

Primórdio nodal: Estudos histográficos e morfométricos em embriões humanos com idade entre 35 e 50 dias

Armando Miguel Júnior*

RESUMO

Foram analisados através da cariometria os núcleos de 521 células componentes do primórdio nodal e das precursoras das musculares contráteis, observadas histograficamente em cinco embriões humanos com idade entre 35 e 50 dias de vida. Os embriões foram cortados em série e seqüências com 8 micrômetros de espessura, sendo corados pelo hemalume eosina. O objetivo foi verificar se o núcleo das células componentes do primórdio nodal era maior ou não que o das células precursoras das musculares contráteis. O estudo revelou: 1º. Apesar da diferença visual entre os núcleos das células do primórdio nodal em relação aos das células precursoras das musculares contráteis só houve significância estatística nos 4 embriões cuja idade é superior a 40 dias. No embrião de 35 dias (7,5 milímetros de comprimento craniocaudal) não houve diferença estatisticamente significativa; 2º. A mediana dos valores dos volumes nucleares das células do primórdio nodal, em todos os embriões, foi sempre maior que a mediana dos volumes nucleares das células precursoras das musculares contráteis; 3º. Existe uma tendência de as células estudadas apresentarem uma diminuição do volume nuclear com o aumento da idade do embrião.

Unitermos: *Embriologia do sistema de condução, nó atrioventricular, embriologia*

INTRODUÇÃO

Os estudos do sistema específico de condução do coração iniciaram-se com PURKINJE⁷, em 1845, observando algumas células peculiares na região subendocárdica do ventrículo de carneiros, que tinham características diferentes das de contração muscular. Posteriormente HIS JR.², em 1893 demonstrou a existência de um fascículo que recebeu seu nome e TAWARA¹⁰, em 1905, descobriu uma formação refletindo uma particular estrutura, na porção mais apical do feixe, cabendo a KEITH & FLACK⁴, 1906, uma melhor definição da região, que foi por eles denominada de região sinu-auricular.

As células componentes do nó AV em suas fase embrionária tiveram seus aspectos histográficos descritos por TANDLER⁹, em 1912, em um embrião humano com 20 milímetros de comprimento craniocaudal (mmCR), como tendo limites imprecisos, núcleos grandes hiperconrados e citoplasma fracamente corado pela eosina. Recentemente, ampliou-se esta descrição afirmando que os núcleos além de mais corados são maiores que os das demais células precursoras das musculares contráteis adjacentes. O citoplasma toma a cor vermelho brilhante, pela eosina, com aspecto vacuolar, possivelmente por conter menor número de miofibrilas^{5, 12, 13}.

Uma das dificuldades encontradas na interpretação dos achados histográficos do primórdio nodal reside na caracterização objetiva de grupos celulares pouco diferenciados, que evoluirão para estruturas definidas. No intuito de caracterizar

* Professor Titular da Disciplina de Cardiologia da Pontifícia Universidade Católica de Campinas.

melhor estas células, avaliou-se o volume nuclear e realizou-se a análise estatística dos dados obtidos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados cinco embriões humanos: embrião nº 1 com 7,5 mmCR (35 dias); embrião nº 2 com 11,0 mmCR (40 dias), o embrião nº 3 com 19,0 mmCR, o embrião nº 4 com 20,0 mmCR e o embrião nº 5 com 22,0 mmCR (aproximadamente 50 dias). O material obtido foi levado para fixação num intervalo de tempo que não ultrapassou 5 minutos. A fixação foi feita em formalina a 10% por, no mínimo, 72 horas e, em seguida, o material foi destinado para inclusão em parafina.

Os embriões foram seccionados em série com o micrômetros de espessura, corados pela hemalume-eosina, sendo o tempo de eosina igual a 10 minutos. Nos embriões de números 1, 2 e 4 (7,5; 11,0 e 20,0 mmCR respectivamente) o plano de corte foi o sagital; no embrião de número 3 (19,0 mmCR) o plano de corte foi o frontal e no embrião de número 5 (22mmCR) o plano de corte foi o transversal. A tabela 1 refere-se ao número de ordem dos embriões e seus respectivos tamanhos no comprimento craniocaudal).

Tabela 1. Sinopse do material

Número de ordem	Tamanho do Embrião (mmCR)	Idade (dias)	Plano de corte	Número de núcleos examinados		
				PN	Musc	Total
1	7,5	35	Sagital	73	89	162
2	11,0	40	Sagital	53	61	114
3	19,0	50	Frontal	47	60	107
4	20,0	50	Sagital	21	38	51
5	22,0	50	Transv.	59	20	79
				253	268	521

mmCR - comprimento craniocaudal em milímetros. PN - primórdio nodal; MUSC. - células miocárdicas.

Critério adotado para definir a região a ser estudada

O critério adotado para definir a região a ser estudada, como representante do primórdio nodal, foi estabelecido através da observação microscópica das células que apresentassem as características descritas por MALL⁶, no coração embrionário em desenvolvimento.

Cariometria

Utilizou-se a cariométrica com a finalidade de estimar os volumes nucleares das células componentes do primórdio nodal e confrontá-los com os núcleos das células precursoras das musculares contráteis, de sua vizinhança, dando assim apoio às observações histográficas. A medida do volume nuclear foi efetuada com o auxílio da câmara clara, previamente calibrada através de uma lâmina milimetrada.

Os núcleos das células a serem estudados foram visualizados com aumento de 1000 (mil) vezes e, uma vez definidos, superpostos em folha de papel sulfite com o auxílio da câmara clara e seus contornos traçados com lápis.

O volume nuclear foi calculado considerando-se o núcleo como tendo a forma de uma elipse de revolução com três diâmetros. A partir dos desenhos obtidos, procedeu-se à medida do diâmetro maior (D1) e do diâmetro menor (D2), com o auxílio de régua milimetrada, e estes valores foram transformados em micrômetros. O terceiro eixo foi obtido pelo cálculo da raiz quadrada do produto dos dois outros diâmetros obtidos, ou seja: $\sqrt{D1.D2}$.

A fórmula do elipsóide de revolução, segundo VALERI et al.¹¹, é a seguinte:

$$V = K.D1.D2.\sqrt{D1.D2}$$

onde a constante K, para aumento de 1000 vezes, é igual a 0,4523042.

Os valores assim obtidos foram analisados estatisticamente.

Análise estatística

A análise estatística para a comparação entre duas amostras foi feita pelo teste das medianas⁸. A significância das variações dos dados obtidos foi feita comparando-se o valor do X^2 obtido com o X^2 crítico, ao nível de 5%.

A análise em conjunto dos dados obtidos da cariométrica foi feita através do teste da mediana extensiva para mais de duas amostras, conforme SIEGEL⁸. A significância das variações dos dados obtidos foi feita comparando-se o valor do X^2 obtido com o X^2 crítico, ao nível de 5%.

RESULTADOS

Após a determinação histográfica da área do coração embrionário correspondente ao primórdio nodal, com o auxílio da câmara clara, efetuou-se a medição dos volumes nucleares das células encontradas, assim como a medição dos volumes nucleares das células precursoras das musculares contráteis adjacentes.

Nos resultados referentes a cariométrica designaram-se os embriões pelos seus tamanhos em mmCR (milímetros de comprimento craniocaudal) com a intenção de demonstrar melhor as variações encontradas entre eles.

Análise comparativa dos dois grupos celulares no mesmo embrião

A análise dos valores do volume nuclear obtido permitiu compor a tabela 2.

Na primeira coluna estão referidos os embriões por ordem de tamanho em milímetros; na segunda coluna, os respectivos valores da mediana dos volumes nucleares das células componentes do primórdio nodal; na terceira coluna, os respectivos valores da mediana dos volumes nucleares das células precursoras das musculares cardíacas; na quarta coluna, os valores do X^2 resultado da comparação entre os volumes nucleares destes dois tipos celulares e, finalmente, na quinta coluna, as significâncias dos mesmos.

Tabela 2. Comparação dos valores da mediana dos volumes nucleares das células do primórdio nodal (PN) e das células precursoras das musculares contráteis do coração (P. musc.); S - significativo; NS - não significativo; mmCR - comprimento craniocaudal em milímetros; μm^3 - micrômetros cúbicos; $p < 0,05$

Tamanho do Embrião (mmCR)	PN (μm^3)	P. Musc. (μm^3)	χ^2	Sign.
7,5	54,9	43,5	3,69	NS
11,0	61,8	34,5	5,67	S
19,0	57,9	27,4	9,28	S
20,0	43,5	22,4	12,72	S
22,0	38,3	19,9	4,10	S

Os valores das medianas dos volumes nucleares das células componentes do primórdio nodal e das células precursoras das musculares cardíacas nos permitiram elaborar a figura 1 referente às duas populações celulares dos cinco embriões humanos estudados.

Análise comparativa dos valores das medianas dos volumes nucleares das células do primórdio nodal nos embriões humanos estudados

A análise comparativa dos valores das medianas dos volumes nucleares das células do primórdio nodal nos cinco embriões humanos foi realizada através do teste da mediana extensiva a mais de duas amostras, no intuito de verificar possíveis variações, significativas, entre as medianas dos volumes nucleares das células do primórdio nodal nos embriões dos vários estádios.

A tabela 3 mostra os resultados dessas análises comparativas entre as medianas dos volumes nucleares das células do primórdio nodal, em conjunto e aos pares nos cinco embriões humanos. Na análise comparativa foi utilizado o valor de χ^2 corrigido pela fórmula de Yates⁸, resultante da comparação entre os valores nucleares dessas células e a significância dos mesmos.

Tabela 3. Comparação dos valores da mediana dos volumes nucleares das células do primórdio nodal nos cinco embriões humanos estudados; S - significativo; NS - não significativo; $P < 0,05$

Embrião (mmCR)	χ^2 c	Sign.
7,5 x 11,0	0,42	NS
11,0 x 19,0	0,15	NS
19,0 x 20,0	18,10	S
20,0 x 22,0	1,03	NS
Em conjunto	30,03	S

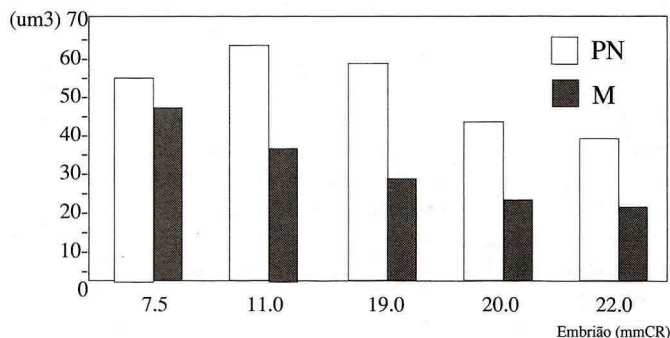


Figura 1. Histograma dos valores das medianas dos volumes nucleares das células componentes do primórdio nodal (PN) e das células precursoras das musculares cardíacas.

Análise comparativa dos valores das medianas dos volumes nucleares das células precursoras das musculares contráteis nos cinco embriões humanos estudados

A análise comparativa dos valores das medianas dos volumes nucleares das células precursoras das musculares contráteis nos cinco embriões humanos foi através do teste da mediana extensiva a mais de duas amostras, no intuito de verificar possíveis variações, significativas, entre as medianas dos volumes nucleares das células precursoras das musculares contráteis do coração dos cinco embriões.

A tabela 4 mostra os resultados dessa análise comparativa entre as medianas dos volumes nucleares das células precursoras das musculares contráteis do coração, em conjunto e aos pares nos cinco embriões humanos. Na análise comparativa foi utilizado o valor de χ^2 corrigido pela fórmula de Yates⁸, resultante da comparação entre os volumes nucleares destas células e a significância dos mesmos.

Tabela 4. Comparação dos valores da mediana dos volumes nucleares das células precursoras das musculares contráteis nos cinco embriões humanos estudados. $p < 0,05$; S - significativo; NS - não significativo.

Embrião (mmCR)	χ^2 c	Sign.
7,5 x 11,0	1,61	NS
7,5 x 19,0	8,33	S
7,5 x 20,0	15,80	S
7,5 x 22,0	9,20	S
11,0 x 19,0	1,30	NS
11,0 x 20,0	4,32	S
11,0 x 22,0	5,00	S
19,0 x 20,0	0,45	NS
19,0 x 22,0	0,71	NS
20,0 x 22,0	0,27	NS
Em conjunto	39,60	S

DISCUSSÃO

Desde o início do século, com os trabalhos clássicos em embriologia^{6,9}, as células precursoras do tecido de condução do coração foram descritas como tendo limites celulares pouco precisos, citoplasma eosinófilo e vacuolizado, sendo uma característica marcante o núcleo bem evidente e maior que o das células precursoras do tecido muscular contrátil.

Partindo dessas observações procurou-se localizar nos 5 embriões estudados células cardíacas com essas características.

Nos embriões nº 1 e 2 (7,5 e 11,0 mmCR respectivamente) localizou-se o agrupamento dessas células, em forma de faixa, na região da porção muscular posterior do septo interventricular, indo do coxim endocárdico dorsal à parte inferior do *bulbus cordis* como mostra a figura 2, levando-nos a definir essa região como correspondente à do primórdio nodal. Este nosso achado é semelhante ao descrito e ilustrado por MALL⁶, e ANDERSON et al.¹, em embriões humanos com idades semelhantes.

Com a evolução embriogênica, pode-se verificar que os embriões nºs 3, 4 e 5 (respectivamente 19,0; 20,0 e 22,0 mmCR) mostram o primórdio nodal localizado na parte basal da porção muscular do septo interventricular, como que cavalgando-o (figura 3). Nesse estágio, o primórdio nodal assume característica morfológica semelhante à do nó AV compacto, mas ainda não se pode denominá-lo como tal, pois para a formação definitiva, como se conhece no adulto, é necessário o término da septogênese cardíaca que ocorre na 8ª semana de vida, e a aposição dessas estruturas septais formadas a este primórdio nodal.

Na análise estatística utilizaram-se dois testes: o da mediana para duas amostras e o da mediana extensivo a mais de duas amostras. Utilizou-se a mediana dos dados obtidos, em virtude de não se ter certeza se o que estava sendo medido era uma calota do núcleo ou se o corte histográfico havia passado pela região equatorial do núcleo; desta forma, sendo a mediana menos sensível a dados aberrantes que a média aritmética, torna-se ela a mais indicada. Outro fato levado em consideração na escolha desses testes foi o número relativamente pequeno de núcleos estudados e a grande variabilidade de tamanho que os mesmos apresentavam.

A variabilidade encontrada no tamanho dos núcleos visualizados pode ser causada pelo sentido do corte histográfico como referido acima, ou pela atividade celular, a qual, quando mais intensa se expressa por núcleos grandes. A significância dos valores de X^2 obtido nos testes foi ao nível de $p < 0,05$.

Análise estatística entre os dois grupos celulares em um mesmo embrião

A análise comparativa entre os dois tipos celulares, ou seja, das células precursoras das musculares contráteis do coração e das componentes do primórdio nodal, foi efetuada dentro do estudo do mesmo embrião, uma vez que a finalidade do teste era verificar, dentro de dois grupos celulares bem definidos histograficamente, possíveis diferenças significativas entre os volumes nucleares das células de cada grupo.

A análise estatística revelou que a mediana dos volumes nucleares das células do primórdio nodal, em todas as idades, foi sempre maior que a mediana dos volumes nucleares das células precursoras das musculares contráteis do coração como demonstrado na tabela 2 e na figura 1.

Quando se observa histograficamente o embrião de número 1 com 7,5 mmCR, vê-se uma diferença nos volumes nucleares das células componentes do primórdio nodal em relação aos núcleos das células precursoras das musculares contráteis do coração, como mostra a figura 4, porém estatisticamente essa diferença não é significativa ($X^2 = 3,69$), como mostra a tabela 4.

Apesar de observar microscopicamente uma diferença entre o tamanho dos núcleos das células do primórdio nodal e o tamanho das células precursoras das musculares cardíacas

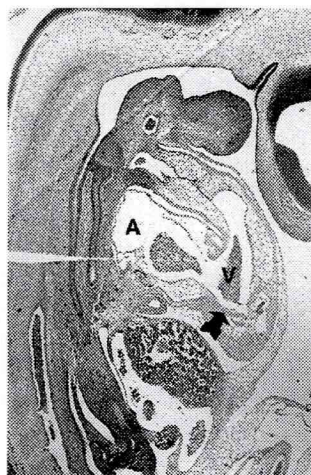


Figura 2. Embrião nº 1 (7,5 mmCR), corte histográfico sagital; coloração hematoxilina eosina; aumento de 40 vezes; A — átrio primitivo; V — ventrículo primitivo; primórdio nodal (seta).

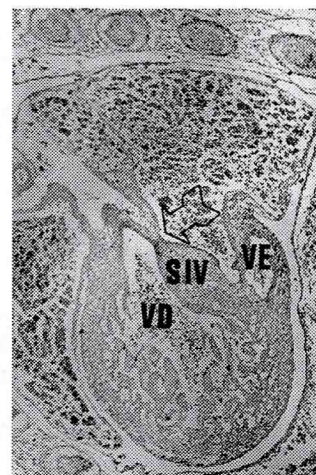


Figura 3. Embrião nº 2 (22,0 mmCR), corte histográfico horizontal, coloração hematoxilina eosina; aumento de 40 vezes; VD — ventrículo direito; VE — ventrículo esquerdo; SIV — septo interventricular; primórdio nodal (seta).

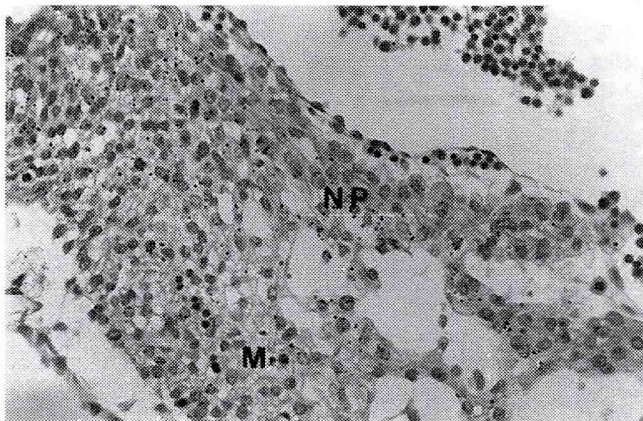


Figura 4. Embrião nº 1 (7,5 mmCR), corte histográfico sagital, pormenor da figura 2; aumento 150 vezes; M — células precursoras das musculares contráteis; NP — células do primórdio nodal.

neste embrião número 1, e não se ter uma correspondência estatística, pode ser devido a dois motivos: primeiro, pelo pequeno número de núcleos encontrados para o estudo, 73 de células do primórdio nodal e 89 de células musculares contráteis; e segundo, pelo estágio "imaturo" em que todas as células desse embrião se encontram, devido a sua grande atividade mitótica.

Ao colocar os valores das medianas dos volumes nucleares obtidos nos dois grupos celulares dos cinco embriões estudados no eixo dos "y" de um gráfico cartesiano e confrontá-los com as idades, em mmCR, colocadas no eixo dos "x" (figura 2), observa-se a tendência das células a apresentar uma diminuição dos valores das medianas dos volumes nucleares com o aumento do tamanho do embrião.

Na análise das barras referentes aos valores das medianas obtidas dos volumes nucleares das células do primórdio nodal, observa-se que a mediana no embrião com 11,0 mmCR é maior que no embrião de 7,5 mmCR, porém a análise estatística mostra que essa diferença não é significativa dado que o X^2 é igual a 0,42 (tabela 3), mas esse fato pode ter ocorrido porque o número de núcleos analisados foi pequeno (73 núcleos no primórdio nodal do embrião de 7,5 mmCR e 53 núcleos no primórdio nodal do embrião de 11 mmCR).

Na análise das barras referentes aos valores das medianas obtidas dos volumes nucleares das células precursoras das musculares cardíacas contráteis, observa-se que com o aumento do tamanho dos embriões ocorre uma diminuição proporcional dos valores das medianas até atingir o ponto de "estabilização" celular (figura 1).

Análise estatística entre os volumes nucleares das células componentes do primórdio nodal nos cinco embriões estudados

Como mostra a tabela 3 os resultados das análises comparativas das medianas dos volumes nucleares das células componentes do primórdio nodal nos cinco embriões humanos estudados têm significativa diferença entre os grupos ($X^2=30,03$), porém comparando-se grupos celulares de embriões subsequentes essas diferenças não são significativa. A única variação significativa ocorreu entre os embriões de 19,0 e 20,0 mmCR ($X^2 = 18,1$). Esse resultado sugere haver uma diferença maior nas células do primórdio nodal desses dois embriões, a partir dos quais as células aparentam estar suficientemente diferenciadas.

Análise estatística entre os volumes nucleares das células precursoras das musculares contráteis do coração nos cinco embriões estudados

A análise estatística em conjunto desses grupos celulares mostra que existe uma diferença significativa entre eles ($X^2=39,6$), mas quando a análise é feita comparando-se estádios subsequentes, as diferenças não são significativas (tabela 4).

Esses resultados mostram que a diferenciação entre as células musculares contráteis é lenta e contínua, não existindo

diferenciação abrupta entre os estádios, até atingir o ponto de estabilização evolutiva.

Os estudos histográficos e cariométricos mostram em todos os estágios as células do primórdio nodal com núcleos centrais ovóides ou rombóides, significativamente maiores que os núcleos das células precursoras das musculares contráteis, mesmo nos estádios mais avançados quando as células tendem a se estabilizar como se pode verificar na figura 3.

Esse aspecto de núcleo volumoso, que constitui uma característica marcante das células do primórdio nodal sempre nos chamou a atenção, sobretudo em relação à sua importância no funcionamento do nó AV^{6,9}.

Segundo JAMES & SHERF³, as células P receberam este nome pela aparência "pálida" ao exame no microscópio óptico e eletrônico lembrando em muitos aspectos as células miocárdicas primitivas (embrionárias). Confrontando esses achados das células do primórdio nodal com os relatados por JAMES & SHERF³ para a célula P fica-se com a impressão que as células do primórdio nodal evoluiriam para as células P do nó AV definitivo e que de alguma forma o núcleo volumoso estaria envolvido na função de geração dos estímulos elétricos cardíacos, mesmo na fase embrionária.

SUMMARY

Nodal primordium: histological and morphometric investigation in human embryos with age between 35 to 50 days.

The present study objectives to confirm this concept investigating 521 nuclei of the nodal primordium and myocardium cells of five human embryos with age between 35 to 50 days. The investigation shows: 1st. All cells of nodal primordium have nuclear volume larger than myocardium cells; 2nd. The histological difference between the cells in human embryo with 7.5 mmCR (35 days) did not have statistic significance, but in other human embryos the nuclear volume of the nodal primordium cells had larger significance than myocardium cells around then; 3rd. The nuclear volume of all cells reduce with age.

Keywords: *Development of cardiac conduction system AV node, embryology.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON,R.H.; BECKER,A.E.; WENINK,A.C.; JANSE,M.J. The development of the cardiac specialized tissue. In: WELLENS,H.J.J.; LIE,K.I. & JANSE,M.J., (eds). *The conduction system of the heart; structure, function and clinical implications*. Philadelphia, Lea & Febiger, 1976. p. 3-28.
- HIS Jr., W. Die thatigkeit des embryonalen herzens und dessen bedeutung beim erwachsenen. *Arb. Med. Klin.*, 14-9,1893. Apud ROBB,J.S.; KAYLOR,C.T.; TURMAN,W.G. A study of the specialized heart tissue at various stages of development of the human fetal heart. *Am. J. Med.*, 5:324-36,1948.
- JAMES,T.N. & SHERF,L. Ultrastructure of the myocardium. In: HURST,J.W. (ed.). *The heart-arteries and veins*. Tokyo, Mcgraw-Hill Koganisha, Ld., 1974. p. 83.

4. KEITH,A. & FLACK,M.W. The auriculo-ventricular bundle on the human heart. *Lancet*, 2:359-64,1906.
5. LICATA,R.H. The human embryonic heart in the ninth week. *Am. J. Anat.*, 94:73-125,1954.
6. MALL,F.P. On the development of the human heart. *Am. J. Anat.* 3:249-98,1912.
7. PURKINJE,J.E. Microscopisch-neurologische beobachtungen. *Arch. F. Anat. Physiol.u.Wiss.Med...*, 12:281-85,1845. Apud TITUS,J.L.; DAUGHERTY,E.W.; EDWARDS,J.D. Anatomy of the normal atrioventricular conduction system. *Am. J. Anat.*, 113:407-15,1963.
8. SIEGEL,S. *Nomparametric statistics for the behavioral sciences*. New York, Graw-Hill Co., 1956.
9. TANDLER,J. Die entwicklungsgeschichte des herzens. In: KEIBEL,F. & MALL,F.P. (eds.). *Manual of human embryology*. Philadelphia, Lipincott, 1912.
10. TAWARA,S. Die topografie und histologie der brückenfasern. Ein beitrage zur lehre von der bedeutung der Purkinjeschen fäden. *Zentralbl.f.Physiol.*, 19:70-6,1905.
11. VALERI,V.; CRUZ,A.R.; BRANDÃO,J.H.S.; LISON,L.A. Relationship between cell nuclear volume and deoxyribonucleic acid of cell of normal epithelium, of carcinoma "in situ" and of invasive carcinoma of uterine cervix. *Acta Cytol.*, 116:488-96,1967.
12. WALLS,E.W. The development of the specialized conducting tissue of the human heart. *J. Anat.*, 81-93-116,1947.
13. WENINK,A.C.G. Development of the human cardiac conducting system. *J. Anat.*, 121:617-31,1976.