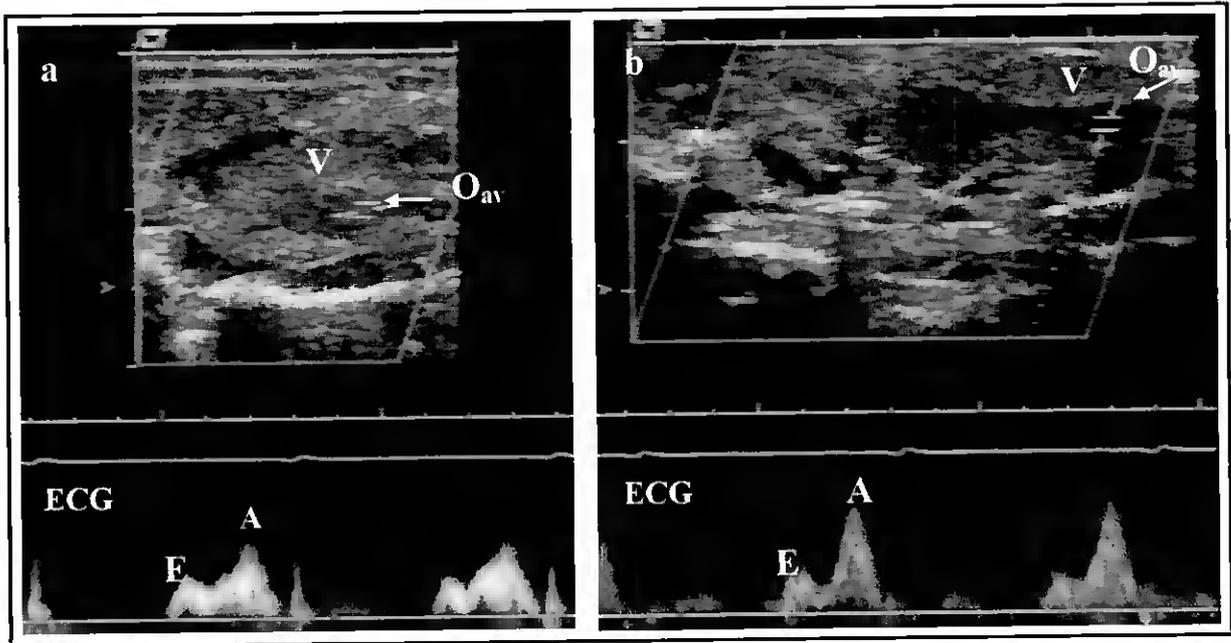


Figura III.4.4 – Imagens ecocardiográficas bidimensionais com registo Doppler do fluxo de enchimento ventricular do coração de *H. didactylus*, com registo electrocardiográfico (ECG) simultâneo, obtidas a partir de incidência transversal (a) e longitudinal (b). A amostra de volume foi colocada sobre o orifício aurículo-ventricular (O_{av}). Em ambas as incidências foi registado um fluxo bifásico com o mesmo perfil (E - onda E; A - onda A).

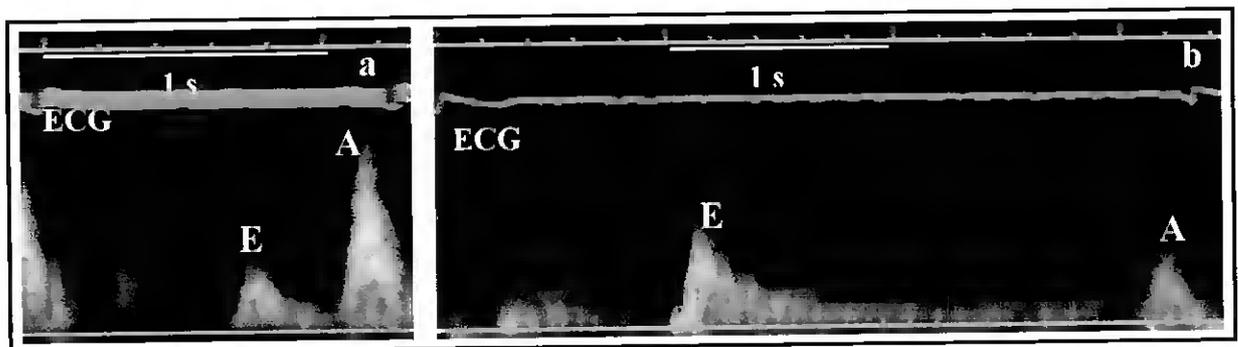


Figura III.4.5 – Registo Doppler do fluxo de enchimento ventricular do coração de *H. didactylus*, com registo electrocardiográfico (ECG) simultâneo, obtido para frequências cardíacas diferentes: a) onda E inferior à onda A, FC = 46 bpm; b) onda E superior à onda A, FC = 18 bpm (E - onda E; A - onda A).

Neste estudo obtiveram-se grandes variações para FC basal (17-49 bpm). Apesar de não ter sido possível estabelecer uma relação entre o tamanho do animal e a FC ($p > 0,05$), verificou-se que os indivíduos de maior peso apresentam FC mais baixas.

Foram registados dois padrões diferentes para indivíduos com FC basal alta (>40 bpm) e baixa (<20 bpm). No primeiro caso, registaram-se perfis de velocidade da onda E com baixa velocidade e onda A com velocidade elevada, resultando em razões E/A inferiores a 1; no segundo caso, verificou-se o perfil contrário, com razão E/A inversa ao

caso anterior (Fig. III.4.5). Além disso, neste tipo de registos verificou-se um grande intervalo entre as ondas E e A (diastáse muito longa), conferindo ao registo um aspecto muito diferente. Na Figura III.4.3 está representado um caso intermédio, com velocidade máxima das ondas E e A semelhante e, portanto, com razão E/A próxima de 1. Tendo em conta todos os indivíduos estudados, a razão E/A variou entre 0,330 e 1,852, apresentando uma correlação significativa ($p < 0,05$) com a FC (Fig. III.4.6).

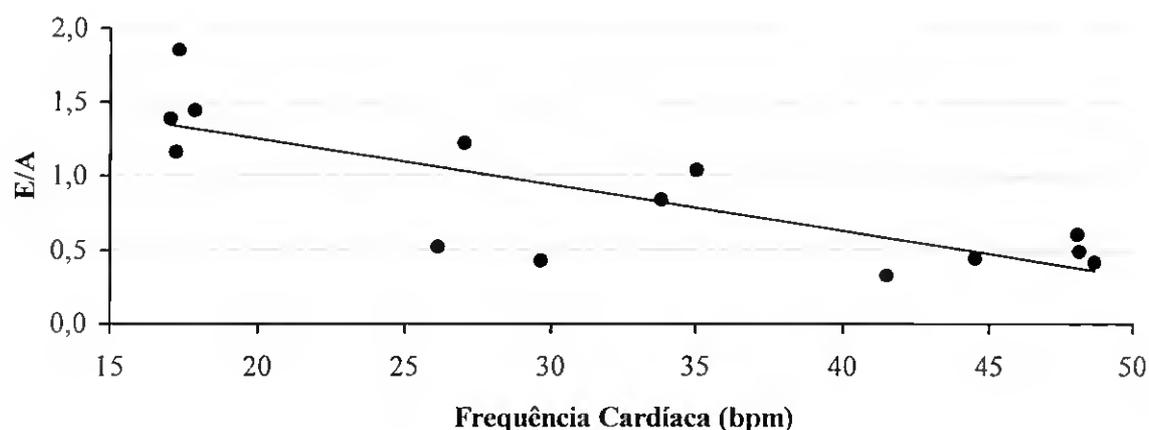


Figura III.4.6 - Variação da razão E/A em função da frequência cardíaca do coração de *H. didactylus* (n=14). A recta de regressão é definida por: $y = -0,03x + 1,87$, com $r^2 = 0,63$.

4.3.2. Intervalos diastólicos

Neste estudo foram determinados os intervalos diastólicos (Tabela III.4.1), em tempo e percentagem do ciclo cardíaco, e foi estudada a sua correlação com a FC (Fig. III.4.7 e III.4.8). Tal como referido anteriormente (Capítulo III.3 - Intervalos Sistólicos), verificou-se que a diástole é um evento que ocupa a maior parte do ciclo cardíaco, variando neste estudo entre 51 e 72 %, dependendo da FC. Relativamente aos intervalos diastólicos, verificou-se que o TRI é o evento mais breve da fase diastólica (variando entre 0,060 e 0,300 s), enquanto o TET apresentou uma variação muito baixa, (entre 0,211 e 0,332 s) e o TEP e a diastáse apresentaram as variações temporais mais significativas, entre 0,188 e 0,668 s e 0,101 e 2,087 s, respectivamente.

Tabela III.4.1 – Registo dos intervalos diastólicos do coração de *H. didactylus* (n=14).

Indiv.	Peso Corporal kg	FC ⁷ bpm	TRI ¹ s	TEP ² s	Diast ³ s	TET ⁴ s	Sístole ⁵ s	Diástole ⁶ s
1	0,270	48,1	0,093	0,219	0,153	0,259	0,524	0,723
2	0,350	41,5	0,103	0,229	0,123	0,295	0,697	0,750
3	0,420	44,5	0,100	0,188	0,253	0,230	0,581	0,771
4	0,500	33,8	0,181	0,339	0,526	0,250	0,480	1,296
5	0,655	29,7	0,151	0,424	0,592	0,289	0,566	1,457
6	0,740	17,8	0,300	0,467	1,520	0,211	0,628	2,497
7	0,750	48,2	0,060	0,205	0,101	0,230	0,651	0,595
8	0,790	35,0	0,096	0,371	0,159	0,283	0,807	0,908
9	0,800	17,2	0,190	0,296	2,087	0,315	0,597	2,887
10	0,805	17,3	0,200	0,447	1,770	0,217	0,836	2,634
11	0,830	48,7	0,106	0,201	0,126	0,278	0,487	0,734
12	0,845	26,1	0,250	0,289	0,889	0,239	0,628	1,668
13	0,850	27,1	0,247	0,605	0,454	0,253	0,661	1,559
14	0,865	17,0	0,260	0,668	1,553	0,332	0,730	2,813
Média	0,702	32,3	0,167	0,353	0,736	0,263	0,653	1,519
Desvio p.	0,186	12,3	0,076	0,153	0,702	0,037	0,121	0,854

¹ Tempo de relaxamento isovolumétrico, ² Tempo de enchimento precoce, ³ diástase, ⁴ tempo de enchimento tardio, ⁵ Tempo total da sístole, ⁶ Tempo total da diástole, ⁷ Frequência cardíaca

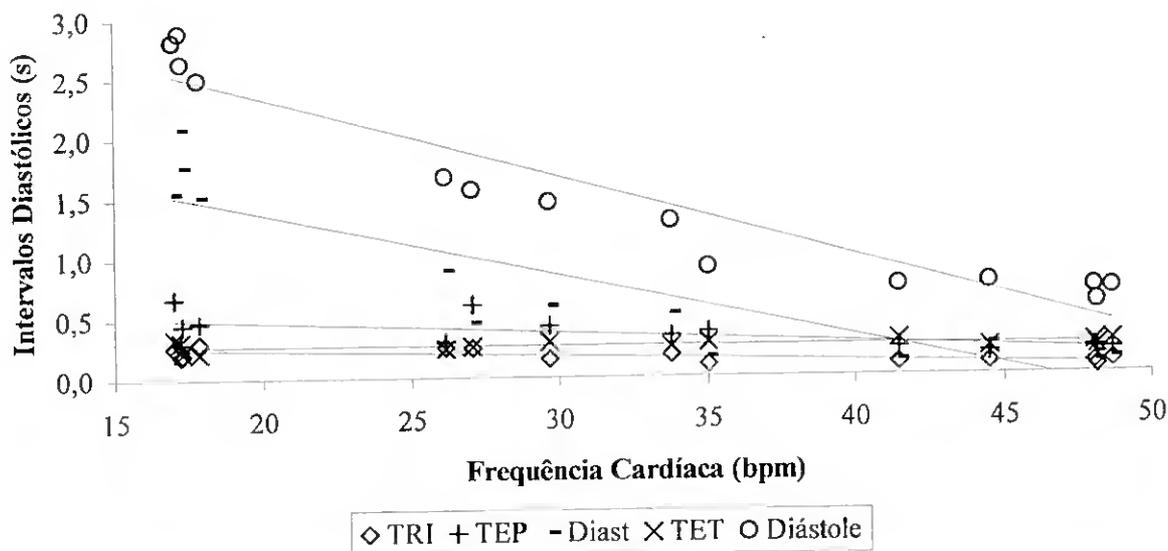


Figura III.4.7 - Variação temporal dos intervalos diastólicos em função da frequência cardíaca do coração de *H. didactylus* (n=14). As rectas de regressão entre os intervalos diastólicos e a frequência cardíaca são definidas por: y (Diástole) = $-0,07 x + 3,65$; $r^2 = 0,91$; y (TRI) = $-0,005 x + 0,34$; $r^2 = 0,74$; y (TEP) = $-0,009 x + 0,65$; $r^2 = 0,55$; y (Diástase) = $-0,051 x + 2,39$; $r^2 = 0,81$; y (TET) = $-0,00003 x + 0,27$; $r^2 = 0,013$ (ver Tabela III.4.1).

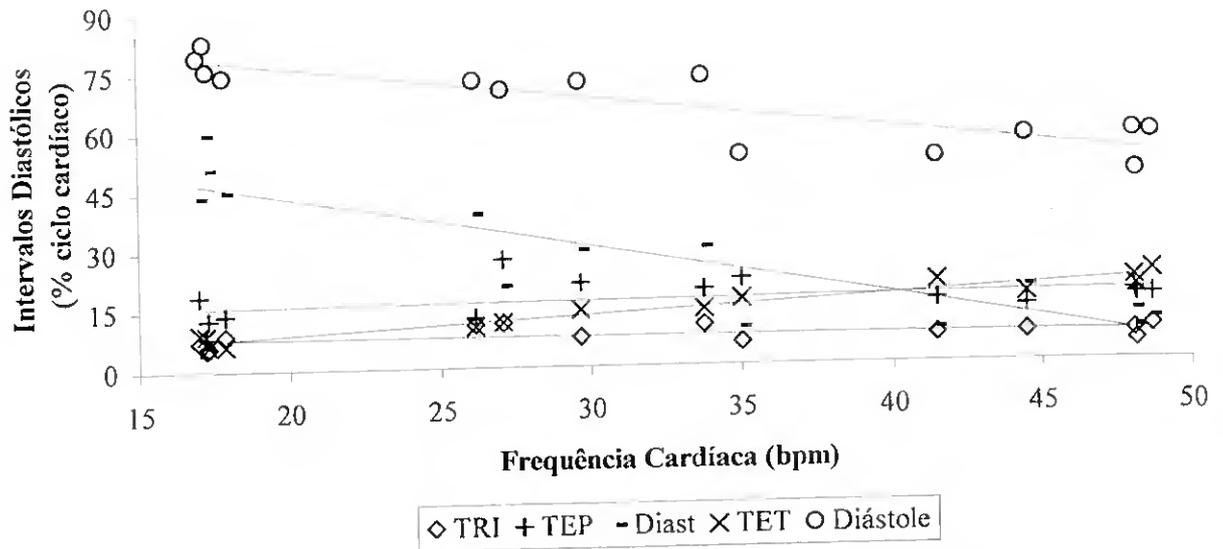


Figura III.4.8 – Variação percentual dos intervalos diastólicos em função da frequência cardíaca do coração de *H. didactylus* (n=14). As rectas de regressão entre os intervalos diastólicos e a frequência cardíaca são definidas por: y (Diástole) = $-0,82x + 92,6$; $r^2 = 0,78$; y (TET) = $0,42x + 0,56$; $r^2 = 0,91$; y (Diastáse) = $-1,29x + 69$; $r^2 = 0,808$; y (TRI) = $-0,017x + 8,25$; $r^2 = 0,01$; y (TEP) = $0,063x + 14,8$; $r^2 = 0,028$ (ver Tabela III.4.1).

Correlacionando os tempos destes intervalos diastólicos com a FC verificou-se que, com exceção do TET, todos apresentam uma correlação significativa ($p < 0,05$), diminuindo linearmente com a FC (Fig. III.4.7). Uma vez que o TET apresenta uma duração praticamente constante, à medida que a duração do ciclo cardíaco diminui (aumento da FC), a percentagem ocupada pelo TET aumenta linearmente ($p < 0,05$).

Em relação à percentagem do ciclo ocupada pelos outros intervalos, verificou-se que apenas a diastáse e a diástole apresentam uma correlação significativa com a FC ($p < 0,05$), diminuindo linearmente (Fig. III.4.8).

4.4. DISCUSSÃO

A ecocardiografia Doppler é a técnica não-invasiva mais amplamente utilizada para avaliação da função diastólica em cardiologia. Vários estudos têm sido desenvolvidos no sentido de correlacionar os dados obtidos não-invasivamente com dados obtidos por técnicas invasivas, como o cateterismo, de forma a tornar o Doppler pulsado numa técnica

quantitativamente fiável para avaliar a função diastólica (Rokey *et al.*, 1985; Spirito *et al.*, 1986; Nishimura, 1989a).

Neste estudo foi efectuado o registo Doppler de velocidade do fluxo de enchimento ventricular do coração da espécie *H. didactylus*, tendo sido verificado, para todos os indivíduos estudados, que este fluxo apresenta um perfil bifásico, caracterizado por duas ondas, denominadas por onda E e onda A, semelhante ao descrito para os mamíferos. Os resultados apresentados são ainda confirmados por observações de Doppler-cor em curto eixo, ao longo do ciclo cardíaco, que registam o enchimento ventricular no início da diástole (Fig. III.4.9, 6) e após a contracção auricular (Fig. III.4.9, 2).

Anteriormente, Coucelo *et al.* (1993 e 1996) registaram o mesmo tipo de perfil de velocidade do fluxo de enchimento para este modelo experimental e também para a espécie *Lophius piscatorius* (Tamboril). Estes autores referiram pela primeira vez o enchimento bifásico em peixes teleósteos. Lai *et al.* (1998) também registaram enchimentos ventriculares bifásicos em três espécies de teleósteos com anatomias cardíacas distintas. Estes autores demonstraram que a pressão ventricular é inferior à pressão auricular desde o início da diástole e não apenas após a contracção auricular, como tinha sido referido anteriormente por Farrell (1991b).

Arrighi e Soufer (1995) referem também que, do ponto de vista puramente físico, os únicos determinantes do enchimento precoce do ventrículo esquerdo do homem são a diferença de pressão entre a aurícula e o ventrículo. Aplicando o mesmo princípio ao coração dos peixes, verifica-se que a onda E corresponde ao enchimento devido ao relaxamento ventricular, enquanto a onda A reflecte o enchimento devido à contracção auricular, tal como se verifica para os mamíferos. A existência de uma fase de enchimento precoce implica que haja abertura da válvula aurículo-ventricular, no início desta fase, fenómeno devido à sucção ventricular.

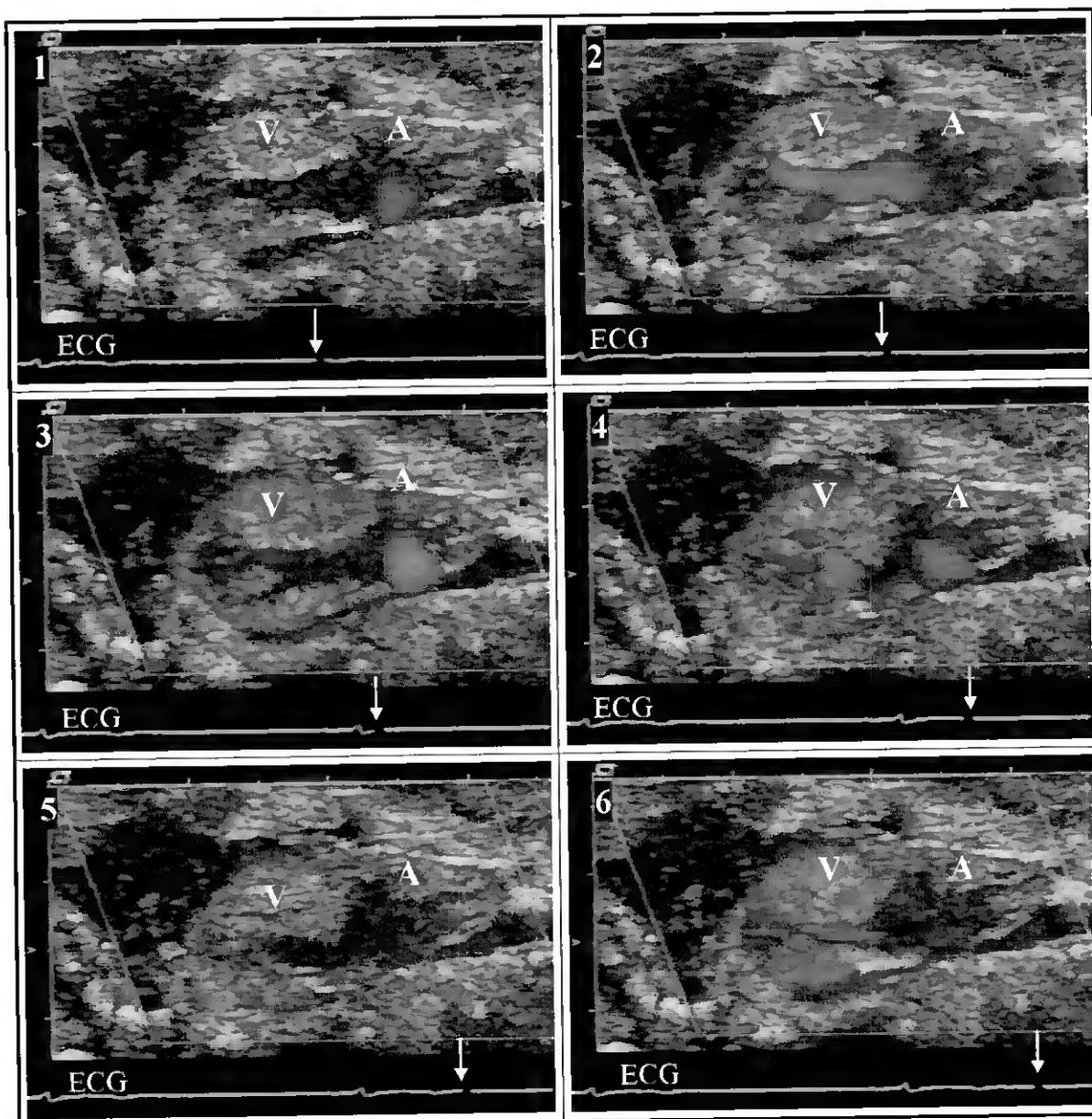


Figura III.4.9 - Sequência de imagens bidimensionais com Doppler-cor, em incidência transversal sobre a região média do coração de *H. didactylus*: 1 – diastáse (fluxo vermelho, enchimento auricular); 2 – contração auricular (enchimento ventricular tardio); 3 – contração isovolumétrica; 4 – ejeção ventricular; 5 – relaxamento isovolumétrico; 6 – enchimento ventricular precoce. A seta branca indica no traçado electrocardiográfico (ECG), o momento do ciclo cardíaco em que foi registada a imagem. V- ventrículo; A – aurícula.

Classicamente, considerava-se que o coração dos peixes funcionava como duas bombas em série – aurícula e ventrículo – e estudaram-se os determinantes do enchimento do seio e da aurícula, considerando que todo o sangue que entrava no coração era sequencialmente transferido para o ventrículo, impulsionado exclusivamente pela contração auricular (Johansen e Gesser, 1986). Deste modo, a pressão para o enchimento cardíaco nos peixes tem sido atribuída (a) à energia transmitida pela contração ventricular

ao sistema arterial e transportada para a circulação venosa que “força” o sangue para o coração - *vis a tergo* - e (b) à sucção cardíaca gerada pela contracção ventricular que baixa a pressão pericárdica, produzindo uma pressão transmural negativa na aurícula e seio venoso, que “puxa” o sangue para o coração - *vis a front* (Farrell e Jones, 1992).

Por outro lado, mais recentemente, outros autores reconheceram que o relaxamento ventricular também contribui para gerar uma pressão intraventricular negativa, especialmente porque o volume telesistólico é muito baixo (Olson, 1998). No presente trabalho, foram igualmente estudadas as variações volumétricas do ventrículo desta espécie e verificou-se também que o volume telesistólico é muito próximo de zero (Capítulo III.5). Este aspecto é ainda fortalecido pelo facto de este tipo de ventrículo funcionar como uma esponja que expelle o sangue das lacunas durante a sístole ventricular. Estes dois factores em conjunto poderão ser os principais determinantes para que, no coração dos peixes o relaxamento ventricular promova a entrada de sangue a partir da aurícula,.

Farrell e Jones (1992) referiram que teleósteos activos, como as trutas e atuns, e também elasmobrânquios, podem usar a sucção cardíaca para obter a maior parte do enchimento ventricular, especialmente a volumes de ejeção baixos. Farrell (1991) refere ainda que o enchimento *vis a front* depende de um pericárdio relativamente rígido, como acontece nos peixes activos. Os resultados obtidos por Lai *et al.* (1998), em animais sujeitos a pericardiectomia, vieram contrariar este pressuposto, ao não verificarem alterações do perfil bifásico do fluxo de enchimento ventricular. É também importante salientar que a espécie *H. didactylus* é uma espécie bentónica, pouco activa e que, no entanto, apresenta enchimento bifásico, com enchimento no início da diástole, anterior à contracção auricular. Por outro lado, os registos Doppler de velocidade do fluxo de enchimento da aurícula demonstram que a maior parte do enchimento ocorre durante a contracção ventricular, o que confirma a importância do enchimento *vis a front* nesta espécie (Fig. III.4.10). Este estudo prova que o enchimento por sucção cardíaca não é exclusivo das espécies activas, podendo mesmo ser generalizado para todas as espécies de peixes, embora a contribuição deste enchimento para volume telediastólico possa variar.

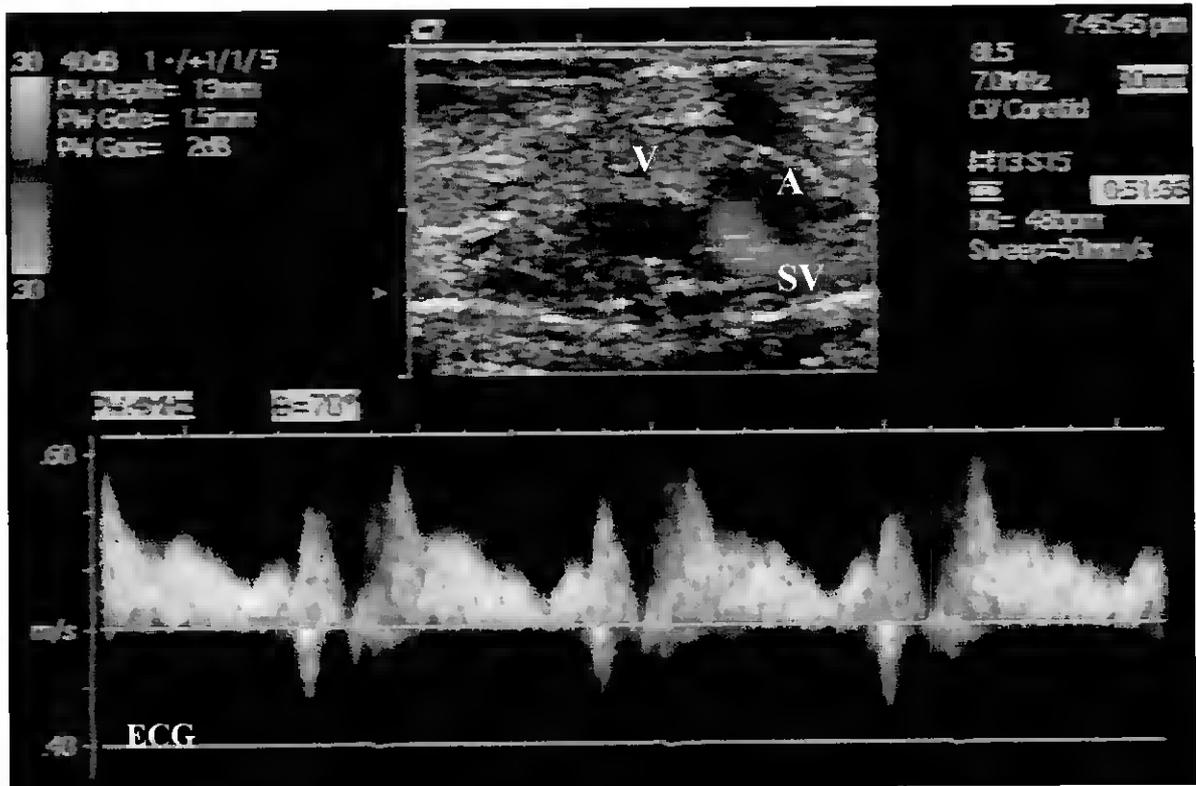


Figura III.4.10 – Imagem de ecocardiografia bidimensional em curto eixo do ventrículo de *H. didactylus* com registo Doppler do fluxo de enchimento auricular (vermelho): V - ventrículo; A - aurícula; SV - seio venoso.

Os resultados obtidos neste estudo permitiram identificar grandes variações entre indivíduos, para a velocidade máxima quer da onda E quer da onda A. O facto de não se terem verificado, para o mesmo indivíduo, variações significativas destes parâmetros e da FC ao longo do exame ecocardiográfico, e de todos os exames terem sido realizados nas mesmas condições, elimina a possibilidade de que estas variações possam ser devidas a alterações externas.

Demonstrou-se igualmente que, para esta espécie, a razão E/A não é constante e varia inversamente com frequência cardíaca, apresentando valores inferiores a 1, para FCs elevadas e superiores a 1, para FCs baixas. Lai *et al.* (1998) obtiveram registos Doppler de velocidade do fluxo de enchimento ventricular de três espécies de teleósteos (*Paralabrax nebulifer*, *Monopterus albus* e *Chana striatus*) e calcularam o integral velocidade-tempo das duas ondas obtidas de forma a determinar a contribuição de cada fase para o volume diastólico final. Este autores verificaram que a onda E é significativamente superior à onda A no *Paralabrax* e *Monopterus* e não significativamente diferente para a *Chana*. Neste

trabalho não foi, no entanto, estudada a variação da razão entre as duas ondas em relação à frequência cardíaca e o número de indivíduos estudados é muito baixo ($n=4$).

Para o homem, a fase precoce contribui com aproximadamente 80 % para o enchimento ventricular, enquanto a fase tardia contribui com 15 % (Fragata, 1991). A razão E/A apresenta valores normais de $1,9 \pm 0,6$ e as alterações deste parâmetro podem estar associadas à idade (Klein e Cohen, 1992; Arrighi e Soufer, 1995) e a várias patologias cardiovasculares: hipertensão arterial essencial (Coucelo *et al.*, 1995 a, b), doença coronária (Iliceto *et al.*, 1988), cardiomiopatias hipertróficas (Takenaka *et al.*, 1986a) e cardiomiopatias dilatadas (Takenaka *et al.*, 1986b).

O tipo de perfil obtido para FCs elevadas no presente estudo (onda E inferior à onda A) é semelhante ao obtido para o Homem, em situações que levam à anomalia do relaxamento (Appleton *et al.*, 1988; Fragata, 1991; Pai e Shah, 1995).

Estudos efectuados sobre o efeito da FC no enchimento ventricular no homem demonstraram que o aumento da FC acelera o relaxamento e, conseqüentemente, aumenta a velocidade do enchimento precoce (Fioretti, 1980; Takaeuchi, 1985). O aumento da FC provoca ainda encurtamento da diástase e tendência para a sobreposição da onda E e A (Bessen e Gardin, 1990). Por outro lado, Appleton (1991) refere que a taquicárdia reduz a importância da fase de enchimento rápido e aumenta a do enchimento lento. O mesmo tipo de resposta foi observado no presente estudo para a espécie *H. didactylus*. Os resultados obtidos indicam que, nesta espécie, o enchimento ventricular precoce parece estar dependente do tempo disponível para o relaxamento, uma vez que, quanto mais baixa for a FC, maior é o tempo da TRI e da TEP, enquanto o TET não varia. De facto, o estudo dos intervalos diastólicos revelou que, para indivíduos com FCs baixas e com onda E de elevada velocidade, o tempo de relaxamento isovolumétrico e o tempo do enchimento precoce são mais longos e a diástase é muito longa, ocupando a maior parte do ciclo. O aumento da contribuição da onda E para o volume diastólico do ventrículo poderá constituir um mecanismo de compensação para frequências cardíacas mais baixas em espécies com baixa actividade, que poderiam comprometer um débito cardíaco suficiente para fazer face às necessidades do organismo. Neste contexto, os dados apontam para a contracção auricular como o principal determinante do enchimento ventricular, para FCs elevadas, onde não parece haver tempo suficiente para um relaxamento completo antes da contracção auricular. Com efeito, o aumento da frequência cardíaca parece ser feito essencialmente à custa da diástole, mais especificamente pelo encurtamento da diástase.

A função diastólica do ventrículo tem sido descrita com base em dois parâmetros distintos, determinantes do enchimento ventricular: a) o relaxamento, responsável pela primeira fase de enchimento, e b) a distensibilidade, que determina quanto o ventrículo pode encher no fim da diástole, quando a aurícula contrai (Gilbert e Glantz, 1989; Yellin *et al.*, 1990; Mirsky e Pasipoularides, 1990; Thomas e Weyman, 1991). Este estudo demonstra que o relaxamento ventricular é um dos determinantes do enchimento do ventrículo da espécie *H. didactylus*, estando a sua contribuição dependente da frequência cardíaca, nomeadamente do tempo de relaxamento isovolumétrico e do tempo de enchimento precoce. Por outro lado, não é ainda possível estabelecer um valor E/A geral para os peixes e estudos futuros devem ter em conta que o tipo de perfil de enchimento está dependente de factores intrínsecos, como a FC. Factores externos e situações patológicas poderão também alterar estes parâmetros e, por isso, devem ser tidos em conta na avaliação da função diastólica.

A ecocardiografia Doppler demonstrou ser uma técnica exequível e reproduzível para o estudo do fluxo de enchimento ventricular em peixes. O registo Doppler de velocidade obtido a partir de incidências longitudinais e transversais apresentou o mesmo perfil, o que viabiliza a utilização de ambas as abordagens para estudar este fluxo e as suas alterações em diferentes situações experimentais ou fisiopatológicas.

Novos desenvolvimentos da ecocardiografia Doppler têm sido utilizados para aperfeiçoar o diagnóstico precoce de patologias cardiovasculares com alteração da função diastólica (Pai e Shah, 1993; Takatsuji *et al.*, 1996; Garcia *et al.*, 1998). Estes desenvolvimentos poderão ser de grande utilidade para a continuação do estudo dos factores que controlam o enchimento ventricular nos peixes.

4.5. CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que o enchimento ventricular na espécie *H. didactylus* apresenta um perfil bifásico, com um enchimento precoce, devido ao relaxamento ventricular e um enchimento tardio devido à contracção auricular. Este estudo prova que o enchimento bifásico do ventrículo é comum a todos os grupos de vertebrados.

Demonstrou-se igualmente que, para esta espécie, a razão E/A não é constante e varia inversamente com frequência cardíaca, apresentando valores inferiores a 1 para FCs elevadas e superiores a 1 para FCs baixas. Estes estudos deverão ser realizados noutras

espécies de peixes, especialmente com actividades metabólicas mais elevadas, para verificar se a dependência da razão E/A relativamente à FC é comum aos vários grupos de peixes.

O estudo dos intervalos diastólicos nesta espécie permitiu concluir que a diástole ocupa a maior parte do ciclo cardíaco, apresentando uma relação inversa com a FC (quer em tempo quer em percentagem). O aumento da FC é feito à custa do encurtamento da diastase e do relaxamento activo do ventrículo (TRI e TEP), enquanto o enchimento tardio apresenta uma duração praticamente constante, independente das variações da FC.

A maior contribuição da onda E para o volume diastólico do ventrículo, verificada a frequências cardíacas mais baixas, poderá constituir um mecanismo de compensação para aumentar o débito cardíaco, de modo a fazer face às necessidades do organismo. Este estudo demonstra que o relaxamento ventricular é um dos determinantes do enchimento do ventrículo da espécie *H. didactylus*, estando a sua contribuição dependente da frequência cardíaca, nomeadamente do tempo de relaxamento isovolumétrico e do tempo de enchimento precoce. Por outro lado, não é ainda possível estabelecer um valor E/A geral para os peixes e estudos futuros devem ter em conta que o tipo de perfil de enchimento está dependente de factores intrínsecos, como a FC.

A ecocardiografia Doppler demonstrou ser uma técnica exequível e reproduzível para o estudo do fluxo de enchimento ventricular em peixes.

5. DETERMINAÇÃO DO PADRÃO DE CONTRACÇÃO, VOLUMES, MASSA E ÍNDICES FUNCIONAIS DO VENTRÍCULO POR ECOCARDIOGRAFIA BIDIMENSIONAL

5.1. INTRODUÇÃO

A caracterização de aspectos anatómicos das câmaras cardíacas é de grande importância para a avaliação da função e da relação morfologia-fisiologia do coração. A ecocardiografia bidimensional (2D) é uma técnica não-invasiva que tem permitido obter imagens das estruturas cardíacas, com elevado detalhe anatómico e funcional. Tendo em conta que esta técnica permite obter imagens com boa definição estrutural, possibilita também a medição rigorosa de diâmetros externos e internos das cavidades, de forma não-invasiva (Coucelo *et al.*, 1996). Estas dimensões lineares podem ser utilizadas para estudar diversos aspectos da dinâmica cardíaca, nomeadamente o padrão de contracção, através da avaliação da variação e da relação dos diâmetros do ventrículo ao longo do ciclo cardíaco (Auriggemma *et al.*, 1995), e variações volumétricas que, por sua vez, podem ser utilizados na quantificação de parâmetros de grande importância para avaliar a eficiência cardíaca, como o volume de ejeção, a fracção de ejeção, o débito cardíaco e a massa ventricular. Por outro lado, a ecocardiografia em modo-M (MM) permite obter detalhes do movimento das paredes do ventrículo ao longo do tempo e permite calcular, com muito rigor, a variação dos diâmetros internos ao longo do ciclo cardíaco e derivar outro importante parâmetro de função cardíaca, a fracção de encurtamento (Auriggemma *et al.*, 1995).

Vários modelos geométricos têm sido aplicados de modo a simular a forma do ventrículo e calcular os volumes ventriculares, a partir das dimensões lineares obtidas das imagens de ecocardiografia 2D. As técnicas de reconstrução tridimensional não necessitam de pressupostos geométricos e os volumes calculados são adequados para ventrículos de qualquer forma e tamanho (Pai e Shah, 1995). No entanto, os métodos lineares são mais simples de obter e, se forem considerados os pressupostos correctos, dão resultados precisos.

Até ao momento, a quantificação das variações volumétricas do coração de vertebrados inferiores tem sido feita com base em técnicas invasivas, com implante de transdutores de pressão. Franklin e Davie (1992) utilizaram pela primeira vez a

ecocardiografia para descrever variações nas dimensões e nos volumes do lúmen do ventrículo da truta utilizando uma preparação com o coração perfundido *in situ*. Estes autores não obtiveram imagens com boa definição do endocárdio e calcularam os volumes de forma indirecta a partir dos dados invasivos. Posteriormente, Sande e Pope (1995) aplicaram a ecocardiografia em salmões provenientes de cultivo e do meio selvagem para identificar e separar animais com cardiomiopatias. Neste estudo a ecocardiografia em MM aplicada foi complexa, demorada e não permitiu calcular a fracção de encurtamento por não ter sido possível obter um delineamento satisfatório do endocárdio nas imagens captadas.

Coucelo *et al.* (1993, 1994 e 1996) têm vindo a aplicar a ecocardiografia ao estudo de morfologia e função cardíacas em vertebrados inferiores e obtiveram imagens 2D com elevada resolução das estruturas cardíacas e dos seus movimentos com informação anatómica e funcional detalhada.

Este estudo teve como objectivo determinar dimensões lineares do ventrículo de *Halobatrachus didactylus* a partir de imagens ecocardiográficas 2D, de para (a) caracterizar o seu padrão de contracção ao longo do ciclo cardíaco e (b) comparar quatro modelos lineares de cálculo de volumes do ventrículo, para estudar variações volumétricas e derivar índices de função ventricular.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Grupo experimental

Neste estudo foram incluídos 10 indivíduos, 7 machos e 3 fêmeas, com pesos entre 313 e 939 g. A metodologia utilizada nos exames ecocardiográficos encontra-se descrita no Capítulo II e para este estudo em particular foram utilizados os ecógrafos *Aloka SSD 830* e *Acuson Sequoia* com sondas lineares de 5 MHz (com adaptador vascular) e 8 MHz de frequência de emissão, respectivamente.

5.2.2. Metodologia ecocardiográfica

Para todos os animais foram registadas imagens 2D em incidência sagital e transversal, em vários níveis das câmaras cardíacas. Foram também registadas imagens em MM, simultaneamente com as imagens 2D, tanto em curto como em longo eixo. Cada

registo foi efectuado em pelo menos três ciclos cardíacos consecutivos e em simultâneo com o registo electrocardiográfico.

5.2.3. Dimensões lineares

Para o estudo do padrão de contracção do ventrículo da espécie *H. didactylus* foram seleccionadas e digitalizadas todas as imagens individuais (intervalo de 0,04 s) ao longo de um ciclo cardíaco completo. O programa de análise de imagem *Optimas 6.2* foi aplicado para a medição dos seguintes parâmetros lineares (Fig. III.5.1):

1. **Diâmetros longitudinais externos e internos** – o diâmetro externo máximo foi medido a partir do contorno externo do ventrículo desde o limite do apex até à base; o diâmetro interno foi obtido a partir do contorno interno do lado do apex até à válvula ventrículo-bulbar.
2. **Diâmetros transversais externos e internos** – estas medições foram definidas perpendicularmente e centradas em relação aos diâmetros longitudinais.

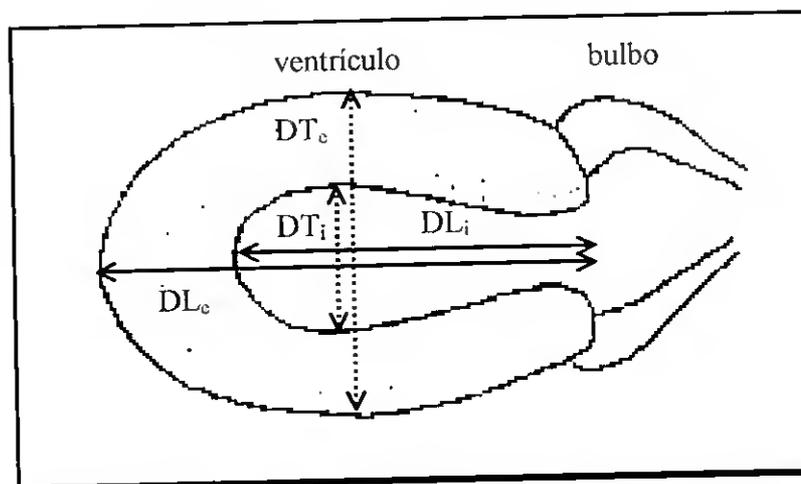


Figura III.5.1 – Representação esquemática do corte longitudinal do ventrículo de *H. didactylus* obtido por ecocardiografia 2D, indicando as medições efectuadas: DL_e - diâmetro longitudinal externo; DL_i - diâmetro longitudinal interno; DT_e - diâmetro transversal externo; DT_i - diâmetro transversal interno.

A variação dos parâmetros lineares referidos ao longo do ciclo cardíaco foi apresentada em função da percentagem e não do tempo do ciclo cardíaco, para garantir independência em relação à frequência cardíaca. Além disso, foi ainda estudada a razão entre os diâmetros transversos e longitudinais, externos e internos, para avaliar a evolução da forma ventricular ao longo do ciclo cardíaco.

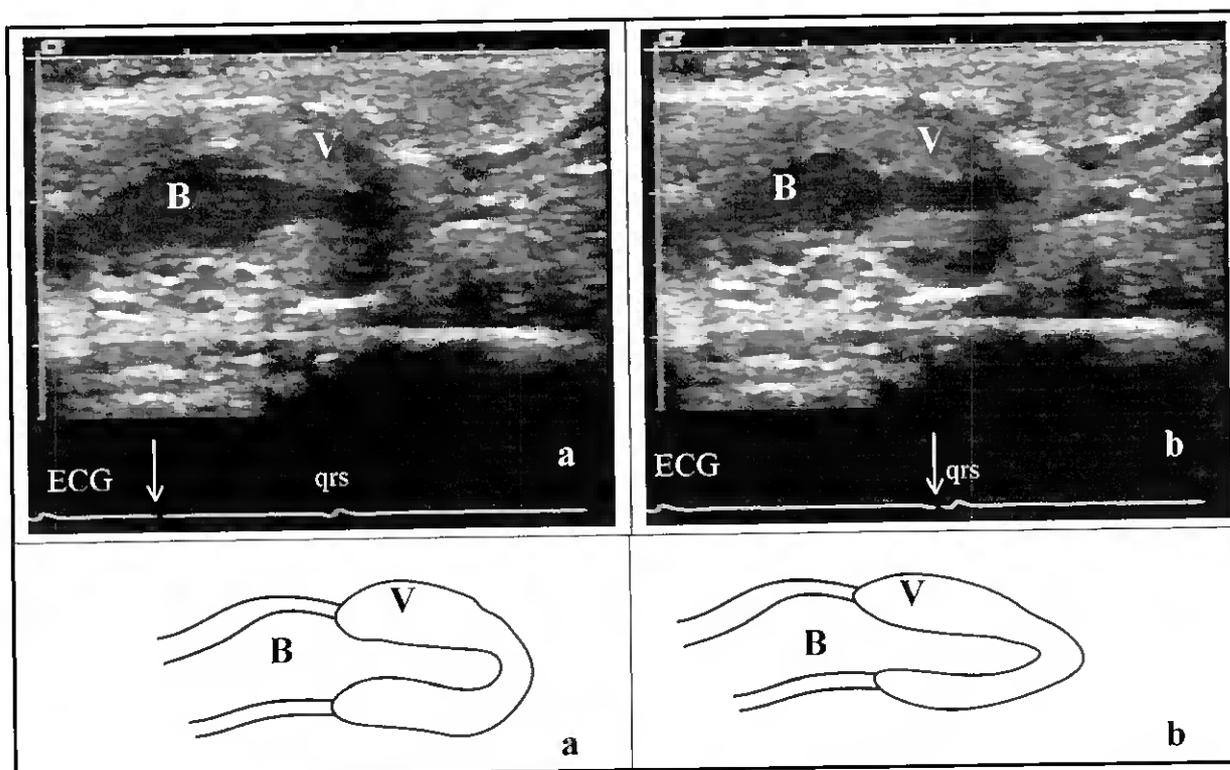


Figura III.5.2 – Imagens ecocardiográficas 2D longitudinais do ventrículo de *H. didactylus*, utilizadas para determinação dos diâmetros ventriculares, em telesístole (a) e telediástole (b). A seta branca indica no traçado electrocardiográfico (ECG) o momento do ciclo cardíaco em que foi registada a imagem. Em baixo, representação esquemática do contorno das estruturas: ventrículo (V) e bulbo (B) (cortesia de António Granja Publicidade).

Para as determinações volumétricas, os parâmetros lineares a estudar foram obtidos de imagens seleccionadas, no fim da sístole (telesístole) e no fim da diástole (telediástole) (Fig. III.5.2). Devido ao padrão de contracção deste ventrículo, o volume máximo (na telediástole) é obtido no início da ejeção ventricular e o volume mínimo (na telesístole) é obtido no início da diastase. Estes intervalos do ciclo cardíaco foram reconhecidos através de observação visual do movimento das câmaras, do sinal electrocardiográfico e do registo Doppler do fluxo de ejeção ventricular.

5.2.4. Cálculo de volumes

Os volumes externos e internos do ventrículo (expressos em ml) na telesístole (VTS) e na telediástole (VTD) foram calculados aplicando quatro modelos geométricos, que pretendem simular a forma do ventrículo, com base nas medições lineares definidas anteriormente:

1. **Método cúbico** (Feigenbaum *et al.*, 1972) – assume que o ventrículo tem uma forma esférica e que a sua parede tem movimentos simétricos e o volume é obtido pela seguinte expressão:

$$V = D^3 \quad [\text{III.5.1}]$$

onde D representa o eixo menor do ventrículo.

2. **Método de Teichholz** (Teichholz *et al.*, 1976) – calcula o volume (V) a partir do diâmetro do menor eixo (D) e pretende aproximar-se à forma do ventrículo corrigindo a fórmula cúbica:

$$V = \frac{7,0}{2,4 + D} \times D^3 \quad [\text{III.5.2}]$$

3. **Método de Área-comprimento** (Pai e Shah, 1995) – modelo biplanar que assume que o ventrículo tem uma forma elíptica; o volume é calculado a partir da fórmula:

$$V = 0,524 \times D_1 \times D_2 \times L \quad [\text{III.5.3}]$$

onde D1 e D2 são os diâmetros ortogonais do eixo menor e L é o diâmetro do longo eixo.

4. **Método de Simpson** (Schiller *et al.*, 1989) – consiste em seccionar o ventrículo em discos de espessura finita, desde o apex até à base, e o volume total é obtido pela adição dos volumes individuais de cada disco:

$$V = \sum_{i=1}^n A_i \times T \quad [\text{III.5.4}]$$

onde A representa a área de cada disco e T a sua espessura.

Para o cálculo de volume foram considerados 20 a 30 discos com 0,03 a 0,05 mm de espessura. A área de cada disco foi calculada a partir do seu eixo transversal, assumindo a forma circular.

5.2.5. Validação do cálculo do volume

Os dados volumétricos obtidos através da aplicação dos diferentes algoritmos foram comparados com dados volumétricos obtidos dos mesmos ventrículos, após o sacrifício dos animais, de modo a verificar qual o método mais fiável para o cálculo não-invasivo dos volumes nesta espécie.

O **volume do miocárdio ventricular** (VMV), que representa o volume relativo ao miocárdio, foi obtido de duas formas:

- a) através da diferença entre os volumes externos e internos do ventrículo, calculados a partir das imagens ecocardiográficas 2D, em telesístole e telediástole ($VMV_{\text{algoritmo}}$):

$$\text{Volume do miocárdio ventricular} = \text{volume externo} - \text{volume interno} \quad [\text{III.5.5}]$$

- b) a partir da razão entre o peso de ventrículo (massa do miocárdio) e a densidade específica para o miocárdio (1,013 para esta espécie, Capítulo III.1) (VMV_{peso}):

$$\text{Volume do miocárdio ventricular} = \frac{\text{Peso do ventrículo}}{\text{Massa volúmica do miocárdio}} \quad [\text{III.5.6}]$$

Para a validação do cálculo dos volumes foram correlacionadas as duas séries de dados volumétricos, em telesístole e telediástole.

5.2.6. Índices de função ventricular

Neste estudo alguns parâmetros de avaliação de função cardíaca foram obtidos de duas formas diferentes: a partir de medições lineares de imagens em MM e de dados volumétricos de imagens de ecocardiografia 2D:

1. Fração de encurtamento

A partir de imagens em MM (Fig. III.5.3) é possível calcular a **fracção de encurtamento** (FEn) do ventrículo. Este índice resulta da razão entre a diferença do diâmetro interno ventricular em telediástole (DTD) e em telesístole (DTS) e o DTD, expresso em percentagem, e representa o encurtamento vertical do lúmen ventricular:

$$FEn = \frac{DTD - DTS}{DTD} \times 100 \quad [\text{III.5.7}]$$

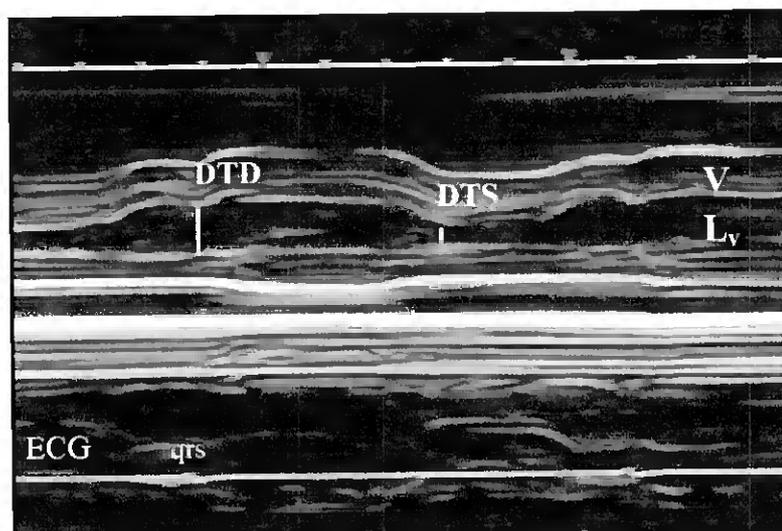


Figura III.5.3 – Imagem em MM do ventrículo de *H. didactylus*, com traçado electrocardiográfico simultâneo, indicando as medições lineares efectuadas: DTD – diâmetro na telediástole; DTS – diâmetro na telesístole (parede ventricular (V); lúmen ventricular (L_v)).

2. Volume de ejeção

O **volume de ejeção** (VE) representa o volume de sangue (expresso em ml) bombeado a cada ciclo cardíaco e é calculado pela diferença entre o VTD e o VTS:

$$VE = VTD - VTS \quad [III.5.8]$$

Nos mamíferos, o VE é usualmente calculado a partir das variações volumétricas luminiais do ventrículo entre a telesístole e a telediástole. Neste trabalho, calculou-se o VE a partir dos volumes externos ($VE_e = VTD_e - VTS_e$) e internos ($VE_i = VTD_i - VTS_i$), assumindo que a massa ventricular é igual em sístole e diástole. Considerando que a massa não varia ao longo do ciclo cardíaco:

$$VE_i = VE_e \quad [III.5.9]$$

Compararam-se os resultados obtidos para os dois cálculos do VE.

Nos peixes, tendo em conta que a massa cardíaca apresenta variações intra e interespecíficas consideráveis, o volume de ejeção é normalmente expresso por quilograma de peso corporal, VE_e .

3. Fracção de ejeção

A **fracção de ejeção** (FEj) define a fracção do volume do ventrículo que é ejectado em cada ciclo cardíaco, expresso em percentagem, considerando o volume máximo no fim da diástole (VTD) e o volume mínimo no fim da sístole (VTS):

$$FE = \frac{VTD - VTS}{VTD} \times 100 \quad [\text{III.5.10}]$$

Neste estudo, a diferença entre o VTD e o VTS foi calculada a partir dos volumes externos e o VTD foi calculado pelo soma do VE_e com o VTS_i . Este é um dos índices mais utilizados para avaliar a função sistólica e pode ser utilizado independentemente do tamanho do ventrículo (Aurigemma *et al.*, 1995).

4. Débito Cardíaco

O **Débito Cardíaco** (DC) é calculado como o produto do volume de ejeção pela frequência cardíaca, expresso em ml/min:

$$DC = VE \times FC \quad [\text{III.5.11}]$$

O DC representa o volume de sangue bombeado pelo ventrículo por minuto e é o índice funcional mais utilizado para avaliar a função cardíaca. Tal como para o VE, o débito cardíaco nos peixes é normalmente expresso por quilograma de peso corporal, DC_c .

5. Massa ventricular

A **massa do ventrículo** foi calculada a partir do volume do miocárdio ventricular e da massa específica do miocárdio:

$$\text{Massa Ventricular} = (VTD_e - VTD_i) \times \text{massa específica} \quad [\text{III.5.12}]$$

5.2.7. Análise estatística

Todos os dados apresentados representam a média de medições efectuadas em pelo menos três ciclos cardíacos diferentes. A análise de regressão linear simples foi usada para avaliar a significância deste modelo aplicado entre o volume do miocárdio ventricular obtido a partir dos algoritmos e o volume do miocárdio ventricular obtido a partir do peso. O nível de significância utilizado foi de 5% ($\alpha=0,05$).

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Qualidade das imagens de ecocardiografia 2D

As imagens ecocardiográficas 2D do coração de *H. didactylus* obtidas por ambos os ecógrafos utilizados neste estudo foram de boa qualidade e permitiram uma definição clara do bordo do endocárdio e do contorno externo do ventrículo. No entanto, importa referir que a escolha das imagens para as medições é um factor determinante para este estudo, uma vez que nem todas as imagens obtidas são apropriadas. Dois aspectos principais devem ser tidos em conta:

- a) A visualização completa e clara das estruturas é essencial para que a quantificação a partir dessas imagens seja fiável. Assim, é essencial escolher imagens com boa definição do endocárdio e do apex. Este são os dois aspectos mais difíceis de visualizar apropriadamente nas imagens ecocardiográficas deste modelo experimental. A revisão de vários ciclos cardíacos ajuda de forma importante na escolha das imagens com estruturas melhor definidas. A orientação da sonda relativamente às estruturas a estudar é também um aspecto muito importante a ter em conta, uma vez que planos oblíquos das estruturas conduzem a medições erróneas.
- b) O segundo aspecto essencial é a escolha do momento exacto do ciclo cardíaco para efectuar as medições. Definir claramente a telesístole e a telediástole é essencial para o cálculo dos parâmetros funcionais – VE, DC, FE_j e FEn. A observação visual do movimento das estruturas, o sinal electrocardiográfico e o registo Doppler do espectro de velocidade foram usados em conjunto para seleccionar as imagens para medições. Importa salientar que a telesístole e a telediástole foram escolhidas tendo em conta o momento do ciclo em que as áreas externa e interna do ventrículo são mínimas e máximas respectivamente e não correspondem à telesístole e telediástole eléctrica.

5.3.2. Dimensões lineares

Neste trabalho estudou-se a variação das dimensões lineares do ventrículo de forma contínua, ao longo de todo o ciclo cardíaco, de modo a caracterizar o padrão de contracção deste ventrículo. Para interpretação do movimento das paredes do ventrículo ao longo do ciclo cardíaco, este foi dividido nos seus intervalos sistólicos e diastólicos.

A Figura III.5.4 representa a variação dos diâmetros transversos e longitudinais, externos e internos do ventrículo ao longo do ciclo cardíaco de um dos exemplares estudados.

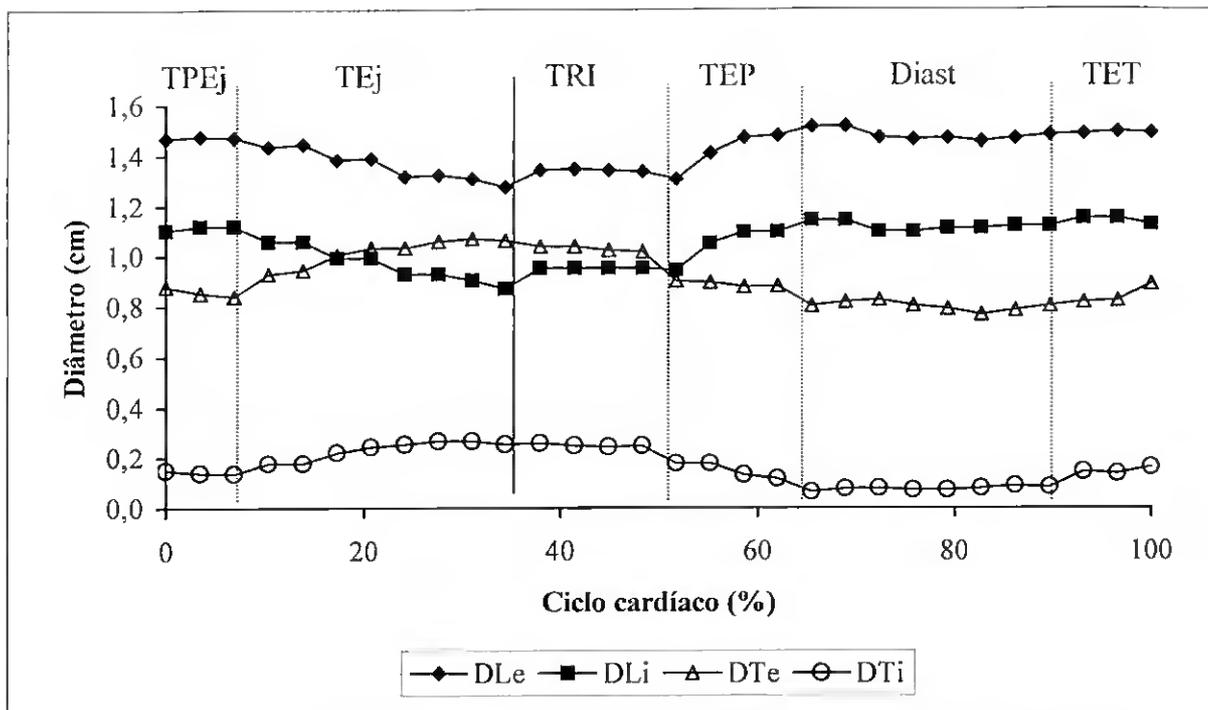


Figura III.5.4 - Variação dos diâmetros transversos (DT) e longitudinais (DL), externos (e) e internos (i) do ventrículo ao longo do ciclo cardíaco, de um exemplar da espécie *H. didactylus*: 763 g, 32 cm comprimento, macho, FC=30 bpm (TPEj - tempo de pré-ejecção, TEj - tempo de ejeção, TRI - tempo de relaxamento isovolumétrico, TEP - tempo de enchimento precoce, Diast - diástase e TET - tempo de enchimento tardio).

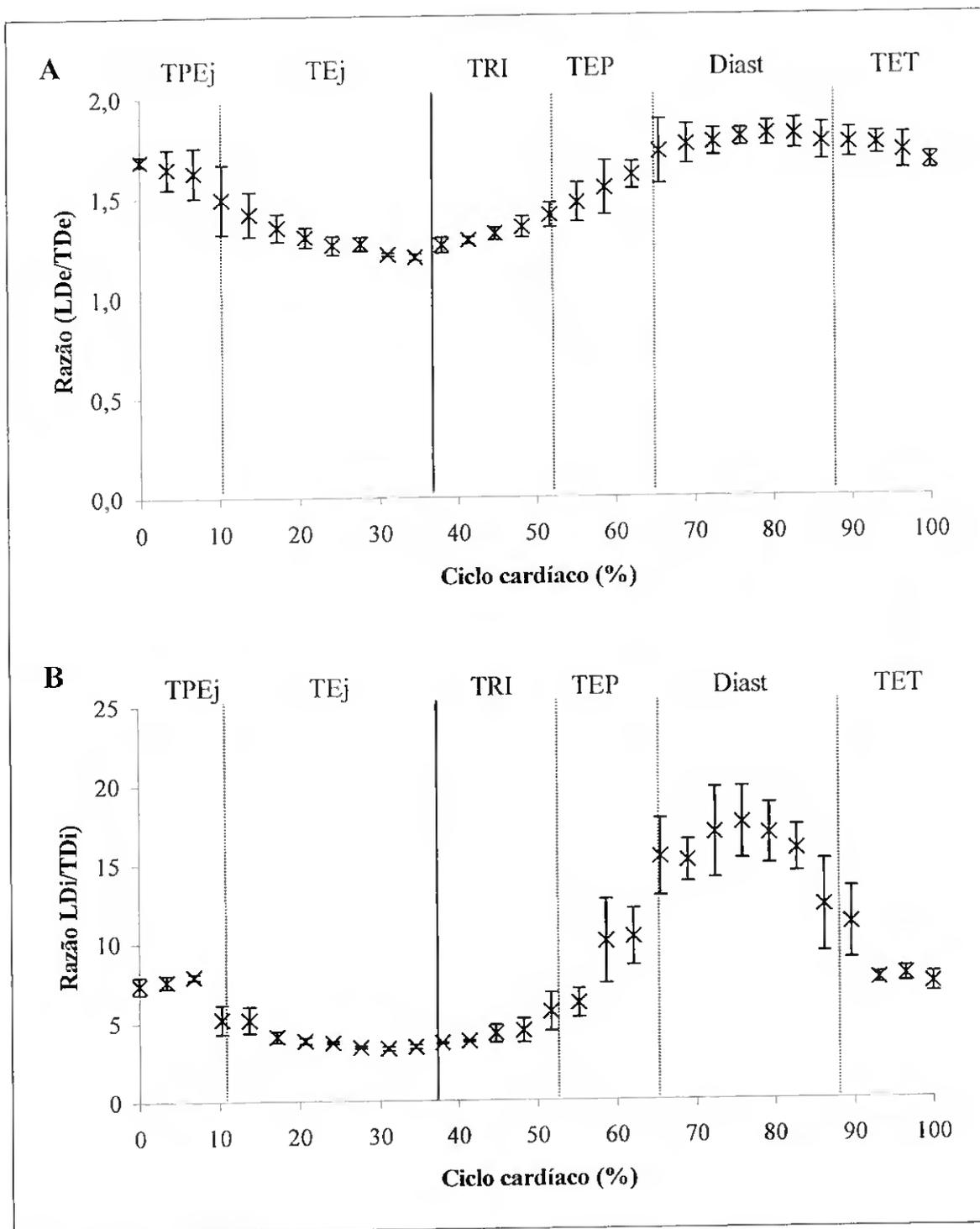


Figura III.5.5 - Variação da razão entre os diâmetros longitudinais (DL) e transversos (DT), externos (A) e internos (B) do ventrículo de *H. didactylus*, ao longo do ciclo cardíaco (TPEj - tempo de pré-ejecção, TEj - tempo de ejeção, TRI - tempo de relaxamento isovolumétrico, TEP - tempo de enchimento precoce, diast - diástase e TET - de enchimento tardio).

De um modo geral verificou-se uma variação inversa entre os diâmetros transversos e longitudinais: durante o tempo de pré-ejecção (TPEj) o ventrículo permanece isovolumétrico, não ocorrendo alteração da sua forma (diâmetros constantes); durante a ejeção ventricular,

verificou-se que o ventrículo altera significativamente a sua forma, aumentando o diâmetro transverso (DT_e , 28 %; DT_i , 92 %) e diminuindo o diâmetro longitudinal, atingindo no fim da ejeção o volume mínimo e razão diâmetro longitudinal/transverso mínima (LT_e/DT_e , 1,21; LT_i/DT_i , 3,3) (Fig. III.5.5); durante o relaxamento, ventrículo apresenta comprimento máximo e diâmetro transverso mínimo com razão LT_e/DT_e e LT_i/DT_i baixas, de 1,8 e 17,5, respectivamente (Fig. III.5.5); na última fase da diástole (contração auricular), verifica-se um aumento do diâmetro transverso, atingindo o ventrículo a sua dimensão máxima no fim da sístole.

Para as determinações volumétricas foram utilizadas os diâmetros lineares do ventrículo obtidos em telesístole e telediástole (Tabela III.5.1).

Tabela III.5.1 – Registo dos diâmetros ventriculares de *H. didactylus* (n=10) em telesístole e telediástole, obtidos por ecocardiografia 2D.

Massa corporal ⁵	DT_e ¹		DL_e ²		DT_i ³		DL_i ⁴	
	Sístole	Diástole	Sístole	Diástole	Sístole	Diástole	Sístole	Diástole
0,312	0,708	0,819	0,985	0,909	0,071	0,192	0,615	0,527
0,452	0,804	0,979	1,167	1,052	0,092	0,227	0,777	0,703
0,475	0,512	0,655	0,896	0,879	0,032	0,175	0,613	0,557
0,493	0,660	0,855	1,241	1,189	0,087	0,210	0,706	0,899
0,540	0,776	1,027	1,330	1,227	0,058	0,240	0,932	0,806
0,569	0,964	1,075	1,300	1,254	0,110	0,261	0,940	0,873
0,622	0,733	0,891	1,547	1,366	0,097	0,246	1,086	0,967
0,763	0,661	1,094	1,241	1,452	0,065	0,311	0,989	1,048
0,876	0,864	0,980	1,307	1,207	0,123	0,235	0,917	0,763
0,939	0,864	1,060	1,370	1,255	0,144	0,312	0,925	0,863

¹ diâmetro transverso externo, ² diâmetro longitudinal externo, ³ diâmetro transverso interno, ⁴ diâmetro longitudinal interno, ⁵ massa corporal em kg

5.3.3. Dados volumétricos

Neste estudo foram calculados os volumes externos e internos em telesístole (VTS) e telediástole (VTD) utilizando os quatro algoritmos descritos anteriormente (Tabela III.5.2).

O VTS_i calculado apresentou valores muito baixos, próximos de zero, para todos os métodos utilizados. Em geral, os métodos Cúbico e de Teichholtz produziram valores volumétricos superiores ao método de Área-Comprimento e método de Simpson.

Os dados volumétricos obtidos com cada um dos algoritmos aplicados foram comparados com os volumes dos mesmos ventrículos, calculados a partir da massa ventricular (Fig. III.5.6, Tabela III.5.3). Foram aplicadas regressões lineares para testar a correlação entre o VMV derivado dos algoritmos ($VMV_{\text{algoritmos}}$) e o VMV derivado do peso (VMV_{peso}), em telediástole (Fig. III.5.6 A) e telesístole (Fig. III.5.6 B).

O VMV calculado por cada um dos algoritmos, em telediástole, apresentou uma correlação significativa ($p < 0,05$) com o VMV_{peso} . O método Cúbico e o de Teichholz sobre-estimam claramente o volume real (cerca de 2 e 4 vezes, respectivamente) e apresentam uma baixa correlação com o VMV_{peso} . Os métodos de Área-Comprimento e de Simpson deram resultados semelhantes (declives de 0,87 e 0,88, respectivamente), embora o método de Simpson tenha apresentado a melhor correlação com o VMV_{peso} ($r^2 = 0,87$). As regressões lineares de ambos os métodos apresentam declives não significativamente diferentes de 1 ($p < 0,05$), o que significa que os dados obtidos por ambos os métodos não são significativamente diferentes dos dados obtidos a partir do peso da peça. De qualquer modo, de entre os métodos estudados, o método de Simpson é aquele que calcula volumes mais aproximados aos volumes reais. Em telesístole, apenas o VMV_{Simpson} apresenta uma correlação significativa com VMV_{peso} ($r^2 = 0,78$; $p < 0,05$), sub-estimando o volume real em cerca de 5 %.

Tabela III.5.2 – Registo dos volumes ventriculares de *H. didactylus* (n=10) obtidos por quatro métodos lineares: *Cúbico, Teichholz, Área-Comprimento e Simpson*.

Massa Corp. ⁵	Cúbico				Teichholz				Área - Comprimento				Simpson			
	VTS _e ¹	VTD _e ²	VTS _i ³	VTD _i ⁴	VTS _e	VTD _e	VTS _i	VTD _i	VTS _e	VTD _e	VTS _i	VTD _i	VTS _e	VTD _e	VTS _i	VTD _i
0,312	0,354	0,555	0,000	0,007	0,798	1,196	0,001	0,019	0,259	0,320	0,002	0,010	0,289	0,329	0,003	0,016
0,452	0,520	0,937	0,001	0,012	1,136	1,942	0,002	0,031	0,395	0,528	0,003	0,019	0,389	0,440	0,006	0,030
0,475	0,134	0,282	0,000	0,005	0,323	0,645	0,000	0,014	0,123	0,198	0,000	0,009	0,252	0,366	0,001	0,016
0,493	0,287	0,626	0,001	0,009	0,657	1,346	0,002	0,025	0,283	0,456	0,003	0,021	0,298	0,417	0,003	0,022
0,540	0,468	1,083	0,000	0,014	1,031	2,213	0,001	0,037	0,420	0,678	0,002	0,024	0,344	0,506	0,007	0,049
0,569	0,896	1,244	0,001	0,018	1,865	2,505	0,004	0,047	0,633	0,760	0,006	0,031	0,480	0,630	0,009	0,033
0,622	0,393	0,708	0,001	0,015	0,879	1,506	0,003	0,039	0,435	0,569	0,005	0,031	0,398	0,522	0,008	0,039
0,763	0,289	1,309	0,000	0,030	0,660	2,623	0,001	0,078	0,284	0,910	0,002	0,053	0,498	0,658	0,004	0,056
0,876	0,645	0,941	0,002	0,013	1,384	1,948	0,005	0,034	0,511	0,607	0,007	0,022	0,474	0,609	0,011	0,035
0,939	0,644	1,192	0,003	0,030	1,381	2,411	0,008	0,078	0,535	0,739	0,010	0,044	0,660	0,879	0,011	0,051

¹ Volume telesistólico externo, ² Volume telediastólico externo, ³ Volume telesistólico interno, ⁴ Volume telediastólico interno (expressos em ml), ⁵ massa corporal em kg

Tabela III.5.3 – Registo do volume do miocárdio ventricular de *H. didactylus* (n=10), em telesístole e telediástole, derivado de quatro métodos lineares e do peso do ventrículo.

Massa Corporal	Cúbica		Teichholz		Área - Comprimento		Simpson		VMV _{peso}
	Sístole	Diástole	Sístole	Diástole	Sístole	Diástole	Sístole	Diástole	
0,312	0,543	0,354	1,177	0,797	0,310	0,257	0,313	0,286	0,237
0,452	0,925	0,519	1,911	1,134	0,509	0,392	0,410	0,383	0,306
0,475	0,277	0,134	0,631	0,323	0,189	0,123	0,350	0,251	0,346
0,493	0,617	0,286	1,321	0,655	0,435	0,280	0,395	0,295	0,356
0,540	1,069	0,468	2,176	1,030	0,654	0,418	0,457	0,337	0,444
0,569	1,226	0,895	2,458	1,861	0,729	0,627	0,597	0,471	0,474
0,622	0,693	0,392	1,467	0,876	0,538	0,430	0,483	0,390	0,324
0,763	1,279	0,289	2,545	0,659	0,857	0,282	0,602	0,494	0,611
0,876	0,928	0,643	1,914	1,379	0,585	0,504	0,574	0,463	0,573
0,939	1,162	0,641	2,333	1,373	0,695	0,525	0,828	0,649	0,760

Nota: volumes expressos em ml, massa corporal em kg.

Os volumes calculados pelo método de Simpson, nomeadamente os volumes externos, apresentam uma correlação significativa com o peso corporal do animal e com o peso ventricular, o que reforça a precisão das medições. Por outro lado, o VTS_i é tão baixo e tem uma variação tão baixa, que não se verifica uma correlação significativa com o peso do ventrículo.

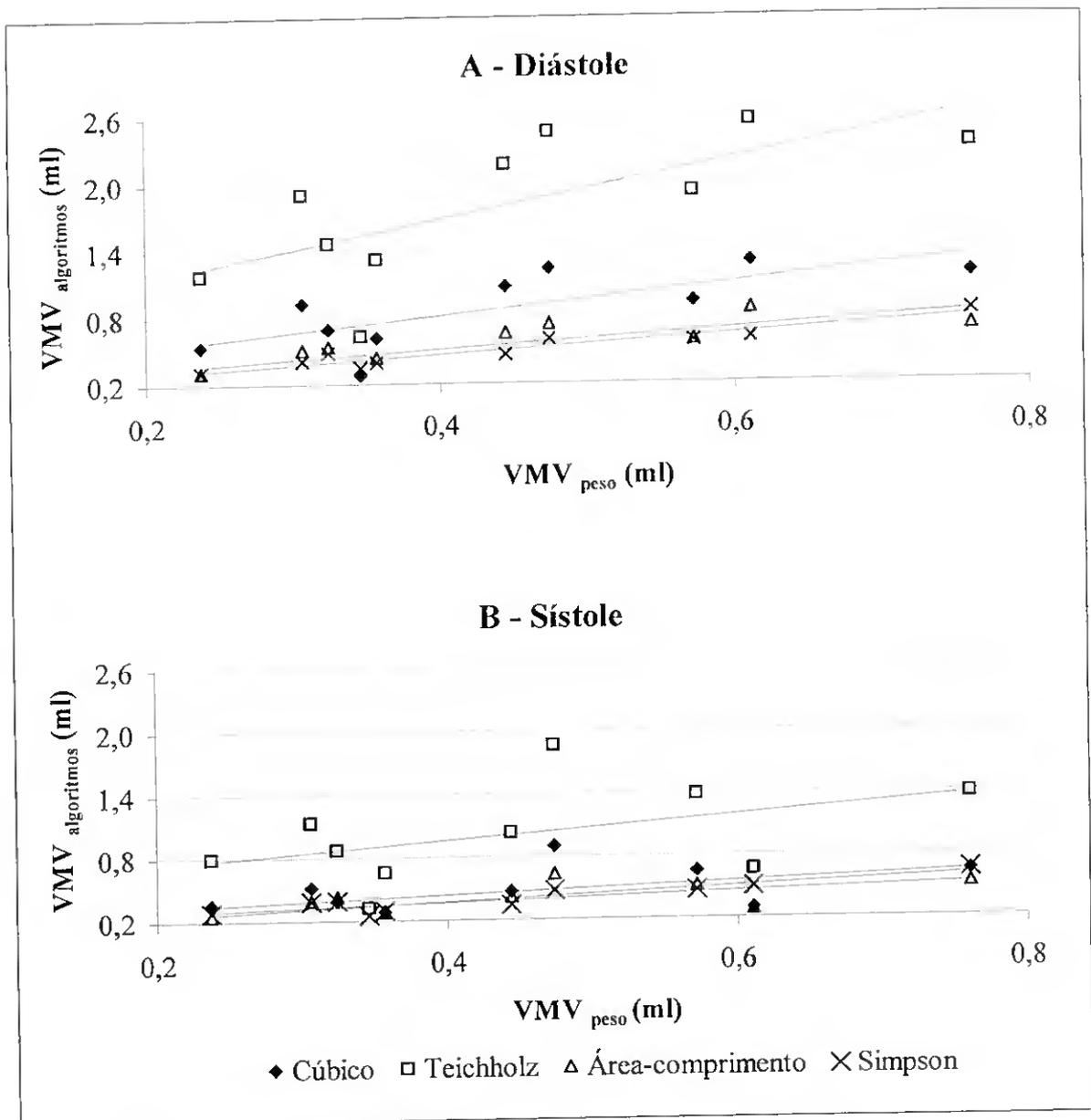


Figura III.5.6 - Correlação entre do volume do miocárdio ventricular (VMV) derivado dos algoritmos e o VMV derivado do peso em telediástole (A) e telesístole (B). As linhas representam regressões lineares entre as variáveis: A) $y(\text{Cúbico})=1,43x+0,24$; $r^2=0,50$; $y(\text{Teichholz})=2,67x+0,482$; $r^2=0,482$; $y(\text{Área-comprimento})=0,88x+0,16$; $r^2=0,51$; $y(\text{Simpson})=0,88x+0,11$; $r^2=0,88$; B) $y(\text{Cúbico})=0,56x+0,21$; $r^2=0,172$; $y(\text{Teichholz})=1,13x+0,51$; $r^2=0,17$; $y(\text{Área-comprimento})=0,44x+0,19$; $r^2=0,23$; $y(\text{Simpson})=0,651x+0,113$; $r^2=0,78$.

5.3.4. Índices de função ventricular

Os parâmetros lineares analisados permitiram calcular, através do método de Simpson, os vários parâmetros da função sistólica em estudo. Relativamente à fracção de encurtamento, registaram-se valores entre 58 e 82 %, enquanto para a fracção de ejeção, foram verificados valores entre 89,5 e 99,1 %. Estes dois parâmetros apresentam uma forte correlação entre si ($r^2=0,78$).

O volume de ejeção foi obtido a partir de volumes internos (VE_i) e externos (VE_e) do ventrículo (Tabela III.5.4). VE_i apresentou valores muito baixos (0,013-0,052 ml) sendo o VE_e cerca de 5 vezes superior (0,040-0,219 ml). O VE_e , calculado a partir do VE_i , variou entre 0,113 e 0,300 ml/kg. Este parâmetro também apresentou uma correlação linear significativa com a EF ($p < 0,05$).

A FC registada nas condições experimentais variou entre os indivíduos estudados (30-49 bpm), mas foi quase constante durante a totalidade do exame, apresentando uma variação máxima de 5 bpm. Não se verificou qualquer relação entre a frequência cardíaca e o peso corporal do animal.

O débito cardíaco foi calculado a partir dos valores do VE_{i1} e da FC e, para as condições descritas, esta espécie apresentou um valor médio de 8,3 ml/min/kg (Tabela III.5.5).

Tabela III.5.4 – Registo do volume de ejeção e débito cardíaco de *H. didactylus* (n=10).

Massa Corporal ⁶	FC ⁵ bpm	VE_i ¹ ml	VE_e ² ml	DC_i ³ ml/min	DC_e ⁴ ml/min
0,312	49	0,013	0,040	0,637	1,960
0,452	46	0,024	0,051	1,104	2,346
0,475	38	0,015	0,114	0,570	4,332
0,493	39	0,019	0,119	0,741	4,641
0,540	35	0,042	0,162	1,470	5,670
0,569	37	0,024	0,150	0,888	5,550
0,622	48	0,031	0,124	1,488	5,952
0,763	30	0,052	0,160	1,560	4,800
0,876	40	0,024	0,135	0,960	5,400
0,939	47	0,040	0,219	1,880	10,293

¹ volume de ejeção calculado a partir dos volumes internos, ² volume de ejeção calculado a partir dos volumes externos, ³ débito cardíaco calculado a partir dos volumes internos, ⁴ débito cardíaco calculado a partir dos volumes externos, ⁵ frequência cardíaca, ⁶ massa corporal expressa em kg

Tabela III.5.5 – Registo dos índices funcionais do ventrículo de *H. didactylus* (n=10), derivados pelo método de Simpson.

Massa Corporal ⁵	VE _c ¹ ml/kg	DC _c ² ml/min/kg	Fen ³ %	Fej ⁴ %	Massa g	Peso g
0,312	0,128	6,282	63,0	93,0	0,317	0,240
0,452	0,113	5,190	59,0	89,5	0,415	0,310
0,475	0,240	9,120	82,0	99,1	0,355	0,350
0,493	0,241	9,414	80,0	97,5	0,400	0,361
0,540	0,300	10,500	76,0	95,9	0,463	0,450
0,569	0,264	9,754	58,0	94,3	0,605	0,480
0,622	0,199	9,569	61,0	93,9	0,489	0,328
0,763	0,210	6,291	79,0	97,6	0,610	0,619
0,876	0,154	6,164	60,0	92,5	0,581	0,580
0,939	0,233	10,962	69,0	95,2	0,839	0,770
Média	0,208	8,325	68,7	94,9	0,507	0,449
Desvio	0,060	2,105	9,7	2,8	0,155	0,165

¹ Volume de ejeção por quilograma de massa corporal, ² Débito cardíaco por quilograma de massa corporal; ³ Fracção de encurtamento; ⁴ Fracção de ejeção, ⁵ Massa corporal expressa em kg.

A massa ventricular foi calculada por multiplicação da densidade do miocárdio com o volume de miocárdio ventricular, (obtido por diferença entre o volume diastólico externo e interno, calculados pelo método de Simpson). Estes dados de massa, obtidos a partir de uma técnica não-invasiva, apresentam uma correlação linear significativa com o peso dos ventrículos ($r^2=0,81$; $p<0,05$).

5.4. DISCUSSÃO

5.4.1. Qualidade das imagens ecocardiográficas

Neste estudo foram calculados os volumes do ventrículo da espécie *H. didactylus*, de forma não-invasiva, através de imagens obtidas por ecocardiografia 2D.

As imagens ecocardiográficas 2D do coração obtidas, por ambos os ecógrafos utilizados, foram de boa qualidade e permitiram uma definição clara do bordo do endocárdio e do contorno externo do ventrículo. A boa definição das estruturas é o aspecto fundamental para garantir a fiabilidade das medições efectuadas sobre estas imagens. Convém, no entanto, referir que as dimensões das estruturas que se pretende medir são

extremamente reduzidas (de 1,0 a 1,7 cm no eixo cranio-caudal e de 0,5 a 1,0 cm no eixo transversal), muito próximas do limite de detecção de variações dimensionais das sondas utilizadas, o que dificulta a utilização desta técnica.

Como já foi referido, a escolha das imagens adequadas é um aspecto fundamental para o sucesso da utilização deste método não-invasivo no cálculo do volume do ventrículo. A revisão das imagens em tempo real facilita grandemente o reconhecimento dos contornos das estruturas, pelo que em indivíduos que apresentam imagens menos bem definidas, é de extrema importância efectuar as medições imediatamente a seguir à sua visualização dinâmica.

5.4.2. Dados lineares e padrão de contracção

Neste estudo foi possível medir com rigor os diâmetros externos e internos do ventrículo, para todos os indivíduos amostrados. Para aumentar a sensibilidade das medições efectuadas foi utilizado um programa de análise de imagem que permitiu um limite de detecção na ordem de 10^{-3} cm.

O estudo da variação dos diâmetros transversos e longitudinais, ao longo de todo o ciclo cardíaco, permitiu verificar que a forma do ventrículo varia consideravelmente: de um modo geral, verificou-se uma variação inversa entre os diâmetros transversos e longitudinais, resultando numa forma mais arredondada durante a sístole (aumento do diâmetro transversal e diminuição do diâmetro longitudinal) e uma forma mais elíptica durante a diástole (diminuição do diâmetro transversal e aumento do diâmetro longitudinal). Estas observações indicam que quando o ventrículo contrai, o apex se move em direcção ao plano da base. Estes resultados são apoiados pela observação em tempo real da dinâmica do ventrículo nas imagens de ecocardiografia 2D e ainda pelos registos em MM dos movimentos da região central da parede em incidências longitudinais, os quais revelam que os diâmetros transversos são superiores durante a sístole (Fig. III.5.3). Por outro lado, a observação de imagens da parede ventricular em curto eixo (Fig. III.5.7, dados não apresentados) revelam que há um encurtamento do diâmetro lateral do ventrículo durante a sístole, que também resulta no aumento do diâmetro vertical. O conjunto destas observações indica que o ventrículo desta espécie apresenta um padrão de contracção característico, definido e distinto dos mamíferos.

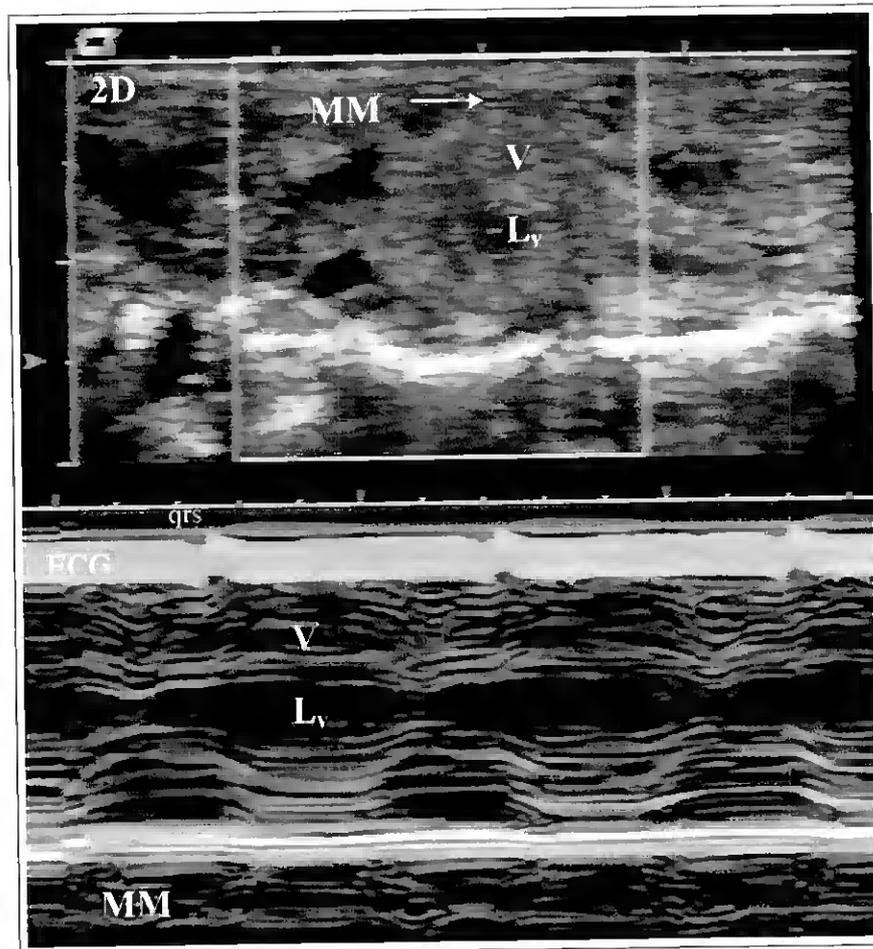


Figura III.5.7 – Imagem de ecocardiografia 2D e MM em curto eixo da região média do ventrículo de *H. didactylus*, com registo electrocardiográfico (ECG) simultâneo: V - parede ventricular; L_v - lúmen ventricular. A seta branca indica o eixo da imagem em MM.

Vários estudos demonstraram que o padrão de contracção do ventrículo está dependente do arranjo das fibras miocárdicas. No coração dos mamíferos, onde as fibras musculares apresentam uma orientação bem definida, o encurtamento das fibras circunferenciais parece ser o principal mecanismo responsável pela pressão gerada na sístole. Além disso, o movimento rotativo do apex relativamente à base parece contribuir igualmente de forma significativa para a eficiência ventricular (Aurigemma *et al.*, 1995). O coração dos peixes apresenta dois tipos típicos de arranjo do miocárdio: o miocárdio compacto constitui uma camada externa em corações de espécies activas, caracterizado por um arranjo mais ou menos orientado das fibras musculares; o miocárdio esponjoso apresenta um arranjo aleatório, excepto ao nível do orifício ventrículo-bulbar, onde as fibras tendem a orientar-se longitudinalmente e são inseridas no anel fibroso, e é característico de espécies de baixa actividade metabólica (Garcia-Martinez *et al.*, 1990;

Harrison *et al.*, 1991; Sanchez-Quintana *et al.*, 1995, 1996; Gallego *et al.*, 1997). A espécie aqui estudada apresenta baixa actividade metabólica e possui um ventrículo sacular, com 100 % de miocárdio esponjoso. Este tipo de miocárdio apresenta características distintas do músculo cardíaco típico dos mamíferos, que parecem reflectir-se num padrão de contracção particular. Os resultados indicam que, neste ventrículo, o encurtamento longitudinal e lateral são os principais factores que contribuem para a contracção, permitindo gerar o débito cardíaco necessário para fazer face às suas necessidades metabólicas.

Este estudo demonstra claramente que a ecocardiografia 2D permite estabelecer o padrão de contracção do ventrículo ao longo do ciclo cardíaco para a espécie *H. didactylus*. A comparação do padrão de contracção em diferentes espécies e em diferentes situações fisiopatológicas, permitirá esclarecer aspectos da regulação da contracção ventricular e do débito cardíaco.

5.4.3. Dados volumétricos

A determinação do volume do ventrículo reveste-se de grande importância na avaliação das variações volumétricas durante todo o ciclo cardíaco, de modo a compreender o padrão de contracção, por um lado, e as ocorrências mecânicas *versus* padrões hemodinâmicos, por outro.

Neste trabalho compararam-se quatro algoritmos diferentes para calcular volumes ventriculares, a partir de medições lineares efectuadas em imagens ecocardiográficas 2D. Tendo em conta que a técnica descrita fornece imagens com boa definição das estruturas, uma vez escolhidas as imagens certas, a medição dos diâmetros do ventrículo é uma tarefa relativamente simples. As dimensões lineares do ventrículo, externas e internas, obtidas em sístole e diástole, foram utilizadas para calcular os volumes telesistólicos e telediastólicos. Constatou-se que, para além da definição clara das estruturas, é fundamental reconhecer com exactidão a telesístole e telediástole onde serão efectuadas as medições, tendo em conta que o ventrículo desta espécie apresenta variações consideráveis da sua forma ao longo do ciclo cardíaco. Tendo em conta o padrão de contracção, o volume máximo foi registado no início da ejeção ventricular, quando o ventrículo assume uma forma mais arredondada devido ao encurtamento longitudinal e lateral, e o volume mínimo foi registado no início da diástole, mais especificamente na diastáse, no fim do relaxamento activo do ventrículo, em que este assume uma forma elíptica.

A técnica aplicada demonstrou ser sensível e permite obter dados volumétricos na ordem dos 10^{-3} ml, o que está perfeitamente adequado ao ventrículo desta espécie.

Dos quatro modelos utilizados, o algoritmo de Simpson foi o método que melhor estimou o volume ventricular a partir das imagens ecocardiográficas e deu resultados próximos do volume real, representado pelo volume derivado a partir do peso do ventrículo. Este resultado é similar ao obtido para o cálculo do volume do ventrículo em mamíferos. Aurigemma *et al.* (1995) referem que o algoritmo de Simpson apresenta vantagens teóricas na determinação do volume de ventrículo, por não depender da forma do objecto e poder ser utilizado quando a forma do ventrículo é distorcida. Este aspecto é muito importante relativamente ao cálculo dos volumes do ventrículo desta espécie, tendo em conta que a forma do ventrículo varia consideravelmente durante o ciclo cardíaco; em longo eixo o ventrículo varia de uma forma elipsóide até uma forma quase esférica. Por outro lado, este algoritmo parece ser o mais adequado para o cálculo de volumes noutras espécies de peixes, pois este grupo apresenta uma grande variabilidade interespecífica na forma do ventrículo.

Outro aspecto importante no que toca aos fundamentos do algoritmo de Simpson, é que os volumes são calculados com base em informação de dois eixos, o transversal e o longitudinal, enquanto os métodos Cúbico e de Teichholtz utilizam dados lineares obtidos apenas do curto eixo e sobre-estimam o volume real. Uma vez que a forma deste ventrículo não é esférica, entende-se que estes dois métodos não sejam apropriados para o cálculo do seu volume. O método de Área-comprimento também tem em conta dados obtidos nos dois eixos e também apresenta resultados satisfatórios no cálculo do volume do ventrículo, apesar de apresentar maior variabilidade entre medições. Por outro lado, o método de Área-comprimento apresenta uma grande vantagem relativamente ao método de Simpson, uma vez que o cálculo do volume é efectuado por um algoritmo muito mais simples, sendo por isso mais fácil e mais rápido a fornecer resultados.

O volume do miocárdio ventricular (VMV) obtido a partir dos vários algoritmos foi correlacionado com o VMV, calculado a partir do peso do ventrículo. Na diástole, verificou-se uma boa correlação entre as duas séries de dados volumétricos, enquanto na sístole apenas o método de Simpson apresentou uma correlação significativa com o VMV_{peso} . Este resultado indica que o VMV e a massa devem ser calculados em diástole. De facto, a mesma recomendação é sugerida para o cálculo da massa do coração humano (Aurigemma *et al.*, 1995).

O VMV obtido a partir das imagens ecocardiográficas 2D sobrestimou ligeiramente o VMV real. Tendo em conta que o VMV é obtido pela diferença entre os volumes externos e internos do ventrículo, esta sobre-estimação é provavelmente devida a uma sub-estimação do volume interno. Este facto poderá ser devido ao tipo de arranjo do miocárdio que, sendo trabeculado, faz com que o volume interno real seja superior ao volume do lúmen. De facto, este tipo de ventrículo funciona como uma esponja, que na diástole enche totalmente o lúmen e as trabéculas e na sístole expulsa quase todo o sangue do ventrículo (Tota *et al.*, 1983; Tota e Gattuso, 1996).

Na sístole, além da correlação entre o $VMV_{\text{algoritmos}}$ e o VMV_{pcso} ser significativa apenas para o método de Simpson, o valor absoluto dos volumes calculados é muito inferior aos calculados em diástole. Este resultado aponta para uma variação do volume da parede ventricular ao longo do ciclo cardíaco. De facto, as imagens em MM permitem observar uma diminuição da espessura da parede do ventrículo durante a sístole. Este facto está igualmente de acordo com as observações anteriores, relativamente ao tipo de miocárdio desta espécie e à forma como se contrai. Assim, durante a sístole, a parede do ventrículo encurta de modo a expulsar e a renovar o sangue das trabéculas.

Neste estudo foi ainda determinado o volume de ejeção (VE), calculado a partir da diferença entre os volumes em diástole e sístole, internos e externos. Os resultados obtidos indicam que o VE calculado a partir dos volumes internos é cerca de 5 vezes inferior ao VE calculado a partir dos volumes externos. Teoricamente, a massa ventricular é constante ao longo do ciclo cardíaco e, como tal, a diferença entre os volumes externos e internos deveria ser similar. Estes resultados poderão também ser explicados tendo em conta que este ventrículo é constituído exclusivamente por miocárdio esponjoso, havendo uma continuidade entre a cavidade e os espaços lacunares (Sanchez-Quintana *et al.*, 1996; Tota e Gattuso, 1996). Assim, a diferença entre os volumes externos em sístole e diástole reflectem variações volumétricas do lúmen e dos espaços lacunares da parede ventricular, enquanto os volumes internos calculados reflectem apenas variações do lúmen.

Estudos histológicos da parede deste ventrículo demonstraram que o colagénio do tipo I é mais abundante nas regiões endocárdica e epicárdica (Coucelo *et al.*, 1998, 2000). Este facto poderá explicar a grande ecodensidade destas regiões que permitem visualizar, de forma bem definida o contorno externo e interno do ventrículo nas imagens ecocardiográficas. A parede do miocárdio possui focos de colagénio tipo I e tipo III, distribuídos aleatoriamente, constituindo uma rede fina com baixa ecodensidade. Estas características do miocárdio fazem como que, na imagem ecocardiográfica, o lúmen

ventricular seja perfeitamente visível e quantificável, enquanto o volume das lacunas não o é. Desta forma é possível calcular, de forma rigorosa, o volume interno do ventrículo em telesístole mas não é possível fazê-lo em telediástole, uma vez que este volume é o somatório do volume do lúmen e das lacunas.

Tendo em conta os vários pontos mencionados, para este modelo experimental e utilizando a técnica referida, o VE é mais exacto quando calculado através dos volumes externos em vez dos internos, como acontece nos mamíferos.

A ecocardiografia tem sido largamente utilizada para determinar volumes ventriculares em mamíferos. No entanto, a sua aplicação em vertebrados não mamíferos, nomeadamente nos peixes, tem sido limitada pela incapacidade de obter imagens como boa definição de estruturas. Franklin e Davie (1992) aplicaram a ecocardiografia para descrever variações nas dimensões e nos volumes do lúmen do ventrículo da truta, utilizando uma preparação com o coração perfundido *in situ*. Contudo, estes autores calcularam os volumes do lúmen de forma indirecta a partir da massa e dos volumes externos, uma vez que as imagens não tinham uma boa definição do endocárdio. Por outro lado, Sande e Pope (1995) aplicaram a ecocardiografia em salmões mas a técnica aplicada não permitiu calcular a fracção de encurtamento devido a não ter sido possível obter um delineamento do endocárdio satisfatório nas imagens captadas. No presente estudo, a boa qualidade das imagens obtidas, e a aplicação metodológica descrita, permitiram calcular o volume do ventrículo da espécie *H. didactylus*, de forma directa.

5.4.4. Índices de função ventricular

O VE é um dos principais índices utilizados para avaliar a função sistólica ventricular. O VE apresenta normalmente uma relação inversa com a pressão ventricular sistólica e é modelado por vários factores, como a pressão de enchimento (*pré-carga*), a pressão arterial (*pós-carga*), o estado contráctil do miocárdio e a geometria ventricular (Aurigemma *et al.*, 1995).

Nos peixes, o VE é bastante variável e está relacionado com vários factores como a mioarquitectura ventricular, o peso corporal, a massa ventricular relativa e os requisitos de oxigénio (Farrell e Jones, 1992; Olson, 1998). O VE_c calculado para o *H. didactylus* (0,113-0,300 ml/kg) encontra-se dentro dos valores obtidos directamente noutras espécies de peixes (Farrell e Jones 1992), com 100 % miocárdio trabecular e baixa massa ventricular relativa (0,067 % para *H. didactylus*), o que significa que esta técnica não-invasiva é viável para a determinação do VE nesta espécie, de forma não-invasiva.

A fracção de encurtamento é provavelmente o índice de função sistólica mais fácil de derivar a partir de imagens em MM. Nos mamíferos, este índice é muito utilizado para avaliar a função sistólica, sendo particularmente útil porque o encurtamento circunferencial das fibras ventriculares é o principal responsável por gerar o volume de ejeção (Aurigemma *et al.*, 1995). O valor normal da FEn no Homem é de aproximadamente 30 % e aumenta com o aumento do pré-carga e diminui com o aumento do pós-carga. Neste modelo experimental a FEn apresenta valores superiores, variando entre 47 e 82 %. Sande e Pope (1995) obtiveram valores de FEn muito inferiores aos deste trabalho, provavelmente devido à incapacidade de definir com rigor o contorno interno do ventrículo.

A fracção de ejeção é também um dos índices mais utilizados e pode ser facilmente calculada, uma vez obtidos os volumes sistólicos e diastólicos. Os principais determinantes da FEj são as variações rápidas na carga ventricular, como o aumento da pré-carga ou a diminuição da pós-carga, que resultam numa maior FEj (Aurigemma *et al.*, 1995). Nos mamíferos, a FEj normal varia entre 60 to 70 %. Para a espécie *H. didactylus* registaram-se valores superiores, na ordem dos 90 a 100 %. Alguns autores referem valores semelhantes para este parâmetro, noutras espécies de peixes: 80 % para o tubarão leopardo (Lai *et al.*, 1990) e 95 % para a truta arco-íris (Franklin e Davie, 1992). Os resultados do presente estudo indicam uma forte correlação entre a FEj e a FEn ($r^2=0,76$). Tanto a FEn como a FEj apresentam valores superiores aos dos mamíferos. Estes resultados poderão estar relacionados com um VTS_i muito baixo verificado e que é comum aos peixes (Farrell e Jones, 1992).

O débito cardíaco é o índice de função cardíaca mais utilizado para avaliar e comparar a função ventricular entre espécies e em diferentes condições experimentais. Este parâmetro representa a taxa de volume de sangue bombeado pelo ventrículo, por unidade de tempo, e indica a eficiência de distribuição de oxigénio no organismo. Nos peixes, o débito cardíaco depende principalmente do estado contráctil do músculo cardíaco, ou seja, da capacidade de aumentar a taxa de sangue bombeado em cada ciclo cardíaco e não tanto da capacidade de aumentar o ritmo cardíaco.

Uma vez que a ecocardiografia permite determinar a variação do volume ventricular ao longo de um ciclo cardíaco e calcular o volume de ejeção, é igualmente possível deduzir o débito cardíaco. Este é um aspecto muito importante desta técnica, já que permite calcular o DC independentemente do princípio de Fick. Este princípio tem sido utilizado para calcular o débito cardíaco de forma indirecta, com base no consumo de oxigénio,

numa grande variedade de espécies de peixes (Farrell e Jones, 1992). Contudo, vários trabalhos sugerem que a aplicação deste princípio aos peixes não é adequado, porque os erros introduzidos pelo método podem alterar significativamente o cálculo do DC. De facto, o DC determinado pode ser excessivamente elevado devido às trocas gasosas cutâneas, ao consumo de oxigénio nas brânquias e a desvios de sangue nas brânquias (Randall, 1985; Farrell, 1991b; Farrell e Jones, 1992).

Tal como referido para o VE, também os valores obtidos para o DC_c, nesta espécie ($8,3 \pm 2,1$ ml/min/kg) e com esta técnica, estão dentro da gama de valores obtidos para outros peixes de baixa actividade e com miocárdio esponjoso, utilizando outras técnicas, como por exemplo, a lampreia atlântica, com 8,7 ml/min/kg (Axelsson *et al.*, 1990; Farrell e Jones, 1992; Olson, 1998).

Por fim, considera-se ainda que as variações na massa ventricular são de grande importância na avaliação da função cardíaca. Os valores obtidos para a massa apresentam uma forte correlação com os valores obtidos por pesagem directa do ventrículo, o que significa que este método permite calcular, com precisão, a massa ventricular de forma não-invasiva, apesar da massa real ter sido sobre-estimada em cerca de 15 %.

Algumas situações de adaptação fisiológica têm sido associadas a alterações da massa ventricular. Clark e Rodnick (1998) verificaram um aumento da massa ventricular com crescimento hipertrófico durante a maturação sexual em machos da espécie *Oncorhynchus Mykiss* (truta arco-íris). Rodnick e Sidell (1997) também verificaram um aumento da massa ventricular em indivíduos da espécie *Morone saxatilis* aclimatizados ao frio (5 °C). A determinação da massa por ecocardiografia poderá ser de grande utilidade para estudo das variações da massa ventricular induzidas por factores ambientais e endógenos.

5.5. CONCLUSÕES

Em conclusão, a técnica ecocardiográfica permite calcular com precisão os volumes externos em telesístole e telediástole a partir de dimensões lineares, utilizando algoritmos que modelam a forma ventricular. Para o ventrículo da espécie *H. didactylus* o algoritmo de Simpson foi o mais adequado para os cálculos volumétricos. Tendo em conta que este método não depende da forma do objecto, é provavelmente o melhor método para

o cálculo do volume do ventrículo noutros peixes e noutros vertebrados, como répteis e anfíbios.

A espécie *H. didactylus* apresenta um padrão de contracção característico, que está relacionado com o arranjo aleatório das fibras musculares. Este ventrículo encurta longitudinal e lateralmente para bombear o sangue para a circulação arterial.

Os resultados deste estudo mostram que, devido ao carácter trabecular do miocárdio, o método descrito não permite calcular o VTD_i com suficiente precisão e que, por outro lado, o VE deve ser calculado a partir dos volumes externos do ventrículo. A partir da informação volumétrica é possível calcular, com rigor e de forma totalmente não-invasiva, importantes parâmetros para a avaliação da função cardíaca em peixes – fracção de ejeção, fracção de encurtamento, débito cardíaco e massa ventricular.

Por último, é importante referir que estes resultados são obtidos utilizando animais não sujeitos a qualquer tipo de intervenção e é possível repetir os exames tantas vezes quanto necessário e em diferentes condições experimentais. Como tal, a ecocardiografia permite realizar diferentes tipos de estudos ao longo do tempo, analisando diferentes adaptações morfofuncionais a alterações ambientais, farmacológicas, patológicas e experimentais.

6. MELHORAMENTO DO CÁLCULO DE VOLUMES DO VENTRÍCULO – APLICAÇÃO DO TRANSDUTOR LINEAR DE 15 MHZ DE EMISSÃO

6.1. INTRODUÇÃO

O cálculo de volumes do ventrículo durante todo o ciclo cardíaco é de grande importância para o estudo de padrões hemodinâmicos e para a determinação de parâmetros de função ventricular, como o débito cardíaco e a fracção de ejeção. Anteriormente, desenvolveu-se a aplicação da ecocardiografia bidimensional (2D) para o cálculo de volumes e índices funcionais do ventrículo de *H. didactylus* e comparou-se quatro métodos lineares para a determinação de volumes a partir de dados lineares do ventrículo (Capítulo III.5). A técnica desenvolvida é exequível e fornece dados fiáveis, sendo o algoritmo de Simpson o método que melhor estima o volume ventricular a partir de imagens de ecocardiografia 2D. Dados morfológicos (volumes e massa ventriculares) e funcionais (fracção de encurtamento, fracção de ejeção, volume de ejeção e débito cardíaco) são obtidos a partir das medidas lineares. Apesar desta técnica fornecer imagens com uma boa definição das estruturas das câmaras cardíacas e permitir determinar com rigor medições lineares do ventrículo, as condições técnicas aplicadas (ecocardiografia 2D fundamental, com sonda de 8 MHz de emissão) não permitiram determinar o volume diastólico interno do ventrículo, devido ao arranjo estrutural do miocárdio desta espécie. Tratando-se de um miocárdio exclusivamente esponjoso, não foi possível determinar o volume de sangue lacunar e o volume de ejeção foi calculado a partir de volumes externos do ventrículo.

Os novos desenvolvimentos tecnológicos da ecocardiografia, especialmente de sondas de elevada frequência (15 MHz), com baixa penetração mas maior resolução, permitem obter imagens 2D com melhor definição do contorno interno do ventrículo e registar fluxos de baixa velocidade por Doppler-cor. Por outro lado, a ecocardiografia de contraste, através da injeção de agentes de contraste na circulação, tem sido aplicada para melhorar o sinal ultrasónico, melhorando a visualização da estrutura e dos fluxos (Schlief, 1994).

O objectivo deste estudo foi (1) melhorar o cálculo do volume de ejeção do ventrículo de *H. didactylus*, aplicando os avanços tecnológicos referidos - sonda de elevada

frequência (15 MHz) e de um agente de contraste - e (2) determinar o volume diastólico interno do ventrículo de forma directa e não-invasiva.

6.2. MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1. Grupo experimental

Foram realizados exames ecocardiográficos em 6 indivíduos machos da espécie *H. didactylus*, com pesos entre 655-698 g. A metodologia utilizada nos exames ecocardiográficos encontra-se descrita no Capítulo II e, para este estudo em particular, as imagens foram adquiridas com o ecógrafo *Acuson Sequoia*, com uma sonda de 15 MHz de frequência de emissão (15L8).

6.2.2. Metodologia ecocardiográfica

Neste estudo foram adquiridos vários tipos de imagens, posteriormente utilizadas para o cálculo do volume de ejeção do ventrículo. Cada registo foi efectuado em pelo menos três ciclos cardíacos consecutivos e em simultâneo com o ECG.

Eco 2D fundamental

Foram registadas imagens ecocardiográficas 2D em modo fundamental, em incidência longitudinal, ao nível do eixo médio do ventrículo, com 13 MHz de emissão. Estas imagens foram posteriormente utilizadas para o cálculo de volume telesistólico e telediastólico externos do ventrículo, conforme descrito no Capítulo III.5.

Doppler-cor

Sobre as imagens 2D obtidas foram adquiridas imagens de Doppler-cor a 7 MHz de emissão, em condições de máxima sensibilidade de varrimento, para visualizar fluxos de baixa velocidade nas lacunas do miocárdio ventricular. Estas imagens foram utilizadas para cálculo do volume telediastólico interno.

Doppler pulsado

O Doppler pulsado foi aplicado para registar o espectro Doppler de velocidade do fluxo sistólico de ejeção ventricular. Estes registos foram efectuados a 7 MHz de emissão,

com a amostra colocada sobre o orifício ventrículo-bulbar, a uma profundidade de 10 a 15 mm, com tamanho de 1,5 a 2,5 mm e ganho de 2 a 15 dB.

Ecocardiografia de contraste

Os registos referidos, efectuados por ecocardiografia fundamental, Doppler-cor e Doppler pulsado, foram realizados em condições basais e após injeção intravenosa (0,25 ml/kg, veia caudal) do agente de contraste Levovist®, Shering (200 mg/ml).

6.2.3. Cálculo do volume de ejeção

O **Volume de Ejeção (VE)**, refere-se ao volume bombeado pelo ventrículo em cada ciclo cardíaco e é um dos principais índices de função ventricular sistólica. Neste estudo, o VE foi calculado por três abordagens diferentes:

A - dados morfométricos:

- **VE_e** - o volume telediastólico externo (VTD_e) e o volume telesistólico externo (VTS_e) foram calculados a partir de imagens de ecocardiografia fundamental 2D, em incidência longitudinal aplicando o método de Simpson (Capítulo III.5); o VE foi calculado como a diferença entre VTD_e e VTS_e.
- **VE_i** - o volume telediastólico interno (VTD_i) foi calculado aplicando o método de Simpson ao contorno do registo de Doppler-cor dos fluxos intracardíacos; para esta determinação foi seleccionada a imagem com maior área de cor, no início da sístole; o volume telesistólico interno (VTS_i) foi calculado aplicando o algoritmo de Simpson a imagens do lúmen ventricular por ecocardiografia 2D (Fig. III.6.1); o VE foi calculado como a diferença entre VTD_i e VTS_i.

B - dados hemodinâmicos:

- **VE_{hemodinâmico}** - O VE foi calculado como o produto da área do orifício ventrículo-bulbar (AST_{v.b}) e o integral velocidade-tempo (IVT) do espectro Doppler do fluxo sistólico de ejeção ventricular (Capítulo III.3.2.4). A área do orifício é calculada a partir da medição do seu diâmetro, considerando que possui forma circular.

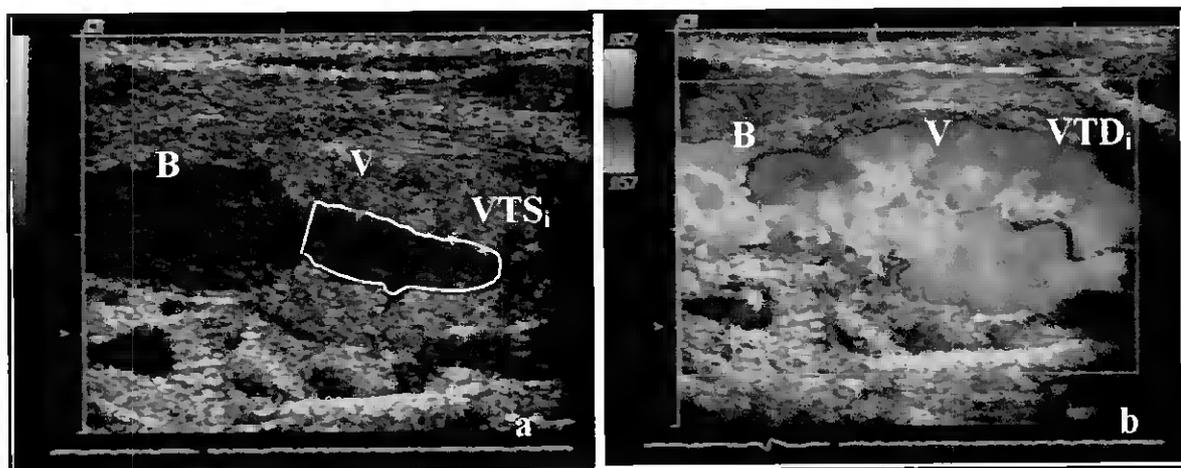


Figura III.6.1 - Imagens ecocardiográficas 2D em longo-eixo do coração de *H. didactylus*: (a) modo fundamental, o VTS_i foi calculado pelo contorno interno do ventrículo; (b) Doppler-cor dos fluxos intracardíacos de baixa velocidade, o VTD_i foi calculado a partir do contorno de cor do ventrículo no início da sístole ; B – bulbo, V – ventrículo.

6.2.4. Validação do cálculo do volume

O método de cálculo do volume de ejeção ventricular a partir dos volumes externos do ventrículo, obtidos de imagens de ecocardiografia fundamental, foi anteriormente validado por comparação com determinações volumétricas, efectuadas directamente a partir da peça (Capítulo III.5). Vários estudos comprovaram a validade do método não-invasivo hemodinâmico para a determinação do volume de ejeção a partir do registo de velocidade do fluxo de ejeção ventricular, sendo considerado o método mais sensível para a determinação deste parâmetro (Oh *et al.*, 1994). Neste estudo, para verificar a possibilidade de calcular o VTD_i do ventrículo e derivar o VE a partir dos volumes internos, foram correlacionados os resultados morfométricos e hemodinâmicos.

6.2.5. Análise estatística

Todos os dados apresentados representam as médias de medições efectuadas em pelo menos três ciclos cardíacos diferentes. O teste de Mann-Whitney foi aplicado para comparar os valores do volume de ejeção obtidos pelos três métodos no mesmo animal e para comparar determinações volumétricas com e sem agente de contraste. Foi efectuada uma análise de regressão linear simples para avaliar a significância deste modelo entre o volume de ejeção obtido a partir de dados morfométricos e hemodinâmicos. O nível de significância utilizado foi de 5% ($\alpha=0.05$).

6.3. RESULTADOS

6.3.1. Qualidade das imagens

Neste trabalho foi aplicada, pela primeira vez, uma sonda linear de 15 MHz ao estudo do coração de *H. didactylus*. Esta sonda de elevada frequência forneceu imagens 2D de excelente qualidade, apresentando uma óptima definição das estruturas cardíacas, nomeadamente do contorno, quer externo quer interno, do ventrículo. A aplicação do Doppler-cor a estas imagens 2D permitiu visualizar o fluxo sanguíneo nos espaços lacunares do miocárdio. De facto, nestas imagens verifica-se uma alternância dos padrões de cor entre a sístole e a diástole, indicando a entrada de sangue nas lacunas durante a diástole e a sua ejeção durante a sístole (Fig. III.6.2). Este novo padrão de imagem permitiu visualizar a totalidade da área ventricular interna ocupada por sangue, codificada a cor no início da ejeção ventricular. Este registo foi utilizado para calcular o volume telediastólico interno do ventrículo.

No sentido de aumentar a definição das imagens, quer das estruturas quer dos fluxos, foi injectado um agente de contraste na corrente sanguínea. Verificou-se que o VTD_c e o VTS_c obtidos após o contraste apresentam menor variação entre medições no mesmo exame, não havendo, no entanto, diferenças significativas entre o VE calculado a partir dos volumes externos, com e sem aplicação de contraste. O VTD_i calculado a partir do registo Doppler-cor dos fluxos de baixa velocidade no interior do ventrículo, após aplicação de contraste, foi sobre-estimado em 40%, em relação à mesma determinação efectuada antes da injeção. Relativamente ao registo do fluxo de ejeção, não houve diferenças significativas no IVT, antes e depois do da injeção de contraste. Tendo em conta estes resultados, o VE utilizado para as correlações entre os diferentes métodos foi calculado a partir de registos sem contraste.

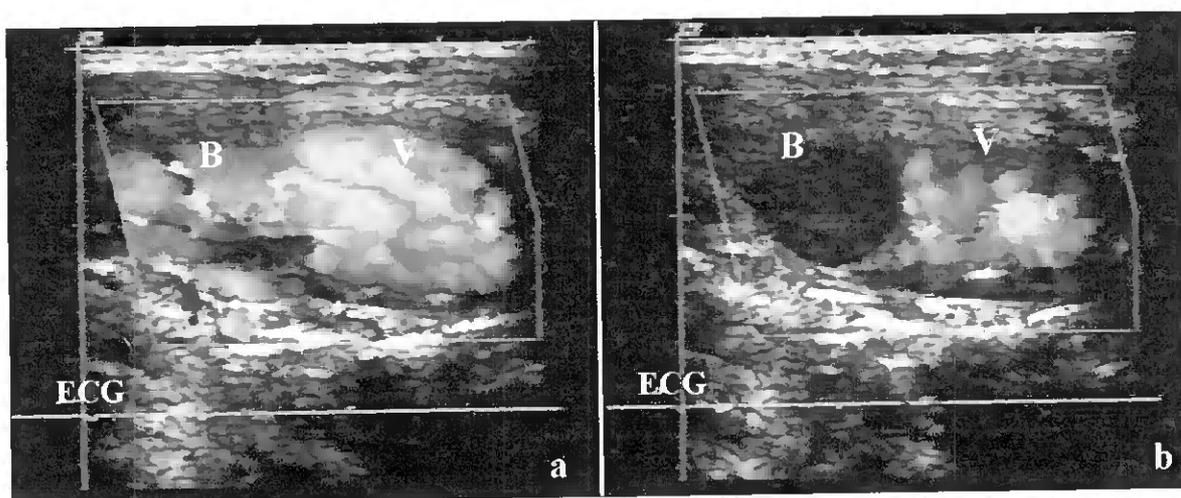


Figura III.6.2 – Imagens ecocardiográficas 2D com registo de Doppler-cor dos fluxos intracardíacos em sístole (a) e diástole (b) e registo electrocardiográfico simultâneo (ECG). Note-se a inversão do padrão de cor do fluxo em sístole e diástole, indicando a entrada e saída de sangue das lacunas (V - ventrículo; B - bulbo).

6.3.2. Cálculo do volume de ejeção

Neste estudo determinou-se o volume de ejeção ventricular com base em dados morfométricos obtidos de imagens ecocardiográficas 2D em modo fundamental, Doppler-cor e Doppler pulsado. Os resultados obtidos encontram-se resumidos na Tabela III.6.1, onde se verifica que os valores do volume de ejeção ventricular obtidos para a espécie *H. didactylus* são semelhantes para as três abordagens estudadas, com valores na ordem de $0,291 \pm 0,065$, $0,272 \pm 0,043$ e $0,286 \pm 0,073$ ml, para o VE_c , VE_i e $VE_{\text{hemodinâmico}}$, respectivamente.

Tabela III.6.1 – Registo do volume de ejeção ventricular de *H. didactylus* (n=6), obtido por três métodos diferentes.

Métodos	1. Eco 2D fundamental, volumes externos				2. Doppler-cor, volumes internos				3. Doppler pulsado, fluxo de ejeção ventricular			
	VTD _e ¹	VTS _e ²	VE _e ³	VE _e ¹⁰	VTD _i ⁴	VTS _i ⁵	VE _i ⁶	VE _c	IVT ⁷	AST _{v-b} ⁸	VE _h ⁹	VE _c
1	0,501	0,362	0,139	0,212	0,154	0,004	0,150	0,229	2,941	0,039	0,114	0,175
2	0,525	0,379	0,146	0,218	0,171	0,004	0,167	0,249	2,999	0,047	0,141	0,218
3	0,527	0,350	0,177	0,262	0,175	0,006	0,169	0,250	3,092	0,046	0,141	0,217
4	0,559	0,378	0,181	0,266	0,185	0,009	0,176	0,258	3,111	0,054	0,166	0,256
5	0,601	0,412	0,189	0,273	0,202	0,006	0,196	0,283	3,435	0,053	0,181	0,278
6	0,648	0,404	0,244	0,350	0,250	0,011	0,239	0,342	3,245	0,071	0,229	0,353
Média	0,560	0,381	0,179	0,263	0,190	0,007	0,183	0,269	3,137	0,051	0,162	0,250
Desv. p.	0,055	0,024	0,037	0,049	0,034	0,003	0,031	0,040	0,179	0,011	0,040	0,062

¹ volume telediastólico externo, ² volume telesistólico externo, ³ volume de ejeção externo, ⁴ volume telediastólico interno, ⁵ volume telesistólico interno, ⁶ volume de ejeção interno (expressos em ml),

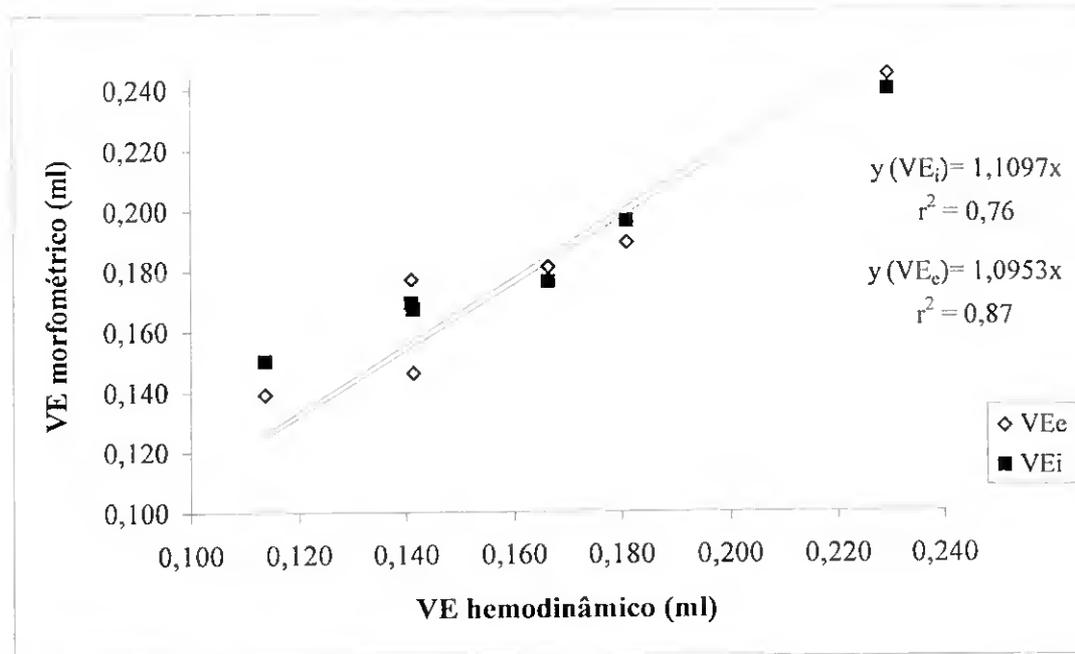


Figura III.6.3 – Correlação entre o volume de ejeção de *H. didactylus* (n=6) obtido de dados morfométricos e de dados hemodinâmicos.

Na Figura III.6.3 comparam-se os valores de VE obtidos através de dados morfométricos e de dados hemodinâmicos. Verificou-se que tanto o VE_e quanto o VE_i apresentam uma correlação significativa com o $VE_{\text{hemodinâmico}}$, apesar de o VE determinado a partir dos volumes externos apresentar uma melhor aproximação aos dados hemodinâmicos.

6.4. DISCUSSÃO

A determinação das variações volumétricas do ventrículo ao longo do ciclo cardíaco é de grande interesse para o estudo da fisiologia cardiovascular, uma vez que estas variações são um dos principais determinantes da eficiência cardíaca. Os estudos desenvolvidos até ao momento em peixes, na sua maioria de carácter invasivo, determinaram o volume telediastólico (VTD) do ventrículo de forma indirecta, a partir do volume de ejeção (VE), assumindo que o volume telesistólico (VTS) é nulo (Franklin e Davie, 1992). A correcta determinação do VTD nos peixes é de extrema importância tendo em conta que alterações deste volume são consideradas o principal factor que regula o VE,

ao contrário dos mamíferos, onde o VE é regulado principalmente por variações da frequência cardíaca (Farrell e Jones, 1992; Olson, 1998). Anteriormente, determinou-se o VE do ventrículo de *H. didactylus* de forma não-invasiva, a partir da variação dos volumes externos mas não foi possível determinar directamente o VTD (Capítulo III.5).

Neste trabalho pretendeu-se desenvolver uma nova abordagem para o cálculo do VE, com determinação do VTD interno do ventrículo e aplicou-se pela primeira vez uma sonda linear de 15 MHz ao estudo do coração de *H. didactylus*. Esta sonda de elevada frequência forneceu imagens 2D de excelente qualidade, com uma óptima definição das estruturas cardíacas, nomeadamente dos contornos, externo e interno, do ventrículo. A aplicação do Doppler-cor a estas imagens 2D permitiu visualizar o fluxo sanguíneo nos espaços lacunares do miocárdio e calcular o volume telediastólico interno do ventrículo. Estas observações vieram confirmar os resultados obtidos anteriormente, que indicavam que as variações volumétricas do lúmen ventricular eram bastante inferiores ao VE real, invalidando a sua utilização no cálculo do débito cardíaco (Capítulo III.5).

Este estudo realça a importância de se ter em conta o arranjo estrutural do miocárdio no cálculo dos volumes internos do ventrículo. No caso particular desta espécie, cujo miocárdio tem uma estrutura lacunar, o ventrículo funciona como uma esponja, que em diástole está repleto de sangue preenchendo os espaços lacunares e que em sístole contrai, esvaziando-se quase totalmente (Tota *et al.*, 1983; Tota, 1989). Como tal, o VTD_i representa o somatório do volume luminal e do volume lacunar do ventrículo. O presente estudo confirma estas observações, uma vez que a aplicação do Doppler-cor com a sonda de 15 MHz, permitiu obter registos coloridos de velocidade dos fluxos intramiocárdicos no início da ejeção ventricular, indicando que há fluxo sanguíneo em quase toda a parede ventricular. Estes registos de Doppler-cor foram utilizados para determinar o VTD_i , aplicando o método de Simpson à área colorida da imagem. Esta nova abordagem permite determinar, não só a variação do volume luminal do ventrículo, como também das lacunas. Como esta determinação está dependente do registo Doppler-cor de velocidade, não foi ainda possível determinar o volume das lacunas ao longo de todo o ciclo cardíaco, podendo no entanto, ser estimado o volume máximo de sangue alojado no tecido esponjoso no fim da diástole. A grande vantagem desta nova abordagem é que permite determinar directamente o volume telediastólico do ventrículo, que sempre foi deduzido a partir do volume de ejeção, considerando que o volume telesistólico é zero.

No sentido de aumentar a definição das imagens, quer das estruturas quer dos fluxos, foi injectado um agente de contraste na corrente sanguínea. A ecocardiografia de contraste

permite obter uma maior opacidade do miocárdio, melhorando a visualização da estruturas, aliado a uma melhor definição do contorno no lúmen ventricular e das lacunas menos profundas e ainda possibilita uma melhor definição do contorno externo do ventrículo, levando a uma menor variabilidade entre medições. Apesar desta vantagem, a comparação dos dados obtidos com e sem contraste revela que não existem diferenças significativas entre as duas abordagens. Estes resultados demonstram que, neste modelo experimental e para a determinação destes parâmetros, a injeção de contraste não apresenta vantagens evidentes.

Neste estudo foram comparadas três abordagens diferentes para o cálculo o volume de ejeção ventricular, a partir de imagens ecocardiográficas obtidas com uma sonda de 15 MHz: 1) VE_c , calculado a partir dos volumes externos do ventrículo, obtidos de imagens 2D de eco fundamental; 2) VE_i , calculado a partir dos volumes internos do ventrículo, sendo o VTD calculado a partir do registo Doppler-cor dos fluxos intracardíacos; 3) $VE_{hemodinâmico}$, calculado com base no espectro Doppler de velocidade do fluxo de ejeção ventricular. Os valores do volume de ejeção ventricular registados, foram semelhantes para as três abordagens estudadas. Os resultados obtidos para o VE da espécie *H. didactylus* encontram-se dentro dos valores referenciados para outros peixes, com os mesmos requisitos metabólicos, por outras técnicas (Farrell e Jones, 1992).

Verificou-se que tanto o VE_c quanto o VE_i apresentam uma correlação significativa com o $VE_{hemodinâmico}$, apesar do VE determinado a partir dos volumes externos apresentar uma melhor aproximação aos dados hemodinâmicos. Este facto significa que a aplicação do modo fundamental e o cálculo a partir dos volumes externos continua a ser a melhor forma de derivar o VE desta espécie, a partir de dados morfométricos. Apesar do Doppler-cor apresentar as vantagens já referidas, o registo colorido não é regular, o que pode introduzir alguns erros no cálculo do volume pelo método de Simpson. Por outro lado, alterações de velocidade do fluxo levam a alterações na construção do perfil do registo colorido, o que obviamente interfere com as determinações volumétricas.

6.5. CONCLUSÕES

Neste estudo foi efectuada uma nova abordagem para o cálculo do VE, com determinação do VTD interno do ventrículo, aplicando pela primeira vez uma sonda linear de 15 MHz ao estudo do coração de *H. didactylus*. Esta sonda de elevada frequência

forneceu imagens 2D de excelente qualidade, com uma óptima definição das estruturas cardíacas, nomeadamente do contorno, quer externo quer interno, do ventrículo.

Os resultados obtidos confirmam que a ecocardiografia é um método sensível e reproduzível para a obtenção de dados volumétricos do ventrículo deste modelo experimental e que diferentes abordagens podem ser utilizadas com sucesso para a determinação destes parâmetros. O aumento da frequência de emissão do transdutor de ultra-sons é muito eficiente no melhoramento da imagem e na quantificação de parâmetros funcionais a partir dessas imagens, dispensando a aplicação de agentes de contraste de administração intravenosa. A nova metodologia descrita, aplicação do Doppler-cor com sonda de elevada frequência (15 MHz), permitiu a visualização dos fluxos intramiocárdicos e possibilitou, pela primeira vez, determinar o volume telediastólico interno em peixes de forma directa e constitui uma forma viável de determinar este parâmetro em ventrículos trabeculados.

7. ESTUDO NÃO-INVASIVO DO FLUXO E DA RESERVA CORONÁRIA

7.1. INTRODUÇÃO

O estudo da fisiologia da circulação coronária no coração dos peixes é um assunto de elevado interesse, uma vez que existe uma grande diversidade no padrão de irrigação do miocárdio neste grupo de vertebrados e vários factores parecem contribuir para esta diversidade, tornando difícil estabelecer um padrão fisiológico geral.

Os principais factores que contribuem para o desenvolvimento dos vasos coronários nos peixes parecem ser a presença de tecido compacto e o padrão de actividade. Os Ciclostomos, e a maioria dos peixes de baixa actividade, apresentam um miocárdio esponjoso, sem irrigação coronária (corações tipo I, segundo Tota *et al.*, 1983) e, conseqüentemente, utilizam exclusivamente a circulação venosa para fornecer oxigénio ao miocárdio. Os Elasmobrânquios e os Teleósteos activos apresentam um miocárdio misto, composto de tecido esponjoso e compacto em proporção variável, em que tecido compacto é perfundido com sangue arterial através de circulação coronária (o fornecimento de oxigénio ao miocárdio é feito através da circulação venosa e coronária) (Cameron, 1975; Santer e Greer Walker, 1980; Santer *et al.*, 1983; Tota *et al.*, 1983; Emery *et al.*, 1985; Davie e Farrell, 1991; Harrison *et al.*, 1991).

No entanto, parece haver algumas excepções a esta regra: existem algumas espécies com miocárdio exclusivamente esponjoso que apresentam vasos coronários na região epicárdica do coração – coração tipo Ib (Tota *et al.*, 1983). Santer (1976) descreveu vasos coronários não penetrantes, situados na região epicárdica do coração de *Pleuronectes platessa*, que apresentam continuidade com o lúmen.

A espécie *H. didactylus* possui um coração do tipo Ib (Tota *et al.*, 1983), com irrigação coronária epicárdica. Nesta espécie, o miocárdio é irrigado suplementarmente com sangue arterial, proveniente do sistema hipobranquial anterior (Benitez *et al.*, 1994a). As artérias coronárias dos teleósteos, quando existentes, constituem-se a partir de ramos das artérias hipobranquiais, que derivam o sangue das artérias branquiais eferentes; algumas espécies possuem ainda um fornecimento coronário suplementar a partir de artérias coronárias caudais, com origem na aorta dorsal (Watson e Cobb, 1979; Franklin e Axelsson, 1994).

Diferentes técnicas tem sido aplicadas para estudar o fluxo coronário nos peixes. A maioria dos dados disponíveis sobre o controlo da circulação coronária neste grupo provém de estudos *in vitro*, utilizando preparações de anéis coronários (Small *et al.*, 1990; Farrell e Davie, 1991a e b) e *in situ*, preparações de corações isolados perfundidos (sistema coronário completo) (Farrell, 1987; Farrell e Graham, 1987; Davie *et al.*, 1992; Farrell *et al.*, 1992; Agnisola *et al.*, 1998). Até ao momento, os estudos *in vivo* são limitados à utilização de sondas Doppler de pressão, aplicadas directamente sobre os vasos e, conseqüentemente, dependentes de procedimentos cirúrgicos (Axelsson e Farrell, 1993; Davie e Franklin, 1992; Gamperl *et al.*, 1994).

Até ao presente, a ecocardiografia não podia ser aplicada ao estudo da circulação coronária nos peixes devido ao reduzido tamanho destes vasos, que é inferior ao limite de resolução das sondas disponíveis. Isto significa que, até à data, não existem dados disponíveis obtidos a partir de animais intactos. Os novos desenvolvimentos tecnológicos da ecocardiografia, nomeadamente a disponibilidade clínica de sondas de elevada frequência (15 MHz), permitiu a visualização e medição do fluxo de vasos de tamanho reduzido. Por outro lado, a aplicação intravenosa de agentes de contraste aumentam o sinal Doppler nos vasos, melhorando a visualização de estruturas (Schlief, 1994).

Recentemente, Caiati *et al.* (1999) aplicaram ecocardiografia Doppler transtorácica, melhorada com aplicação de contraste, para avaliar o fluxo e a reserva coronária em humanos, utilizando a adenosina para induzir máxima vasodilatação. Esta técnica provou ser um método rápido, seguro e efectivo para estudar a reserva coronária.

Foi objectivo deste estudo aplicar a tecnologia ecocardiográfica para aceder, de forma não-invasiva, ao fluxo coronário da espécie *Halobatrachus didactylus* e determinar a reserva coronária utilizando a metodologia descrita para o homem (Caiati *et al.*, 1999).

7.2. MATERIAL E MÉTODOS

7.2.1. Grupo experimental

Foram sujeitos 6 indivíduos machos da espécie *H. didactylus*, com pesos entre 655-698 g, a exames ecocardiográficos para registo do fluxo coronário. A metodologia utilizada nos exames ecocardiográficos encontra-se descrita no Capítulo II e, para este estudo em particular, as imagens foram adquiridas com o ecógrafo *Acuson Sequoia*, com uma sonda de 15 MHz de frequência de emissão (15L8). Os exames ecocardiográficos foram

repetidos três vezes nos mesmos animais, durante o período de um mês, para avaliar a reproductibilidade dos dados obtidos.

7.2.2. Metodologia ecocardiográfica

Doppler-cor

Foram registadas imagens bidimensionais (2D) longitudinais do plano médio do ventrículo. Sobre estes registos, foram adquiridas imagens de Doppler-cor a 13 MHz de emissão, em condições de máxima sensibilidade de varrimento, para visualizar fluxos de baixa velocidade. O fluxo coronário foi identificado por Doppler-cor junto ao bordo interior do ventrículo, próximo do orifício ventrículo-bulbar, tanto do lado dorsal como do lado ventral da parede.

Doppler espectral

Para obter o perfil Doppler de velocidade do fluxo coronário foi inicialmente efectuado o registo Doppler-cor do fluxo, utilizado como guia: a amostra de volume foi posicionada sobre a imagem 2D, tendo em conta a posição diastólica do registo Doppler-cor do fluxo coronário. O perfil de velocidade foi obtido por Doppler pulsado com 7 MHz de emissão, com a amostra com tamanho de 2 mm e ganho de 10 a 15 dB.

Ecocardiografia de contraste

O fluxo da artéria coronária foi identificado e melhorado após injeção do agente de contraste Levovist® (Shering); o contraste foi administrado por via intravenosa (0,25 ml/kg), na veia caudal, numa concentração de 200 mg/ml. Os registos Doppler-cor e espectral foram realizados após a administração do agente de contraste e o aumento do sinal foi obtido 5 a 10 segundos após a injeção.

7.2.3. Reserva coronária

Para o estudo da reserva coronária (RC) foi administrado um agente vasodilatador, a adenosina (1 ml/kg, 3 mg/ml). Foi registado o espectro Doppler de velocidade do fluxo coronário em condições basais e após injeção intraperitoneal de adenosina (1, 2, 3 e 5 minutos).

A RC (%) foi calculada como a razão entre o pico de velocidade do fluxo diastólico antes e depois da administração de adenosina:

$$RC = \frac{\textit{velocidade máxima do fluxo coronário, após adenosina}}{\textit{velocidade máxima do fluxo coronário, basal}} \times 100 \quad \text{[III.7.1]}$$

As medições de velocidade foram efectuadas *off-line*, utilizando o programa de cálculo do ecógrafo *Acuson Sequoia*.

7.2.4. Análise estatística

Todos os dados apresentados representam a média de medições efectuadas em pelo menos três ciclos cardíacos diferentes. O teste de Mann-Whitney foi aplicado para comparar medições efectuadas nos mesmos animais em exames diferentes e para verificar a significância do efeito da administração de adenosina. O nível de significância utilizado foi de 5% ($\alpha=0.05$).

7.3. RESULTADOS

7.3.1. Visualização do fluxo coronário

A aplicação da técnica descrita permitiu visualizar por Doppler-cor um fluxo diastólico localizado no bordo interno do ventrículo, junto ao orifício ventrículo-bulbar, tanto do lado ventral como do lado dorsal da parede e que foi identificado como sendo o fluxo de um vaso coronário (Fig. III.7.1). Nas condições descritas, o fluxo coronário foi identificado em 80 % dos casos estudados. A resolução espacial aplicada neste estudo não permitiu a visualização do vaso, apenas do fluxo por Doppler-cor.

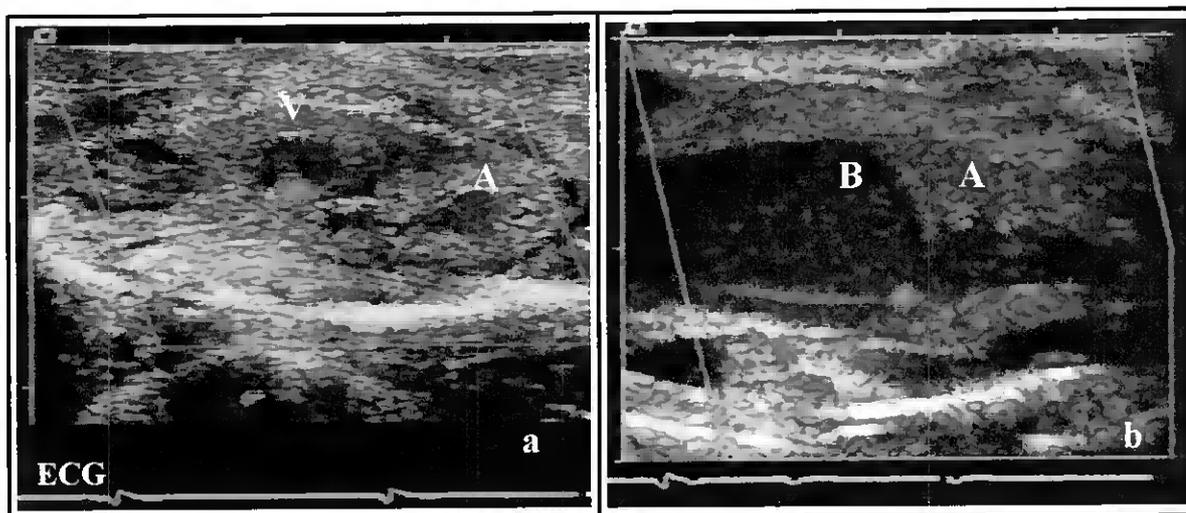


Figura III.7.1 – Imagens ecocardiográficas 2D, em incidência transversal (a) e longitudinal (b) do coração de *H. didactylus*, com registo Doppler-cor do fluxo coronário (laranja) e electrocardiograma simultâneo (ECG): V - ventrículo; A - aurícula; B - bulbo.

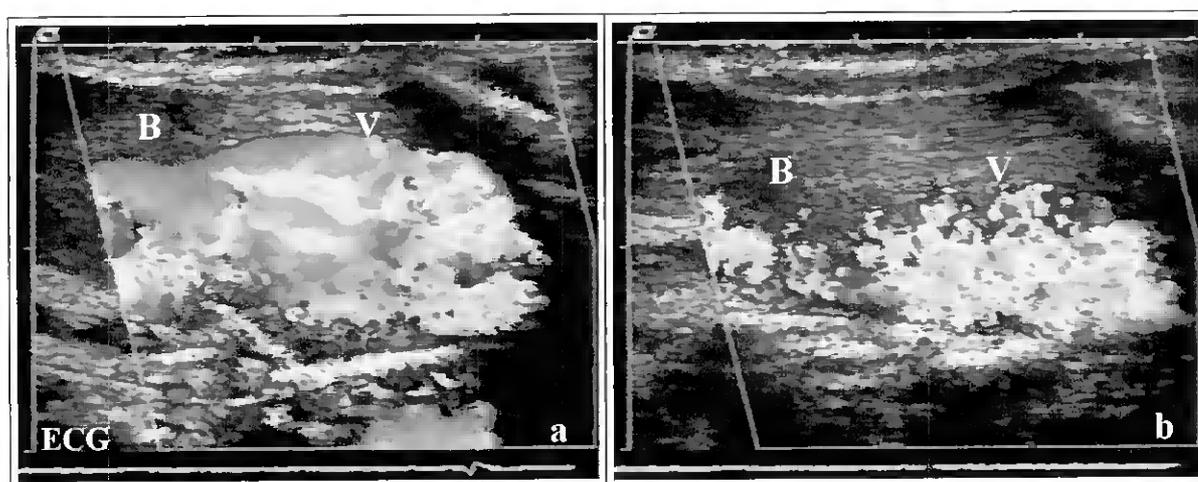


Figura III.7.2 – Imagens ecocardiográficas 2D longitudinais do coração de *H. didactylus*, com registo Doppler-cor dos fluxos cardíacos após injeção do agente de contraste Levovist, em sístole (a) e diástole (b): V - ventrículo; B - bulbo; electrocardiograma (ECG).

Nas imagens de Doppler-cor, após injeção do agente contraste, a presença das microbolhas na cavidade ventricular e nas lacunas produziu artefactos na imagem, tornando impossível a identificação do fluxo coronário (Fig. III.7.2).

7.3.2. Perfil de velocidade do fluxo coronário

O fluxo coronário identificado ocorre durante a diástole e apresenta um perfil espectral de velocidade em duas fases: aceleração rápida e desaceleração lenta

(Fig. III.7.3). Este fluxo ocupa aproximadamente 90 % da diástole e 60 % do ciclo cardíaco. Em condições basais, o pico de velocidade ocorre no início da diástole, com um valor $18,9 \pm 2,3$ cm/s.

Depois da injeção de adenosina, o perfil de velocidade do fluxo coronário não se altera, apresentando a mesma duração no ciclo cardíaco, mas verifica-se um aumento da velocidade máxima do fluxo.

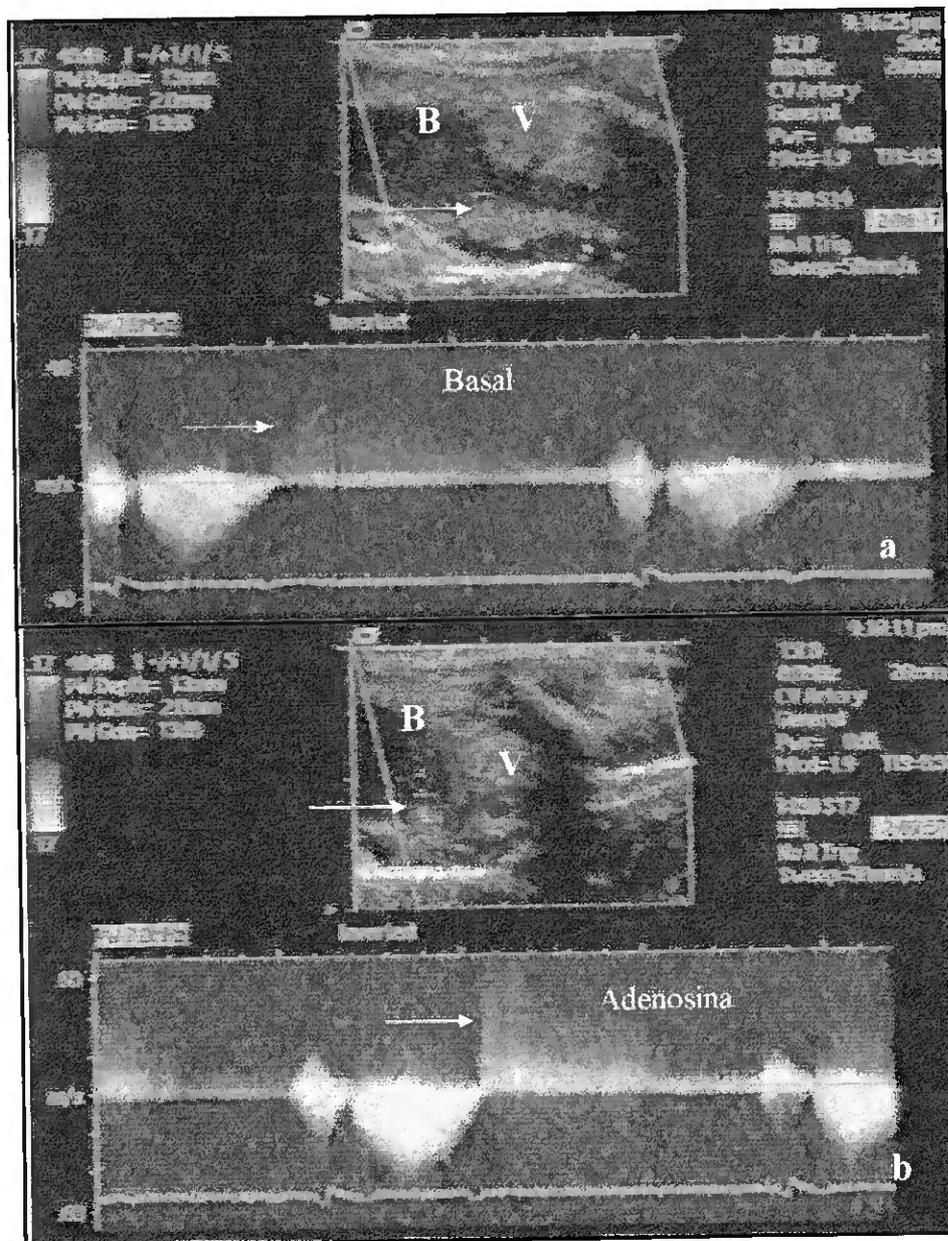


Figura III.7.3 - Imagens ecocardiográficas bidimensionais com registo Doppler de velocidade do fluxo coronário de *H. didactylus*, em condições basais (a) e após injeção de adenosina (b); imagens 2D em longo-eixo do ventrículo (V) e bulbo (B); as setas indicam o registo do fluxo coronário.

7.3.3. Reserva Coronária

A reserva coronária foi calculada após a injeção de adenosina, como agente vasodilatador. Verificou-se que a adenosina induziu um aumento da velocidade máxima do fluxo da coronária para 32,7 cm/s, observada 2 minutos após a injeção. Para esta espécie, e nas condições descritas, a reserva coronária máxima registada foi de 173 % (Tabela III.7.1). Por outro lado, a adenosina não induziu variações significativas na frequência cardíaca ($p>0,05$). A velocidade máxima do fluxo coronário retomou os valores basais 5 minutos após a administração de adenosina.

Tabela III.7.1- Registo da reserva coronária de *H. didactylus*.

<i>Tempo após administração</i> <i>Parâmetros estudados</i>	Basal	Adenosina			
	0 min	1 min	2 min	3 min	5 min
Velocidade máxima (cm/s)	18,9±2,3	23,0±1,2	32,7±4,6	23,4±0,9	19,2±3,0
Reserva Coronária (%)	-	122	173	123	102
Frequência Cardíaca (bpm)	35,3±5,1	37,9±4,3	33,4±4,1	39,2±5,1	35±5,0

7.4. DISCUSSÃO

O estudo da irrigação do miocárdio e do fluxo coronário nos peixes tem sido um assunto de difícil abordagem. Têm sido aplicados diferentes métodos mas a maioria dos dados disponíveis foi obtida a partir de metodologias que dependem do consumo de oxigénio do miocárdio. Até ao momento, os estudos *in vivo* são limitados à utilização de sondas Doppler de pressão, aplicadas directamente sobre os vasos e consequentemente dependentes de procedimentos cirúrgicos. Esta técnica foi aplicada para estudar o controlo do fluxo coronário por agentes vasoactivos e perturbações experimentais (exercício e hipoxia) (Axelsson e Farrell, 1993; Gamperl e Pinder, 1994; Gamperl *et al.*, 1994 e 1995). A escassez de dados *in vivo*, relativamente ao fluxo coronário nos peixes, deve-se à dificuldade em medir o fluxo em vasos de tamanho muito reduzido (Axelsson, 1995). Mustafa *et al.* (1997) referem que o comportamento de todo o sistema coronário, que inclui

a microcirculação (vasos de resistência), pode ser diferente do comportamento de uma porção isolada de vasos de capacitância (estudado através de preparações de anéis isolados), tornando importante o estudo do comportamento farmacológico de todo o sistema coronário, em contraste com preparações isoladas de artérias. Farrell (1984) também refere que os estudos em animais intactos têm a vantagem de lidar com corações com enervação intacta.

A ecocardiografia aplicada neste trabalho permitiu determinar o perfil de velocidade do fluxo coronário e estudar variações da sua velocidade de forma não-invasiva, em animais intactos. Este método apresenta, no entanto, algumas limitações, uma vez que, tratando-se de vasos de dimensões muito reduzidas, é bastante difícil posicionar a amostra de volume do Doppler no local exacto do fluxo para registar o seu perfil de velocidade. A experiência do operador é um factor fundamental para o sucesso da aplicação desta técnica.

A técnica aplicada permitiu visualizar por Doppler-cor um fluxo diastólico localizado no bordo interno do ventrículo, junto ao orifício ventrículo-bulbar, que foi identificado como sendo o fluxo de um vaso coronário. A espécie *H. didactylus* apresenta um vaso epicárdico, contínuo com o lúmen ventricular, tal como o descrito por Santer (1976) para a espécie *Pleuronectes platessa*. As características do fluxo referido, nomeadamente o local do ventrículo onde é visualizado, em conjunto com as características anatómicas do vaso, indicam que, nas condições descritas, é possível visualizar e medir o esvaziamento do vaso coronário no lúmen ventricular.

O fluxo coronário foi identificado em apenas 80 % dos casos estudados. Este resultado poderá estar relacionado com diferentes desenvolvimentos destes vasos arteriais em indivíduos diferentes. De facto, a observação histológica de preparações de vários indivíduos comprova esta hipótese, uma vez que alguns indivíduos apresentam um grande número de vasos na região epicárdica do ventrículo, enquanto em outros indivíduos a presença destes vasos é bastante escassa (dados não publicados). Não foi verificada qualquer relação entre estas variações e o sexo ou tamanho do indivíduo.

A resolução espacial aplicada não permitiu a visualização do vaso, devido às suas reduzidas dimensões, o que também impossibilitou o cálculo do débito absoluto deste vaso. Será necessária a aplicação de sondas de maior resolução (frequência de emissão mais elevada) para permitir obter detalhes da estrutura e efectuar outros estudos hemodinâmicos. A aplicação da ecocardiografia de contraste no modo fundamental não permite a medição do fluxo coronário neste modelo experimental. O Doppler harmónico, em conjunto com a

injecção de contraste, poderá trazer futuros desenvolvimentos na medição de fluxos de baixa velocidade.

Utilizando esta técnica, o espectro Doppler de velocidade do fluxo coronário tem um perfil monofásico, ocorrendo exclusivamente durante a diástole, semelhante ao perfil espectral de velocidade típico dos vasos coronários dos mamíferos. O mesmo tipo de perfil foi também observado para o salmão (Axelsson e Farrell, 1993). Não foram obtidos quaisquer registos sistólicos deste fluxo, o que poderá ser atribuído a factores fisiológicos (a) e/ou técnicos (b): a) nesta espécie, o fluxo coronário poderá ocorrer apenas durante a diástole se a pressão intraventricular durante a sístole exceder a pressão nos vasos coronários, tal como descrito por Axelsson (1995); b) o fluxo sistólico poderá não ter sido registado porque a amostra de volume foi posicionada tendo em conta o registo diastólico do fluxo por Doppler-cor e a contracção ventricular move o vaso para trás, para fora da amostra Doppler.

Neste trabalho foi ainda estudada a reserva coronária, ou seja, a percentagem de aumento do fluxo face a um agente vasodilatador e verificou-se que os vasos arteriais estudados respondem com vasodilatação à injecção de adenosina, tendo sido verificado um aumento do fluxo para 173 %. Este valor é mais baixo que a reserva coronária dos mamíferos (aproximadamente 400 %, Caiati *et al.*, 1999) mas bastante próximo dos valores obtidos para outros peixes: a reserva coronária em repouso para a truta arco-íris foi estimada em cerca de 200 % (Davie e Farrell, 1991).

A reserva coronária é um dos parâmetros mais importantes para caracterizar a fisiologia coronária, uma vez que quantifica a capacidade máxima de aumento de fluxo do vaso coronário e fornece indicações acerca da importância do sistema coronário para fazer face a situações de hipóxia tecidual. Os resultados obtidos demonstram que esta espécie possui vasos arteriais cujo fluxo pode aumentar para aproximadamente o dobro, quando devidamente estimulados. A adenosina foi utilizada para induzir vasodilatação máxima, mas é importante ter em consideração que, *in vivo*, outros factores contribuem para o controlo da resistência vascular coronária, nomeadamente neuronais e hormonais (Axelsson, 1995). Tal como nos mamíferos, foram identificados α e β - adrenoreceptores na circulação coronária de peixes e ainda vasodilatação mediada colinergicamente (Farrell e Graham, 1987; Farrell e Davie, 1991a e b; Axelsson e Farrell, 1993; Gamperl *et al.*, 1994). Além disso, outros trabalhos demonstraram o envolvimento de metabólitos locais, como a adenosina, e autocoides no controlo do fluxo através do sistema coronário (Farrell

e Davie, 1991; Agnisola *et al.*, 1996 e 1998). Os factores ambientais que parecem influenciar o fluxo coronário incluem a hipóxia e a temperatura.

A diferente distribuição dos vasos coronários nos peixes reflecte soluções para o problema da distribuição de oxigénio a todas as células do miocárdio (Davie e Farrell, 1991). Tradicionalmente, assumia-se a existência de uma correlação entre o padrão de actividade do animal e a sua dependência do sistema coronário. A presença de circulação arterial no ventrículo de espécies sem miocárdio compacto e com hábitos sedentários, como é o caso da espécie *H. didactylus*, sugere que outros factores sejam igualmente determinantes para o desenvolvimento da circulação coronária. No caso particular da espécie *H. didactylus*, e tendo em conta o seu habitat, sugere-se que a limitação ambiental da disponibilidade de oxigénio seja um dos factores determinantes para o desenvolvimento destes vasos coronários. Encontram-se indivíduos desta espécie em alguns locais pobres em oxigénio, sendo possível encontrá-los fora de água, em abrigos que ficam emersos durante a baixa-mar. Observações não publicadas de exames ecocardiográficos efectuados nesta espécie, em que foi suprimida a recirculação de água durante o exame, simulando situações de hipóxia, indicam que o fluxo coronário parece aumentar nestas condições, o que reforça a hipótese apresentada.

Estes resultados preliminares indicam que, apesar da aplicação desta técnica ser muito dependente da experiência do operador, esta nova abordagem é exequível, sensível e reprodutível e abre uma nova perspectiva na investigação da fisiologia do sistema coronário nos peixes. Estudos futuros incidirão no estudo do fluxo coronário através desta técnica, noutras espécies de peixes, com diferentes tipos de miocárdio, de forma a dar um contributo para o estudo do controlo do fluxo coronário em peixes.

7.5. CONCLUSÕES

Neste estudo concluiu-se que a ecocardiografia é uma técnica sensível e reprodutível para determinar a velocidade do fluxo coronário e estudar variações da sua velocidade de forma não-invasiva, em animais intactos, apesar da experiência do operador ser um factor fundamental para o sucesso da aplicação desta técnica. O espectro Doppler de velocidade do fluxo coronário nesta espécie tem um perfil monofásico, ocorrendo exclusivamente durante a diástole. O estudo da reserva coronária, demonstrou que os vasos arteriais

estudados respondem com vasodilatação à injeção de adenosina, com um aumento do fluxo de 173 %.

A presença de irrigação arterial no ventrículo desta espécie, demonstra que outros factores, além da presença de miocárdio compacto e o padrão de actividade, determinam a necessidade de uma fonte suplementar de oxigénio para este tecido. Sugere-se que a limitação ambiental da disponibilidade de oxigénio seja um dos factores determinantes para o desenvolvimento destes vasos coronários.

CAPÍTULO IV

CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. ECOCARDIOGRAFIA APLICADA AO ESTUDO DO CORAÇÃO DE *Halobatrachus didactylus*

Continua a ser uma área de muitas interrogações a forma como se faz a adaptação do sistema cardiovascular (desde o nível molecular até ao nível do tecido e órgão) a diferentes situações relacionadas, quer com o meio interno, quer com o meio externo. Nos vertebrados a adaptação do ventrículo a variações de pressão e/ou de volume é diferente, e põe em jogo mecanismos complexos de inter-relação genéticos, físicos e bioquímicos. No homem existem vários modelos de geometria ventricular que estão relacionados com situações de adaptação fisiopatológica, e que vão desde a remodelagem até à hipertrofia e dilatação. São exemplos os ventrículos de idosos, atletas e ventrículos com patologias como a hipertensão arterial, doenças valvulares e cardiomiopatias. Entre os vertebrados, os peixes revelam uma grande variação intraclasse da mioarquitectura do ventrículo cardíaco relacionada com diferentes situações adaptativas ao habitat, modo de vida e metabolismo.

Neste trabalho investigou-se a aplicabilidade da ecocardiografia para o estudo não-invasivo da morfologia e fisiologia cardíacas de um teleosteo marinho, a espécie *Halobatrachus didactylus*, tendo como objectivo a sua utilização, como um modelo experimental fiável, para o estudo dos mecanismos que regulam a contracção cardíaca, nomeadamente mecanismos de adaptação a alterações ambientais, farmacológicas e fisiopatológicas.

A espécie *H. didactylus* apresenta um ventrículo sacular com miocárdio exclusivamente trabeculado, correspondendo ao tipo de ventrículo mais simples dentro dos vertebrados. A relação topográfica e a geometria das estruturas cardíacas desta espécie, em que os grandes eixos do ventrículo e do bulbo estão alinhados com o eixo cranio-caudal do animal, permitem obter imagens sagitais e transversais, com aparelhos ultrasónicos de alta definição, fornecendo imagens topográficas de elevada qualidade, adequadas para a determinação de parâmetros lineares, volumétricos e hemodinâmicos do seu coração. A conjugação destes factos proporciona a utilização desta espécie como um modelo experimental adequado para o estudo ecocardiográfico não-invasivo da morfologia e fisiologia cardíaca em vertebrados não mamíferos.

Este trabalho demonstrou claramente que a grande vantagem da ecocardiografia é a sua natureza não-invasiva, que permite obter imagens das estruturas cardíacas com elevado detalhe morfológico e funcional, em animais intactos. É de extrema importância

determinar parâmetros de eficiência cardíaca nos peixes *in vivo*. Até ao momento os estudos efectuados *in vivo* nestes animais foram limitados a técnicas interventivas, que alteram a fisiologia normal. A ecocardiografia forneceu estes parâmetros funcionais do coração de teleósteos marinhos, de forma não-invasiva, com garantia da integridade do sistema cardiovascular e do indivíduo como um todo. Esta técnica permitiu também repetir os exames no mesmo animal ao longo do tempo, seguindo a evolução de várias situações experimentais.

2. CARACTERIZAÇÃO TECIDULAR DO MIOCÁRDIO

A ecocardiografia bidimensional (2D) aplicada neste estudo permitiu obter imagens do tecido cardíaco de *H. didactylus* com diferentes graus de valor da escala de cinzentos, que reflectem as características estruturais dos tecidos. A densitometria ecocardiográfica 2D revelou-se uma técnica aplicável, sensível e reprodutível para o estudo da caracterização tecidular do miocárdio da espécie *H. didactylus*. Definido o padrão densitométrico destas imagens ao longo do ciclo cardíaco, esta técnica permitirá avaliar alterações tecidulares fisiopatológicas. Portanto, esta técnica revelou um enorme potencial na avaliação da estrutura global e regional do ventrículo. Uma vez implementada, a técnica densitométrica aplicada a imagens ecocardiográficas do tecido cardíaco, permite avaliar alterações fisiopatológicas deste tecido induzidas por alterações ambientais, como a exposição a metais tóxicos.

Este estudo demonstrou diferenças nas características densitométricas do ventrículo de *H. didactylus*, em diferentes regiões da parede e em diferentes momentos do ciclo cardíaco. A variação física da distribuição espectral de cinzentos das imagens da parede do ventrículo, ao longo do ciclo cardíaco, traduz as modificações introduzidas pelo processo contráctil do miocárdio ventricular e documentam a sensibilidade desta técnica.

3. DETERMINAÇÃO DE ÍNDICES DE FUNÇÃO VENTRICULAR

A partir das imagens das estruturas cardíacas, obtidas por ecocardiografia 2D e em modo-M, e ainda do registo de velocidade dos vários fluxos cardíacos, por ecocardiografia

Doppler e Doppler-cor, foram determinados vários índices para avaliar a eficiência cardíaca.

Os índices de eficiência ventricular baseiam-se na capacidade do ventrículo para bombear sangue (volume de ejeção e débito cardíaco), na sua habilidade para gerar força (gradientes de pressão), na sua habilidade de encurtar a cada contração (fracção de ejeção e fracção de encurtamento) e nas relações temporais da contração e relaxamento (intervalos sistólicos e diastólicos) (Boudoulas, 1990). Este trabalho provou que todos estes parâmetros podem ser obtidos de forma não-invasiva em vertebrados não mamíferos e podem ser utilizados para estudar os factores que regulam a função cardíaca nestas espécies.

O volume de ejeção e débito cardíaco foram determinados a partir de imagens obtidas por ecocardiografia 2D, ecocardiografia Doppler e Doppler-cor. Estas técnicas permitiram determinar as variações volumétricas do ventrículo de *H. didactylus* de forma rigorosa, com valores similares aos obtidos para outras espécies de baixa actividade, por outras técnicas.

A ecocardiografia 2D forneceu imagens de excelente qualidade, com elevada definição do contorno externo e interno do ventrículo, o que permitiu calcular com precisão os volumes externos em telesístole e telediástole a partir de dimensões lineares, utilizando algoritmos que modelam a forma ventricular. No entanto, a ecocardiografia 2D fundamental não permitiu calcular com rigor o volume telediástolico interno, devido ao carácter trabecular do miocárdio. O registo Doppler-cor dos fluxos intraventriculares, obtido com a sonda de 15 MHz, permitiu determinar com precisão o volume telediástolico interno e o volume de ejeção ventricular.

O registo de velocidade do fluxo de ejeção também permitiu determinar o volume de ejeção ventricular, a partir do integral velocidade-tempo do fluxo multiplicado pela área do orifício atravessado pelo fluxo. A técnica descrita permitiu determinar o volume de ejeção e o débito cardíaco independentemente da forma do ventrículo.

As variações volumétricas do ventrículo durante o ciclo cardíaco permitem ainda determinar parâmetros funcionais relacionados com a habilidade de encurtar a cada contração. A fracção de ejeção reflecte a eficiência global e foi determinada pela razão entre os volumes telesistólico e telediastólico, verificando-se valores bastante elevados, próximos de 100 %. A fracção de encurtamento avalia a eficiência regional e foi calculada a partir do registo da cinética da parede ventricular em modo-M, apresentando valores concordantes com a fracção de ejeção.

Os índices de eficiência ventricular, relacionados com a sua habilidade para gerar força e com as relações temporais da contracção e relaxamento, foram determinados a partir do registo Doppler do fluxo de enchimento e do fluxo de ejeção do ventrículo. Estes registos de velocidade/tempo permitiram estudar a função sistólica e diastólica deste coração, através da determinação das velocidades máximas, gradientes de pressão entre as câmaras e os intervalos sistólicos e diastólicos.

O fluxo de ejeção ventricular desta espécie apresenta um perfil de velocidade com um espectro típico, caracterizado por duas fases: aceleração rápida e desaceleração lenta. A velocidade máxima deste fluxo e o gradiente de pressão são bastante baixos, reflectindo as propriedades elásticas do bulbo, que mantém a pressão elevada durante todo o ciclo cardíaco. Por outro lado, o presente estudo demonstrou que o enchimento ventricular na espécie *H. didactylus* apresenta um perfil bifásico, com um enchimento precoce, devido ao relaxamento ventricular, e um enchimento tardio, devido à contracção auricular, tal como ocorre nos mamíferos. Demonstrou-se igualmente que, para esta espécie, a razão E/A não é constante e varia inversamente com frequência cardíaca, apresentando valores inferiores a 1 para FCs elevadas e superiores a 1 para FCs baixas. A maior contribuição da onda E para o volume diastólico do ventrículo, verificada a frequências cardíacas mais baixas, poderá constituir um mecanismo de compensação para aumentar o débito cardíaco para a fazer face às necessidades do organismo. Este estudo demonstra que o relaxamento ventricular é um dos determinantes do enchimento do ventrículo da espécie *H. didactylus*, estando a sua contribuição dependente da frequência cardíaca, nomeadamente do tempo de relaxamento isovolumétrico e do tempo de enchimento precoce. Por outro lado, não é ainda possível estabelecer um valor E/A geral para os peixes e estudos futuros devem ter em conta que o tipo de perfil de enchimento está dependente de factores intrínsecos, como a FC.

O estudo dos intervalos sistólicos demonstrou que o encurtamento da sístole face ao aumento da frequência cardíaca é realizado à custa da diminuição do tempo de desaceleração, sugerindo que o aumento da FC é feito à custa do aumento da velocidade do enchimento ventricular. O estudo dos intervalos diastólicos nesta espécie permitiu concluir que a diástole ocupa a maior parte do ciclo cardíaco, apresentando uma relação inversa com a FC. O aumento da FC é feito também à custa do encurtamento da diastase e do relaxamento activo do ventrículo (tempo de relaxamento isovolumétrico e tempo de enchimento precoce), enquanto o enchimento tardio apresenta uma duração praticamente constante, independente das variações da FC.

Outro aspecto fundamental para caracterizar a fisiologia cardíaca é a forma como se faz o fornecimento de oxigénio ao tecido cardíaco. Neste trabalho verificou-se que esta espécie apresenta vasos periféricos que irrigam o miocárdio e que respondem com um aumento do seu fluxo na presença de adenosina (reserva coronária de aproximadamente 170 %). A presença de irrigação arterial no ventrículo desta espécie, demonstra que outros factores além da presença de miocárdio compacto e o padrão de actividade, determinam a necessidade de uma fonte suplementar de oxigénio para este tecido. Sugere-se que a limitação ambiental da disponibilidade de oxigénio seja um dos factores determinantes para o desenvolvimento destes vasos coronários.

Neste trabalho aplicou-se a ecocardiografia ao estudo da morfologia e fisiologia cardíaca da espécie *H. didactylus*. Este estudo prova a utilidade desta técnica para estudar índices de função ventricular nesta espécie e abre caminho para a sua aplicação a outras espécies de peixes e outros grupos de vertebrados não mamíferos, onde esta técnica tem sido pouco explorada.

De futuro, a ecocardiografia poderá ser aplicada para estudar alterações morfológicas e funcionais do ventrículo induzidas por alterações ambientais, nomeadamente a exposição a metais tóxicos.



CAPÍTULO V
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agnisola, C., Jensen, F.B., Tota, B., Mustafa, T. (1998) Performance of the isolated rainbow trout heart perfused under self-controlled coronary pressure conditions: effects of high and low oxygen tension, arachidonic acid and indomethacin. *J. Comp. Physiol. B*, **168**: 96-104.
- Agnisola, C., McKenzic, D.J., Taylor, E.W., Bolis, C.L., Tota, B. (1996) Cardiac performance in relation to oxygen supply varies with dietary lipid composition in sturgeon. *Am. J. Physiol.*, **271(40)**: R417-R425.
- Appleton, C.P. (1991) Influence of incremental changes in heart rate on mitral flow velocity: assessment in lightly sedated, conscious dogs. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **17(1)**: 227-36.
- Appleton, C.P., Hatle, L.K., Popp, R.L. (1988) Demonstration of restrictive ventricular physiology by Doppler echocardiography. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **11(4)**: 757-68.
- Arrighi, J.A., Soufer, R. (1995) Left ventricular diastolic function : physiology, methods of assessment, and clinic significance. *J. Nucl. Cardiol.*, **2**: 525-43.
- Atkins, C.E., Snyder, P.S. (1992) Systolic time intervals and their derivatives for evaluation of cardiac function. *J. Vet. Inter. Med.*, **6**: 55-63.
- Aurigemma, G.P., Gaasch, W.H., Villegas, B., Meyer, T.E. (1995) Noninvasive assessment of left ventricular mass, chamber volume, and contractile function. *Curr. Probl. Cardiol.*, **XX (6)**: 363-440.
- Axelsson, M. (1995) The coronary circulation: a fish perspective. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **28**: 1167-1177.
- Axelsson, M., Davison, B., Forster, M.E., Nilsson, S. (1994) Blood pressure control in the antarctic fish *Pagothenia borchgrevinki*. *J. Exp. Biol.*, **190**: 265-279.
- Axelsson, M., Davison, W., Forster, M.E., Farrell, A.P. (1992) Cardiovascular responses of the red-blooded antarctic fishes *Pagotenia bernacchii* and *P. borchgrevinki*. *J. Exp. Biol.*, **167**: 179-201.
- Axelsson, M., Farrell, A.P. (1993) Coronary blood flow *in vivo* in the coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Am. J. Physiol.*, **264 (33)**: R963-R971.
- Axelsson, M., Farrell, A.P., Nilsson, S. (1990) Effects of hypoxia and drugs on the cardiovascular dynamics of the atlantic hagfish *Myxine glutinosa*. *J. Exp. Biol.*, **151**: 297-316.
- Azevedo, J., Arroja, I., Jacques, A., Fradeano, A., Santos, I., Costa, T., Araújo, V. (1995) Análise da variabilidade espectral da escala de cinzentos por densitometria miocárdica ecocardiográfica bidimensional em função do tipo e grau de hipertrofia ventricular esquerda. *Rev. Port. Cardiol.*, **14 (11)**: 953-957.
- Azpilicueta, J., Garcia-Fernandez, M.A. (1995) Doppler cardiaco: principios e instrumentacion. In: "Principio y pratica del doppler cardiaco" (Garcia-Fernandez, M.A., ed.), Mcgraw-Hill, Interamericana de España, Madrid, Espanha, 465pp.

- Baker, D. W. (1970) Pulsed ultrasonic Doppler blood-flow. *IEEE Trans. Sonic. Ultrasonic.*, Su-17, **3**: 75-79.
- Benitez, A., Gutiérrez-Rodríguez, M., Sarasquete, M. C., Canales, M. (1994a). El corazón y la estimulación medular espinal. Parte I. Nuevo modelo experimental. *Rev. Soc. Esp. Dolor*, **3**: 172-177.
- Benitez, A., Gutiérrez-Rodríguez, M., Sarasquete, M.C., Canales, M.L. (1994b) Estimulación medular en hipoxia y necrosis miocárdica. Parte II. Estudio experimental con un nuevo modelo animal. *Rev. Soc. Esp. Dolor*, **3**: 178-187.
- Bessen, M., Gardin, J. (1990) Evaluation of left ventricular function. *Cardiol. Clin.*, **8**: 315-32.
- Boudoulas, H. (1990) Systolic time intervals. *Eur. Heart J.*, **11** (suppl. I): 93-104.
- Bushnell, P.G., Jones, D.R. (1994) Cardiovascular and respiratory physiology of tuna and billfishes; adaptations for support of exceptionally high metabolic rates. *Environ. Biol. Fishes.*, **40**: 303-318
- Caiati, C., Zedda, N., Montaldo, C., Montisci, R., Iliceto, S. (1999) Contrast-enhanced transthoracic second harmonic echo Doppler with adenosine: A non-invasive, rapid and effective method for coronary flow reserve assessment. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **34**(1): 122-130.
- Cameron, J. (1975) Morphometric and flow indicator studies of teleost heart. *Can. J. Zool.*, **53**: 691-698.
- Chandrasekaran, K., Aylward, P., Fleagle, S., Burns, T., Seward, J., Tajik A., Collins, S., Skorton, D. (1989) Feasibility of identifying amyloid and hypertrophic cardiomyopathy with the use of computerized quantitative texture analysis of clinical echocardiographic data. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **13**(4): 832-40.
- Chápuli, R.M., Hamlett, W.C. (1996) Comparative cardiovascular biology in lower vertebrates. *J. Exp. Zool.*, **275**: 249-251.
- Claireaux, G., Webber, D.M., Kerr, S.R., Boutilier, R.G. (1995) Physiology and behaviour of free-swimming Atlantic cod (*Gadus morhua*) facing fluctuating salinity and oxygenation conditions. *J. Exp. Biol.*, **198**: 61-69.
- Clark, R.J., Rodnick, K. (1998) Morphometric and biochemical characteristics of ventricular hypertrophy in male rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*). *J. Exp. Biol.*, **201**: 1541-1552.
- Conklin, D.J., Olson, K.R. (1994) Compliance and smooth muscle reactivity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) vessels in vitro. *J. Comp. Physiol.*, **163**: 657-663.
- Coucelo, J.A., Lamy, I., Valle, J., Santos, O., Coucelo, J.M., Faria, D., Vale, A.P., Morgado, P., Santos, N. (1995) Distribuição do valor E/A numa população com hipertensão arterial essencial. *Rev. Port. Cardiol.*, **14**(10): 763-765.

- Coucelo, J.A., Coucelo, J.M., Valle, J.** (1995) Doença cardíaca hipertensiva: definição de subgrupos utilizando como parâmetros a massa ventricular esquerda, fração de encurtamento e valor E/A. *Rev. Port. Cardiol.*, **14(10)**: 761-762.
- Coucelo, J.M., Joaquim, N., Correia, V., Bebianno, M.J., Coucelo, J.A.** (2000) Cellular responses to cadmium toxicity in the heart, kidney and liver of *Halobatrachus didactylus*. *Ecotoxicol. Environ. Res.*, **3(1)**: 29-35.
- Coucelo, J.M., Coucelo, J.A., Azevedo, J., Pina, P., Soares, A.** (1994) Heart ultrasonography of lower vertebrates. *XIVth Federative International Congress of Anatomy – Comparative Cardiovascular Biology of Lower Vertebrates*, Lisboa, Abstract.
- Coucelo, J.M., Coucelo, J.A., Azevedo, J.** (1996) Ultrasonography characterization of heart morphology and blood flow of lower vertebrates. *J. Exp. Zool.*, **275**: 73-82.
- Coucelo, J.M., Joaquim, N., Aníbal, J., Coucelo, J.A.** (1993) Fish ultrasonography characterization of cardiac morphology and blood flow. *6th Symposium on Fish Physiology – Biochemistry and Physiology of Environmental Adaptations*, Helsinki Abstract.
- Coucelo, J.M., Joaquim, N., Carreira, G., Coucelo, J.A., Azevedo, J., Jacques, A., Alves, J., Arroja, I., Araujo, V.** (1997) Variação cíclica do espectro de densitometria ecocardiográfica bidimensional em função da fase do ciclo cardíaco. Trabalho experimental e sua aplicação clínica na hipertensão arterial. *Rev. Port. Cardiol.*, **16 (1)**: 63-67.
- Coucelo, J.M., Joaquim, N., Correia, V., Azevedo, J., Coucelo, J.A.** (1998) Histologic study in cardiac muscle tissue, experimentally induced by cadmium, by means of computerized image analysis. *Rev. Port. Cardiol.*, **17 (9)**: 735-740.
- Davenport, J.** (1993) Ultrasonography: a non-invasive tool for the study of structure and mechanical events in marine animals. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, **73**: 461-464.
- Davie, P.S., Farrell, A.P.** (1991) The coronary and luminal circulations of the myocardium of fish. *Can. J. Zool.*, **69**: 1993-2001.
- Davie, P.S., Farrell, A.P., Franklin, C.E.** (1992) Cardiac performance of an isolated eel heart: effects of hypoxia and responses to coronary artery perfusion. *J. Exp. Zool.*, **262(2)**: 113-121.
- Davie, P.S., Forster, M.E.** (1980) Cardiovascular responses to swimming in eels. *Comp. Biochem. Physiol.*, **67**: 367-373.
- Davie, P.S., Forster, M.E., Davison, B., Satchell, G.H.** (1987) Cardiac function in the New Zealand hagfish, *Eptatretus cirrhatu*s. *Physiol. Zool.*, **60**: 233-240.
- Davie, P.S., Franklin, C.E.** (1992) Myocardial oxygen consumption and mechanical efficiency of a perfused dogfish heart preparation. *J. Comp. Physiol. B.*, **162**: 256-262.

- Di Bello, V., Pedrinelli, R., Giorgi, D., Bertini, A., Bianchi, M., Paterni, M., Romano, M.F., Dell'Omo, G., Giusti, C.** (1999) Ultrasonic myocardial texture versus Doppler analysis in hypertensive heart – a preliminary study. *Hypertension.*, **33**: 66-73.
- Di Bello, V., Pedrinelli, R., Giorgi, D., Bertini, A., Talarico, L., Caputo, M.T., Massimiliano, B., Dell'Omo, G., Paterni, M., Giusti, C.** (1997) Ultrasonic videodensitometric analysis of two different models of left ventricular hypertrophy. Athlete's heart and hypertension. *Hypertension.*, **29(4)**: 937-44.
- Driedziec, W.R., Bailey, J.R., Sephton, D.H.** (1996) Cardiac adaptations to low temperature in non-polar teleost fish. *J. Exp. Zool.*, **275**: 186-195.
- Edler, I., Hertz, C.H.** (1954) The use of ultrasonic reflectoscope for the continuous recording of the movements of the heart walls. *kungliga Fysiografiska Salls Kajefs i Lund Foivandlingar*. Bd **24(5)**: 1-19.
- Emery, S. H., Mangano, C., Randazzo, V.** (1985) Ventricle morphology in pelagic elasmobranch fishes. *Comp. Biochem. Physiol.*, **82A (3)**: 635-643.
- Farcot, J.C.** (1986) Comprendre l'Echocardiographie, Editions Medicales, Paris, p.192.
- Farrell, A.P.** (1984) A review of cardiac performance in teleost heart: intrinsic and humoral regulation. *Can. J. Zool.*, **62**: 523-536.
- Farrell, A.P.** (1987) Coronary flow in perfused rainbow trout heart. *J. Exp. Biol.*, **129**: 107-123.
- Farrell, A.P.** (1991a) From hagfish to tuna: a perspective on cardiac function in fish. *Physiol. Zool.*, **64 (5)**: 1137-1164.
- Farrell, A.P.** (1991b) Circulation of body fluids. *In: Comparative Animal Physiology*. Prosses, C.L., ed., Wilwy-Liss, New York, U.S.A., 509-588 pp.
- Farrell, A.P.** (1993) Cardiovascular System. *In "The Physiology of Fishes"* (Evans, D. H., eds.), pp 219-250, CRC Press Inc., Florida, U.S.A..
- Farrell, A.P.** (1996) Features heightening cardiovascular performance in fishes, with special reference to tunas. *Comp. Biochem. Physiol.*, **113A (1)**: 61-67.
- Farrell, A.P., Davie, P.S.** (1991a) Coronary artery reactivity in the maco shark, *Isurus oxyrinchus*. *Can. J. Zool.*, **69**: 375-379.
- Farrell, A.P., Davie, P.S.** (1991b) Coronary vascular reactivity in the skate, *Raja nasuta*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **99C**: 555-560.
- Farrell, A.P., Davie, P.S., Franklin, C.E., Brill, R.W.** (1992) Cardiac physiology in tunas. I – *In vitro* perfused heart preparations from yellowfish and skipjack tunas. *Can. J. Zool.*, **70**: 1200-1210.
- Farrell, A.P., Graham, M.S.** (1987) Effects of adrenergic drugs on the coronary circulation of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can. J. Zool.*, **64**: 481-484.

- Farrell, A.P., Hammons, A.M., Graham, M.S., Tibbits, G.F. (1988) Cardiac growth in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Can. J. Zool.*, **66**: 2368-2373.
- Farrell, A.P., Jones, D.R. (1992) The heart. In: "Fish Physiology." (Hoar, W. S., Randall, D. J. e Farrell, A. P., eds.), Academic Press Inc., London, 1-88 pp.
- Feigenbaum (1981) Echocardiography. Lea & Febiger, Philadelphia, U.S.A.
- Feigenbaum, H., Popp, R.L., Wolf, S.B. (1972) Ultrasound measurement of left ventricle: correlative study with angiocardiography. *Arch. Intern. Med.*, **129**: 461.
- Feigenbaum, H., Waldhausen, J.A., Hyde, L.P. (1965) Ultrasound diagnosis of pericardial effusion. *J.A.M.A.*, **191**: 711-714.
- Fiorreti, P., Brower, R.W., Meester, G.T., Serruys, P.W. (1980) Interactions of left ventricular relaxation and filling during early diastole in human subjects. *Am. J. Cardiol.*, **46**: 197-203.
- Foster, M.E., Axelsson, M., Farrell, A.P., Nilsson, S. (1991) Cardiac function and circulation in hagfishes. *Can. J. Zool.*, **69**: 1885-1992.
- Fragata, J. (1991) Função ventricular diastólica no pós-operatório da cirurgia cardíaca - Dissertação de Doutorado, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal.
- Franklin, C.E., Axelsson, M. (1994) Coronary hemodynamics in elasmobranchs and teleosts. *Cardioscience*, **5**: 155-161.
- Franklin, C.E., Davie, P. S. (1992) Dimensional analysis of the ventricle of an *in situ* perfused trout heart using echocardiography. *J. Exp. Biol.*, **166**: 47-60.
- Gallego, A., Durán, A.C., Andrés, A.V., Navarro, P., Muñoz-Chápuli, R. (1997) Anatomy and development of the sinoatrial valves of the dogfish (*Scyliorhinus canicula*). *Anat. Rec.*, **248**:224-232.
- Gamperl, A.K., Axelsson, M., Farrell, A.P. (1995) Effects of swimming and environmental hypoxia on coronary blood flow in rainbow trout. *Am. J. Physiol.*, **269**(5): R1258-66.
- Gamperl, A.K., Pinder, A.W. (1994) Effects of coronary ablation and adrenergic stimulation on *in vivo* cardiac performance in trout (*Oncorhynchus Mykiss*). *J. Exp. Biol.*, **186**: 127-143.
- Gamperl, A.K., Pinder, A.W., Grant, R.R., Boutilier, R.G. (1994) Influence of hypoxia and adrenaline administration on coronary blood flow and cardiac performance in sea water rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.*, **193**: 209-232.
- Garcia, M.J., Thomas, J.D., Klein, A.L. (1998) New Doppler echocardiographic applications for the study of diastolic function. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **32**(4): 865-75.
- García-Fernández, M.A. (2000) Ecocardiografía Básica. Ene Ediciones. Madrid, España.

- Garcia-Martinez, V., Sanchez-Quintana, D., Hurle, J.M.** (1990) Histogenesis of the semilunar valves: an immunohistochemical analysis of tenascin and type-I collagen distribution in developing chick heart valves. *Cell Tissue Res.*, **259(2)**: 299-304.
- Gilbert, J.C., Glantz, S.A.** (1989) Determinants of left ventricular filling and of the diastolic pressure-volume relation. *Circ. Res.*, **64(5)**: 827-52.
- Harrison, P., Zummo, G., Farina, F., Tota, B., Johnson, I.A.** (1991) Gross anatomy, myoarchitecture and ultrastructure of the heart ventricle in the haemoglobinless icefish *Chaenocephalus aceratus*, *Can. J. Zool.*, **69**: 1339-1347.
- Hassan, S., Turner, P.** (1983) Systolic time intervals: a review of the methods in the non-invasive investigation of the cardiac function in the health, disease and clinical pharmacology. *Postgrad. Med. J.*, **59**:423-434.
- Hatler, L., Angelsen, B.** (1985) Doppler ultrasound in cardiology. Physical principles and clinical application (2nd ed.). Lea & Febiger, Philadelphia, U.S.A.
- Hibiya, T.** (1982) An Atlas of Fish Histology (normal and pathological features), Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, Germany.
- Ho, P.P., Pauls, G.L., Lamberton, D.F., Portnoff, J.S., Pai, R.G., Shah, P.M.** (1994). Doppler derived aortic valve resistance in aortic stenosis: its hemodynamic validation. *J. Heart Valve Dis.*, **3(3)**: 283-7.
- Holen, J., Aaslid, R., Landmark, K., Simonsen, S.** (1976) Determination of pressure gradient in mitral stenosis with a non-invasive ultrasound Doppler technique. *Acta Med Scand*, **199(6)**: 455-60.
- Ihlen, H., Amlie, J.A., Dale, J., Forfang, K., Nitter-Hauge, S., Ottersatd, J.E., Simonson, S., Myhre, E.** (1984) Determination of cardiac output by Doppler echocardiography. *Br. Heart J.*, **51**: 54-60.
- Iliceto, S., Amico, A., Marangelli, V., D'Ambrosio, G., Rizzon, P.** (1988) Doppler echocardiographic evaluation of the effect of atrial pacing-induced ischemia on left ventricular filling in patients with coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **11(5)**: 953-61.
- Isaza, R., Akerman, N. Jacobson, E.R.** (1993) Ultrasound imaging of the coelomic structures in the Boa constrictor (*Boa constrictor*). *Vet. Radiol.*, **34**: 445-450.
- Joaquim, N., Correia, V., Coucelo, J.M., Coucelo, J.A.** (1999) Systolic intervals analysis on different groups of vertebrates. *Annual Meeting of the Society for Experimental Biology*, Edinburgh, Scotland, **Abstract**.
- Joaquim, N.; Coucelo, J.M.; Coucelo, J. A.** (2000a) Non invasive ultrasonographic assessment of coronary flow reserve in *Halobatrachus didactylus*. *International Congress on the Biology of Fish 2000*, Aberdeen, Scotland, **Abstract**.
- Joaquim, N.; Coucelo, J.M.; Coucelo, J. A.** (2000b) Enhance calculation of ventricle volumes in *Halobatrachus didactylus* - a non-invasive approach. *International Congress on the Biology of Fish 2000*, Aberdeen, Scotland, **Abstract**.

- Johansen, K., Gesser, H.** (1986) Fish Cardiology: structural haemodynamic, electromechanical and metabolic aspects. *In: "Fish Cardiology: Recent Advances"* (Eds. S. Nilsson e S. Holmgren), London, U. K., 71-85.
- Jones, D., Brill, R., Bushnell, P.** (1993) Ventricular and arterial dynamics of anesthetized and swimming tuna. *J. Exp. Biol.*, **182**: 97-112.
- Joyner, C.R., Reid, J.M.** (1963) Application of ultrasound in cardiology and cardiovascular physiology. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, **5**: 482-497.
- Klein, A.L., Cohen, G.I.** (1992) Doppler echocardiographic assessment of constrictive pericarditis, cardiac amyloidosis, and cardiac tamponade. *Cleve. Clin. J. Med.* **59(3)**: 278-90.
- Kloster, F.E.** (1977) Screening, population and sequential follow-up studies by echocardiography. *In: "Echocardiology. With Doppler Applications and Real Time Imaging"* (N. Bom, eds.), The Hague, Martinus Nijhoff Medical Division, pp 61-65.
- Lai, N.C., Graham, J.B., Bhargava, V., Shabatei, R.** (1996) Mechanisms of venous return and ventricular filling in elasmobranch fish. *Am. J. Physiol.*, **270(5)**: H1766-71.
- Lai, N.C., Graham, J.B., Dalton, N., Shabatei, R., Bhargava, V.** (1998) Echocardiographic and hemodynamic determinations of the ventricular filling pattern in some teleost fishes. *Physiol. Zool.*, **71(2)**:157-67.
- Lai, N.C., Shabatei, R., Graham, J.B., Horr, B.D., Sunnerhagen, K.S., Bhargava, V.** (1990) Cardiac function in the leopard shark, *Triakis semifasciata*. *J. Comp. Physiol. B*, **160**: 259-268.
- Lewis, J.F., Kuo, L.C., Nelson, J.G., Limacher, M.C., Quinones, M.A.** (1984). Pulsed doppler echocardiographic determination of stroke volume and cardiac output: clinical validation of two methods using apical windows. *Circulation.*, **70**: 425-431.
- Lewis, R.P., Rittgers, S.E., Forester, W.F., Boudoulas, H.** (1977) A critical review of the systolic time intervals. *Circulation.*, **56**: 146-158.
- Lieback, E., Hardouin, I., Meyer, R., Bellach, J., Hetzer, R.** (1996) Clinical value of echocardiographic tissue characterization in the diagnosis of myocarditis. *Eur. Heart J.*, **17(1)**: 135-42.
- Madaras, E.I., Barzilai, B., Perez, J.E., Sobel, B.E., Miller, J.G.** (1983) Changes in myocardial backscatter throughout the cardiac cycle. *Ultrason Imaging*, **5(3)**: 229-39.
- Masuyama, T., St Goar, F.G., Tye, T.L., Oppenheim, G., Schnittger, I., Popp, R.L.** (1989) Ultrasonic tissue characterization of human hypertrophied hearts *in vivo* with cardiac cycle-dependent variation in integrated backscatter. *Circulation*, **80(4)**: 925-34.
- Mimbs, J., O'Donnell, M., Bauwens, D., Miller, J., Sobel, B.** (1980) The dependence of ultrasonic attenuation and backscatter on collagen content in dog and rabbits hearts. *Circ. Res.*, **47**: 49-58.

- Mirsky, I., Pasipoularides, A.** (1990) Clinical assessment of diastolic function. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, **32(4)**: 291-318.
- Mustafa, T., Agnisola, C., Hansen, J.K.** (1997) Evidence for NO-dependent vasodilation in the trout (*Oncorhynchus mykiss*) coronary system. *J. Comp. Physiol. B*, **167**: 98-104.
- Muzavor, S. Arruda, L., Andrade, J.P.** (1993) Roteiro Ecológico da Ria Formosa, II-Peixes, Algarve em Foco Editora., Faro, Portugal.
- Nishimura, R.A., Abel, M. D., Hatle, L.K., Holmes, D.R.Jr., Housmans, P.R., Ritman, E.L., Tajik, A.J.** (1989b) Significance of doppler indexes of diastolic filling of the left ventricle: comparison with invasive hemodynamics in a canine model. *Am. Heart J.*, **118**: 1248-58.
- Nishimura, R.A., Abel, M. D., Hatle, L.K., Tajik, J. A.** (1989a) Assessment of diastolic function of the heart: Background and current application of Doppler echocardiography. Part II: Clinical Studies. *Mayo Clin Proc.*, **64**: 181-204.
- Nishimura, R.A., Miller, F.A. Jr, Callahan, M.J., Benassi, R.C., Seward, J.B., Tajik A.J.** (1985) Doppler echocardiography: theory, instrumentation, technique, and application. *Mayo Clin. Proc.* **60(5)**: 321-343.
- O'Brien, W.D.** (1977) The relationship between collagen and ultrasonic attenuation and velocity in tissue. In: "Proceedings, Ultrasonics International 77", IPC Science and Technology Press, Guilford, England, 194-205 pp.
- Oh, J.K., Seward, J.B., Tajik, A.J.** (1994) The Echo Manual – from the Mayo Clinic, Little, Brown and Co., Boston, U.S.A., 248 pp.
- Oliveira, J.** (1988) Aquisição e processamento de estruturas ventriculares a partir do ecocardiograma Modo-M, Dissertação de Doutoramento, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal.
- Olshansky, B., Collins, S.M., Skorton, D.J., Prasad, N.V.** (1984) Variation of left ventricular myocardial gray level on two-dimensional echocardiograms as a result of cardiac contraction. *Circulation*, **70(6)**: 972-7.
- Olson, K.R.** (1998) The cardiovascular system. In: "The physiology of fishes." (Evans, D., ed.), CRC Press, Boca Raton, U.S.A, pp 129-154.
- Omoto, R., Kasai, C.** (1987) Physics and instrumentation of Doppler color flow mapping. *Echocardiography*, **4**: 467-483.
- Omoto, R., Yokote, Y., Takamoto, S., Kyo, S., Ueda, K., Asano, H., Namekawa, K., Kasai, C., Kondo, Y., Koyano, A.** (1984) The development of real-time two-dimensional Doppler echocardiography and its clinical significance in acquired valvular diseases. With special reference to the evaluation of valvular regurgitation. *Jpn. Heart J.*, **25(3)**: 325-40.

- Pai, R.G., Pai, S.M., Bodenheimer, M.M., Adamick, R.D.** (1993). Estimation of rate of left ventricular pressure rise by Doppler echocardiography: its hemodynamic validation. *Am. Heart J.*, **126**: 240-242.
- Pai, R.G., Shah, P.M.** (1995) Echocardiographic and other noninvasive measurements of cardiac hemodynamics and ventricular function. *Curr. Probl. Cardiol.*, **XX(10)**: 683-770.
- Pennick, D.G., Stewart, J.S., Paul-Murphy, J., Pion, P.** (1991) Ultrasonography of the California desert tortoise (*Xerobates agassazi*): anatomy and physiology. *Vet. Radiol.*, **32**: 112-116.
- Picano, E., Faletra, F., Marini, C., Paterni, M., Danzi, G.B., Lombardi, M., Campolo, L., Gigli, G., Landini, L., Pezzano, A., Distante, A.** (1993) Increased echodensity of transiently asynergic myocardium in humans: a novel echocardiographic sign of myocardial ischemia. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **21(1)**: 199-207.
- Pinamonti, B., Picano, E., Ferdeghini, E.M., Lattanzi, F., Slavich, G., Landini, L., Camerini, F., Benassi, A., Distante, A., L'Abbate, A.** (1989) Quantitative texture analysis in two-dimensional echocardiography: application to the diagnosis of myocardial amyloidosis. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **14(3)**: 666-71.
- Poupa O, Lindstrom L.** (1983) Comparative and scaling aspects of heart and body weights with reference to blood supply of cardiac fibers. *Comp. Biochem. Physiol. A*, **76(3)**: 413-21.
- Randall, D.** (1968) The functional morphology of the heart in fishes. *Am. Zool.*, **39**:185-192.
- Randall, D.** (1970) The circulatory system. In: "Fish Physiology - The Nervous System, Circulation and Respiration" (Hoar, W.S. e Randall, eds.), vol. IV, Academic Press Inc., San Diego, pp 133-172.
- Randall, D.** (1985) Shunts in fish gills. In: Cardiovascular shunts – Phylogenetic, ontogenetic and clinical aspects. Alfred Benson Symp. XXI (Johansen, K e Burggren, W., eds.), Copenhagen, 71p.
- Randall, D., Burggren, W., French, K.** (1997) Eckert animal physiology: mechanisms and adaptations. 4th ed., W.H.Freeman, New York, U.S.A.
- Reimers, E., Landmark, P., Sorsdal, T. Bohmer, E., Solum, T.** (1987) Determination of salmonids' sex, maturation and size: na ultrasound and photocell approach. *Aquac. Mag.* Nov-Dez: 41-44.
- Richards, K.L.** (1993) Conventional and color doppler assessment of mitral and tricuspid valve stenosis. In: "Doppler echocardiography." (Nanda, N.C., ed.), Lea & Febiger, Philadelphia, pp 109-119.
- Rodnick, K.J., Sidell, B.D.** (1997) Structural and biochemical analyses of cardiac ventricular enlargement in cold-acclimated striped bass. *Am. J. Physiol.*, **273**: R252-R258.

- Rokey, R., Kuo., L.C., Zoghbi, W.A., Limacher, M.C., Quinones, M.A.** (1985) Determination of parameters of left ventricular diastolic filling with pulsed Doppler echocardiography: comparison with cineangiography. *Circulation*, **71**(3): 543-50.
- Sainbury, A.W., Gili, C.** (1991) Ultrasonographic anatomy and scanning technique of the coelomic organs of the bose monitor (*Varanus exanthematicus*). *J. Zoo. Wildlife Med.*, **22**: 245-248.
- Saini, V. D., Nanda, N.C., Maurik, D.** (1993) Basic principles of ultrasound and Doppler effect. In: "Doppler Echocardiography" (N.C. Nanda, ed.), Lea & Febiger, Philadelphia, pp 3-7.
- Sanchez-Quintana, D, Hurle, J.M.** (1987) Ventricular myocardial architecture in marine fishes. *Anat. Rec.*, **217**: 263-273.
- Sanchez-Quintana, D., Garcia-Martinez, V., Climent, V. Hurle, J.** (1996) Myocardial fiber and connective tissue architecture in the fiber heart ventricle. *J. Exp. Zool.*, **275**: 112-124.
- Sanchez-Quintana, D., Garcia-Martinez, V., Climent, V., Hurle, J.** (1995) Morphological analysis of the fish heart ventricle: Myocardial and connective tissue architecture in teleost species. *Ann. Anat.*, **177**: 267-274
- Sande, R.D., Poppe, T.T.** (1995) Diagnostic ultrasound examination and echocardiography in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Vet. Radiol. Ultrasound.*, **36**: 551-8.
- Santer, R.M.** (1976) The distribution of collagen bundles and an epicardial coronary vasculature in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.) heart ventricle at different ages. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, **56**: 241-246.
- Santer, R.M.** (1985) Morphology and innervation of the fish heart. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.*, **89**: 1-102.
- Santer, R.M., Greer-Walker, M.** (1980) Morphological studies on the ventricle of teleost and elasmobranch hearts. *J. Zool. (Lond.)*, **190**: 259-272.
- Santer, R.M., Greer-Walker, M., Emerson, L., Witthames, P.R.** (1983) On the morphology of the heart ventricle in marine teleost fish (Teleostei). *Comp. Biochem. Physiol. A*, **76**: 453-459.
- Satchell, G.H.** (1986) Cardiac function in the hagfish, Myxine (Myxinoidea: Cyclostomata). *Acta. Zool.*, **67**:115-122.
- Satchell,G.H.** (1971) *Circulation in Fishes*. Cambridge University Press, London, U.K.
- Schiller, N.B., Shah, P.M., Crawford, M.** (1989) Recommendations for quantification of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. *J. Am. Soc. Echocardiogr.*, **5**: 358-67.
- Schlief, R.** (1994) Echo enhancement: agents and techniques – basic principles. *Adv. Echo-contrast.*, **4**: 5-19.

- Skorton, D.J., Collins, S.M., Nichols, J., Pandian, N., Bean, J.A., Kreber, R.E.** (1983b) Qualitative texture analysis in two-dimensional echocardiography: application to the diagnosis of experimental myocardial contusion. *Circulation.*, **68**: 217-223.
- Skorton, D.J., Collins, S.M., Woskoff, S.D., Bean, J.A., Melton, H.E.** (1983a). Range- and azimuth-dependent variability of image texture in two-dimensional echocardiograms. *Circulation.*, **68**: 834-840.
- Small, S.A., MacDonald, C., Farrell, A.P.** (1990) Vascular reactivity of the coronary artery in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Am. J. Physiol.*, **258** (6): R1402-10.
- Snyder, P., Shaw, N.G., Heard, D.L.** (1999) Two-dimensional echocardiographic anatomy of the snake heart (*Python molurus bivittatus*). *Vet. Radiol.*, **40**(1): 66-72.
- Spirito, P., Maron, B.J., Bonow, R.O.** (1986) Non invasive assessment of left ventricular diastolic function: comparative analysis of Doppler echocardiographic and radionuclide angiographic techniques. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **7**: 518- 26.
- Spodick, D.H., Doi Y.L., Bishop, R.L., Hashimoto T.** (1984) Systolic time intervals reconsidered. Reevaluation of the preejection period: absence of relation to heart rate. *Am. J. Cardiol.*, **53**(11): 1667-70.
- Takatsuji, H., Mikami, T., Urasawa, K., Teranishi, J., Onozuka, H., Takagi, C., Makita, Y., Matsuo, H., Kusuoka, H., Kitabatake, A.** (1996) A new approach for evaluation of left ventricular diastolic function: spatial and temporal analysis of left ventricular filling flow propagation by color M-mode Doppler echocardiography. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **27**(2): 365-71.
- Takeda, K., Kono, K., Tamano, K., Takahashi, M., Nakamura, Y., Masuda, T., Hosoya, K., Yoshihara, T., Yagi, S.** (1993). New interpretation of systolic time intervals from active cross-bridge model. *Jpn. Circ. J.*, **57**: 299-311.
- Takeda, K., Tamano, K., Okamura, A., Kobayashi, N., Shimizu, T., Kadota, R., Yamamoto, H., Yagi, S.** (1991) Slope of human left ventricular end-systolic force-length relation in independent of myocardial length. *Am. J. Physiol.* **261**: H1060-H1066.
- Takenaka, K., Dabestani, A., Gardin, J.M., Russell, D., Clark, S., Allfie, A., Henry, W.L.** (1986) Left ventricular filling in hypertrophic cardiomyopathy: a pulsed Doppler echocardiographic study. *J Am Coll Cardiol* **7**(6): 1263-71.
- Takenaka, K., Dabestani, A., Gardin, J.M., Russell, D., Clark, S., Allfie, A., Henry, W.L.** (1986b) Pulsed Doppler echocardiographic study of left ventricular filling in dilated cardiomyopathy. *Am. J. Cardiol.*, **58**(1): 143-7.
- Takeuchi, M.** (1985) Effects of left ventricular assynchrony on time constant and extrapolated pressure of left ventricular pressure decay in coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **6**: 597-602.

- Teichholz, L.E., Kreulen, T., Herman, M.V., Gorlin, R.** (1976) Problems in echocardiographic volume determination: echocardiographic - angiographic correlations in the presence or absence of asynergy. *Am. J. Cardiol.*, **37**: 7-11.
- Thomas, J.D., Weyman, A.E.** (1991) Echocardiographic doppler evaluation of left ventricular diastolic function. *Circulation.*, **84 (3)**: 977-990.
- Tota, B.** (1989) Myoarchitecture and vascularization of the elasmobranch heart ventricle. *J. Exp. Zool.* **2**: 122-135.
- Tota, B., Cimini, V., Salvatore, G., Zummo, G.** (1983) Comparative study of the arterial and lacunary systems of the ventricular myocardium of elasmobranch and teleost fishes. *Amer. J. Anat.*, **167**: 15-32.
- Tota, B., Gattuso, A.** (1996) Heart ventricle pumps in teleost and elasmobranchs: a morphodynamic approach. *J. Exp. Zool.*, **275**: 162-171
- Watson, A. D., Cobb. J.** (1979) A comparative study of the innervation and vascularization of the bulbus arteriosus in teleost fish. *Cell Tissue Res.*, **196**: 337-346.
- Weber, K.T.** (1989) Cardiac interstitium in health and disease: fibrillar collagen network. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **13**, 1637-52
- Weissler, A.M.** (1977). Currents concepts in cardiology; systolic time intervals. *N. Engl J. Med.*, **296**: 321-324.
- Wong, A.K., Verdonk, E.D., Hoffmeister, B.K., Miller, J.G., Wickline, S.A.** (1992) Detection of unique transmural architecture of human idiopathic cardiomyopathy by ultrasonic tissue characterization. *Circulation*, **86**: 1108-1115.
- Yellin EL, Nikolic S, Frater RW.** (1990) Left ventricular filling dynamics and diastolic function. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, **32(4)**: 247-71.
- Zummo, G., Acierno, R., Agnisola, C., Tota, B.** (1995) The heart of the icefish: bioconstruction and adaptation. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **28**: 1265-1276.

ANEXO

Lista de publicações e comunicações

Parte dos estudos incluídos nesta tese, foram apresentados em publicações e comunicações em reuniões científicas nacionais e no estrangeiro:

Publicações

Coucelo, J.M.; **Joaquim, N.**; Coucelo, J.A. (2000) Calculation of volumes and systolic indices of heart ventricle from *Halobatrachus didactylus*: echocardiographic non-invasive method. *J. Exp. Zool.*, 286: 585-595.

Coucelo, J.M.; **Joaquim, N.**; Carreira, G.; Coucelo, J.; Azevedo, J.; Jacques, A.; Alves, J.; Arroja, I.; Araújo, V. Variação cíclica do espectro de densitometria ecocardiográfica bidimensional em função da fase do ciclo cardíaco. Trabalho experimental e sua aplicação clínica na hipertensão arterial. *Rev. Port. Cardiol.*, 16 (1): 106, 1997.

Joaquim, N.; Carreira, G.; Coucelo, J. M.; Coucelo, J.; Azevedo, J., Arroja, I. Densitometria miocárdica ecocardiográfica bidimensional do espectro de cinzentos. Estudo dos factores dependentes da amostra e da variabilidade técnica inter e intra-observador. *Rev. Port. Cardiol.*, 15 (11): 827-830: 1996.

Comunicações

Joaquim, N.; Coucelo, J.M.; Coucelo, J. A. Non Invasive Ultrasonographic Assessment of Coronary Flow Reserve in *Halobatrachus didactylus*. (Comunicação oral) *International Congress on the Biology of Fish 2000*, Julho de 2000, Universidade de Aberdeen, Aberdeen, Scotland.

Joaquim, N.; Coucelo, J.M.; Coucelo, J. A. Enhance calculation of ventricle volumes in *Halobatrachus didactylus* - a non-invasive approach. (Comunicação oral) *International Congress on the Biology of Fish 2000*, Julho de 2000, Universidade de Aberdeen, Aberdeen, Scotland.

Joaquim, N.; Correia, V.; Coucelo, J.M.; Coucelo, J. A. Systolic intervals analysis on different groups of vertebrates. (Poster) *Annual Meeting of the Society for Experimental Biology*, Edimburgo, Escócia, Março 1999.

Joaquim, N.; Coucelo, J.M.; Coucelo, J. A. Different methods to calculate end-systolic and end-diastolic volumes and systolic indices of *Halobatrachus didactylus* ventricle using echocardiographic images. (Poster) *Annual Meeting of the Society for Experimental Biology*, Edimburgo, Escócia, Março 1999.

- Joaquim, N.;** Coucelo, J.M.; Coucelo, J. Cálculo dos volumes telesistólicos e telediastólicos, por diferentes métodos, e de índices sistólicos do ventrículo de *H. didactylus* por ecocardiografia. (Comunicação oral) *Reunião da Sociedade Portuguesa de Biologia*, Lisboa, Junho de 1998.
- Joaquim, N.;** Coucelo, J.M.; Correia, V.; Coucelo, J.; Azevedo, J. Análise dos intervalos sistólicos em corações de diferentes espécies animais, por ecocardiografia Doppler. *XIX Congresso Português de Cardiologia*. Abstract: *Rev. Port. Cardiol.*, 17, Sup I: 1-80, 1998.
- Joaquim, N.;** Coucelo, J.M.; Coucelo, J.A.; Carreira, G.; Azevedo, J.; Arroja, I. Myocardial two-Dimensional ultrasound densitometry study of gray scale spectrum of intensity. Analysis of the factors and technical, intra- and inter-observer variability's. (Comunicação oral) Abstract: *J. Am. Soc. Echocardiog.*, 10 (4): 424, 1997.
- Joaquim, N.;** Carreira, G.; Coucelo, J.M.; Coucelo, J.; Azevedo, J. Ultrasonographic Densitometric Gray Scale characterization of the heart muscle of *Halobatrachus didactylus* - Technique caveats. (Poster) *VII International Symposium on Fish Physiology*, Oslo, Noruega, Agosto 1996.
- Carreira, G.; Coucelo, J.; **Joaquim, N.;** Coucelo, J.M.; Azevedo, J.; Arroja, I. Estudo Densitométrico Ecocardiográfico 2D com análise espectral miocárdica de cinzentos. Comparação dos parâmetros derivados de dois métodos computadorizados alternativos de estudo. (Poster) *XVII Congresso Português de Cardiologia*. Abstract: *Rev. Port. Cardiol.*, 15, Sup III: 101, 1996.
- Joaquim, N.;** Carreira, G.; Coucelo, J.M.; Coucelo, J.; Azevedo, J.; Arroja, I. Densitometria miocárdica ecocardiográfica bidimensional do espectro de cinzentos. Estudo dos factores dependentes da amostra e da variabilidade técnica inter e intra-observador. (Poster) *XVII Congresso Português de Cardiologia*. Abstract: *Rev. Port. Cardiol.*, 15, Sup III: 105, 1996.
- Joaquim, N.;** Carreira, G.; Coucelo, J.M.; Coucelo, J.; Azevedo, J.; Jacques, A.; Alves, J.; Arroja, I.; Araújo, V. Variação cíclica do espectro de densitometria ecocardiográfica bidimensional em função da fase do ciclo cardíaco. Trabalho experimental e sua aplicação clínica na hipertensão arterial. (Poster) *XVII Congresso Português de Cardiologia*. Abstract: *Rev. Port. Cardiol.*, 15, Sup III: 106, 1996.