MARIA CAROLINA GUIDO

A queda da pressão de perfusão coronariana está associada com remodelamento subendocárdico e disfunção ventricular esquerda na fístula aorto-cava

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

**Área de concentração: Emergências Clínicas
Orientador: Prof. Dr. Clovis de Carvalho Frimm**

Este trabalho é especialmente dedicado aos meus pais Vanderlei e Maria, pelo exemplo de caráter, dignidade e honestidade. Seus princípios, ensinamentos e incentivos foram fundamentais para minha formação pessoal e profissional.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Clovis de Carvalho Frimm, agradeço por, há seis anos, ter me dado a oportunidade de encontrar o meu caminho profissional. Agradeço também por sua sincera amizade, pelo exemplo de dedicação acadêmica, pelos seus ensinamentos e pela sua paciência, fundamental para eu reencontrar calma e serenidade.

Aos co-autores deste trabalho, Amruta, Ana Iochabel Moretti, Fátima Abatepaulo, Fernanda Cordeiro, Luiz Claudio Godoy e Themis Cardinot, que foram fundamentais para a realização deste trabalho. Muito obrigada pela ajuda!

À Profa. Dra. Maria Claudia Irigoyen, à Profa. Dra. Kátia De Angelis, ao Prof. Dr. Joel Heimann e ao aluno de pós-graduação Bruno Rodrigues pela disponibilidade dos materiais e reagentes, pela assistência e ensinamentos técnico-científicos.

Ao Prof. Dr. Irineu Tadeu Velasco e ao Prof Dr. Heraldo Possolo de Souza que permitiram a realização deste trabalho no Laboratório de Emergências Clínicas LIM-51.

À todos os professores, em especial ao Prof. Dr. Francisco Soriano, e funcionários do LIM-51 pela constante ajuda e incentivo.

Aos colegas da pós-graduação do LIM-51, pelo apoio profissional e pessoal.

À minha família pelo interesse constante, pelo amor e carinho que sempre recebi. Em especial, a minha prima Juliana, minha tia Ana e minha avó Maria Luiza. Amo muito vocês!

Ao meu namorado Fernando, que sempre esteve presente ao meu lado. Seu estímulo, sua compreensão e seu apoio foram muito importantes na continuidade e conclusão deste trabalho.

Às minhas grandes amigas Daniella, Luciana e Vanessa pelas nossas conversas e momentos de descontração.

À todas as demais pessoas que, de alguma forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

Lista de abreviaturas e siglas.....	7
Lista de tabelas.....	11
Lista de figuras.....	12
Resumo.....	14
Summary.....	18
Introdução.....	21
Objetivos.....	27
Materiais e métodos	
<i>Modelo biológico.....</i>	<i>28</i>
<i>Modelo experimental de fístula aorto-cava.....</i>	<i>29</i>
<i>Hemodinâmica.....</i>	<i>30</i>
<i>Morfometria.....</i>	<i>33</i>
<i>Ecocardiografia.....</i>	<i>34</i>
<i>Fluxo miocárdico.....</i>	<i>35</i>
<i>Metaloproteinase, TBARS, mieloperoxidase e interleucinas.....</i>	<i>40</i>
<i>Metaloproteinase.....</i>	<i>40</i>
<i>Expressão.....</i>	<i>41</i>
<i>Atividade.....</i>	<i>41</i>
<i>TBARS.....</i>	<i>42</i>
<i>Mieloperoxidase.....</i>	<i>43</i>
<i>Interleucinas.....</i>	<i>44</i>
<i>Análise estatística.....</i>	<i>45</i>

Resultados

<i>Hemodinâmica</i>	47
<i>Morfometria</i>	47
<i>Ecocardiografia</i>	48
<i>Fluxo miocárdico</i>	48
<i>Metaloproteinase</i>	
<i>Expressão</i>	49
<i>Atividade</i>	50
<i>TBARS</i>	51
<i>Mieloperoxidase</i>	52
<i>Interleucinas</i>	52
<i>Determinantes hemodinâmicos da fibrose miocárdica</i>	52
<i>Determinantes hemodinâmicos da função ventricular esquerda</i>	53
<i>Associação entre a fibrose miocárdica com a função ventricular esquerda</i>	54
Discussão	55
<i>Implicação clínica</i>	60
<i>Sumário</i>	61
Conclusões	63
Referências bibliográficas	64

Lista de abreviaturas e siglas

+dP/dt índice da função sistólica do ventrículo esquerdo – velocidade máxima de elevação da pressão ventricular durante a sístole

-dP/dt índice da função diastólica do ventrículo esquerdo – velocidade máxima de diminuição da pressão ventricular durante a diástole

1S semana 1

8S semana 8

°C grau Celsius

> maior

< menor

≤ menor e igual

% porcentagem

ANOVA análise univariada

AE átrio esquerdo

Ao aorta

bat batimento

Cappesq Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

DD diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo

DS diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo

ERP	espessura relativa de parede
FAC	grupo de fístula aorto-cava
FC	freqüência cardíaca
FEn	fração de encurtamento do ventrículo esquerdo
FVC	fração de volume do colágeno
g	grama
G	Gauss
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HE	hematoxilina-eosina
i	inicial
IL-1b	interleucina-1 beta
IL-6	interleucina-6
IL-10	interleucina-10
i.p.	intraperitoneal
Kg	quilograma
L	litro
mg	miligrama
MHz	megahertz
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro

mM	milimolar
mmHg	milímetro de mercúrio
MMP	metaloproteinase
mU	miliunidade
mm	micrômetro
n	número
não SE	região não subendocárdica
nM	nanomolar
NS	não significativo
PAD	pressão arterial diastólica
PAS	pressão arterial sistólica
PC	peso relativo do coração
PDfVE	pressão diastólica final do ventrículo esquerdo
pg	picograma
PP	espessura diastólica da parede posterior
PPC	pressão de perfusão coronariana
PPulso	pressão de pulso
PSVE	pressão sistólica do ventrículo esquerdo
R	coeficiente de correlação de Pearson
rpm	rotação por minuto
s	segundo
SAS	Statistical Analysis System

SDS-PAGE Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SE região subendocárdica

SH grupo de cirurgia fictícia

SIV espessura diastólica do septo interventricular

TBARS ácido tiobarbitúrico

TNF- α fator de necrose tumoral- α

UI unidade internacional

vs. versus

Lista de tabelas

Tabela 1 Resultados da avaliação hemodinâmica inicial (semana 1) e final (semana 8).....78

Tabela 2 Resultados da morfometria cardíaca realizada 8 semanas após a cirurgia.....79

Tabela 3 Resultados da ecocardiografia realizada 8 semanas após a cirurgia.....80

Tabela 4 Resultados da hemodinâmica realizada em 1 semana após a cirurgia para a medida do fluxo miocárdico.....81

Tabela 5 Coeficientes de correlação de Pearson da análise de regressão linear simples entre as medidas hemodinâmicas iniciais determinadas após 1 semana de cirurgia e a fibrose do ventrículo esquerdo determinada após 8 semanas.....82

Tabela 6 Coeficientes de correlação de Pearson da análise de regressão linear simples entre as medidas hemodinâmicas iniciais determinadas após 1 semana de cirurgia e a função do ventrículo esquerdo determinada após 8 semanas.....83

Tabela 7 Coeficientes de correlação de Pearson da análise de regressão linear simples entre a fibrose miocárdica e a função ventricular esquerda determinadas após 8 semanas.....84

Lista de figuras

- Figura 1** Fotomicrografias do tecido miocárdico do ventrículo esquerdo representando as regiões SE e não SE dos dois grupos estudados: FAC e SH.....85
- Figura 2** Fluxo miocárdico das regiões SE e não SE do ventrículo esquerdo dos dois grupos estudados: FAC e SH.....86
- Figura 3** Relações entre a pressão de perfusão coronariana e os fluxos das regiões SE e não SE do ventrículo esquerdo obtidas na semana 1.....87
- Figura 4** Porcentagem de expressão da MMP-2 na região SE e não SE do ventrículo esquerdo de ratos do grupo FAC com PPC ≤ 60 mmHg e >60 mmHg.....88
- Figura 5** Porcentagem de atividade da MMP-2 na região SE e não SE do ventrículo esquerdo de ratos do grupo FAC com PPC ≤ 60 mmHg e >60 mmHg.....89
- Figura 6** Níveis de interleucinas das regiões SE e não SE do ventrículo esquerdo dos grupos FAC e controle.....90
- Figura 7** Relações da pressão de perfusão coronariana inicial determinada em 1 semana de fístula aorto-cava com a fibrose SE e com as funções sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo determinadas em 8 semanas de fístula aorto-cava.....91

Figura 8 Relações da fibrose SE com a função sistólica e diastólica determinadas em 8 semanas de fístula aorto-cava.....92

GUIDO MC. A queda da pressão de perfusão coronariana está associada com remodelamento subendocárdico e disfunção ventricular esquerda na fístula aorto-cava [tese]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2007.

Introdução O papel das alterações hemodinâmicas sobre o remodelamento do ventrículo esquerdo tem sido pouco estudado, especialmente na hipertrofia cardíaca por sobrecarga de volume. A queda da pressão arterial sistêmica e o aumento da pressão de enchimento do ventrículo esquerdo afetam negativamente a pressão de perfusão miocárdica e podem, assim, prejudicar a perfusão subendocárdica, preferencialmente. As conseqüências para o remodelamento do ventrículo esquerdo ainda não foram determinadas. **Objetivos** Os objetivos do presente estudo foram investigar o papel da pressão de perfusão coronariana (PPC) no remodelamento subendocárdico e os possíveis efeitos sobre a função cardíaca em um modelo de fístula aorto-cava. **Métodos** Ratos machos Wistar, pesando 330-350 g, foram submetidos ao modelo de fístula aorto-cava (grupo FAC) ou à cirurgia fictícia – sham (grupo SH). Duas avaliações hemodinâmicas foram realizadas: hemodinâmica inicial, com uma semana de cirurgia e hemodinâmica final,

com oito semanas de cirurgia. Duas regiões do ventrículo esquerdo foram examinadas: a região subendocárdica (SE) e a região não subendocárdica (não SE). O fluxo miocárdico foi determinado com microesferas coloridas na semana 1. A expressão e a atividade de metaloproteinase (MMP), o estresse oxidativo, os níveis de citocinas, a atividade de mieloperoxidase e a fração de volume do colágeno foram determinados na semana 8. A estrutura e a função cardíacas foram avaliadas com ecocardiografia realizada na semana 8.

Resultados Comparado ao grupo SH, FAC apresentou PPC inicial (86 ± 3 mmHg vs. 52 ± 5 mmHg; $P < 0,0001$) e PPC final (86 ± 2 mmHg vs. 54 ± 4 mmHg, $P < 0,0001$) menores e $+dP/dt$ (5917 ± 266 mmHg/s vs. 4511 ± 285 mmHg/s; $P = 0,0021$) e $-dP/dt$ (5639 ± 396 mmHg/s vs. 4343 ± 274 mmHg/s; $P = 0,0121$) finais menores. Também, a fração de encurtamento ($55,8 \pm 1,2\%$ vs. $45,1 \pm 2,1\%$; $P = 0,0014$) e a espessura relativa de parede do ventrículo esquerdo ($0,72 \pm 0,02$ vs. $0,58 \pm 0,03$; $P = 0,0058$) foram menores. Ainda em FAC, o fluxo miocárdico foi menor em SE ($2,7 \pm 0,5$ mL/min/g) comparado a não SE ($4,8 \pm 0,8$ mL/min/g) e também menor comparado a SE ($6,7 \pm 0,4$ mL/min/g) e não SE ($7,5 \pm 0,5$ mL/min/g) de SH. A expressão e a atividade da MMP-2

predominaram em SE de FAC, particularmente nos animais com PPC ≤ 60 mmHg. Aumento dos níveis de IL-1 β e IL-6 foram também predominantes em SE de FAC. Já a atividade da mieloperoxidase e os níveis de TNF- α e IL-10 foram comparáveis entre os grupos. Comparado a SH, FAC apresentou maior fração de volume do colágeno tanto em SE ($1,1 \pm 0,1\%$ vs. $7,7 \pm 0,4\%$; $P < 0,0001$) quanto em não SE ($1,0 \pm 0,1\%$ vs. $4,9 \pm 0,3\%$, $P < 0,0001$). Das variáveis hemodinâmicas, a análise multivariada demonstrou que a PPC inicial foi a única associada de forma independente com a fibrose SE ($R^2 = 0,76$; $P < 0,0001$), com a $+dP/dt$ ($R^2 = 0,55$; $P = 0,0004$) e com a $-dP/dt$ ($R^2 = 0,91$; $P < 0,0001$). Houve correlação da PPC final com a expressão ($R^2 = 0,55$; $P < 0,0001$) e a atividade da MMP-2 ($R^2 = 0,88$; $P < 0,0001$) e da fibrose SE com a $+dP/dt$ ($R^2 = 0,55$; $P = 0,0004$) e com a $-dP/dt$ ($R^2 = 0,85$; $P < 0,0001$). **Conclusão** Na fístula, a diminuição da PPC está associada a dano em SE, representado por isquemia, estresse oxidativo, aumento de citocinas e de MMP-2, com desenvolvimento de fibrose. O remodelamento de SE interfere negativamente na função do ventrículo esquerdo.

Descritores 1. Fibrose subendocárdica 2. Hemodinâmica 3. Interleucinas 4. Metaloproteinase 5. Remodelamento cardíaco.

GUIDO MC. Low coronary driving pressure is associated with subendocardial remodeling and left ventricular dysfunction in aortocaval fistula [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2007.

Introduction The role of hemodynamic changes in left ventricular remodeling has been poorly investigated, especially in the context of volume overload cardiac hypertrophy. Low diastolic blood pressure and high left ventricular filling pressure are expected to negatively affect coronary driving pressure and thereby put in jeopardy subendocardial perfusion, in particular. The consequences to global left ventricular remodeling remain undetermined.

Objectives The aim of this study was to investigate the role of coronary driving pressure (CDP) in the development of subendocardial remodeling and the conceivable effects on cardiac function, using a rat model of aortocaval fistula.

Methods Wistar rats weighting 330-350 g were submitted to aortocaval fistula (ACF group) or sham (SH group) operations. Two hemodynamic measurements were determined following surgery: initial, at week 1; and final, at week 8. Two distinct myocardial layers were examined: the

subendocardium (SE) and the non-subendocardium (non SE). Myocardial blood flow was determined at week 1. Metalloproteinase expression and activity, oxidative stress, cytokine levels, myeloperoxidase activity, and fibrosis deposition were assessed at week 8. Cardiac structure and function were determined by means of echocardiography at week 8. **Results** Compared with SH, ACF showed lower initial (86 ± 3 mmHg vs. 52 ± 5 mmHg; $P < 0.0001$) and final (86 ± 2 mmHg vs. 54 ± 4 mmHg, $P < 0.0001$) CDP and lower final $+dP/dt$ (5917 ± 266 mmHg/s vs. 4511 ± 285 mmHg/s; $P = 0.0021$) and $-dP/dt$ (5639 ± 396 mmHg/s vs. 4343 ± 274 mmHg/s; $P = 0.0121$). Left ventricular fractional shortening ($55.8\pm 1.2\%$ vs. $45.1\pm 2.1\%$; $P = 0.0014$) and relative wall thickness were also lower (0.72 ± 0.02 vs. 0.58 ± 0.03 ; $P = 0.0058$). ACF showed lower myocardial blood flow in SE (2.7 ± 0.5 mL/min/g) as compared with non SE (4.8 ± 0.8 mL/min/g) and as compared with both SE (6.7 ± 0.4 mL/min/g) and non SE (7.5 ± 0.5 mL/min/g) regions in SH. Metalloproteinase-2 expression and activity predominated in SE of ACF animals, particularly in those with CDP ≤ 60 mmHg. Increased levels of IL-6 and IL-1 β also predominated in SE of ACF. Otherwise, myeloperoxidase activity, and TNF- α and IL-

10 levels were similar in both groups. Compared with SH, ACF showed higher collagen volume fraction in SE ($1.1 \pm 0.1\%$ vs. $7.7 \pm 0.4\%$; $P < 0.0001$) and non SE ($1.0 \pm 0.1\%$ vs. $4.9 \pm 0.3\%$, $P < 0.0001$) regions. Multivariate analyses disclosed initial CDP as the only hemodynamic parameter independently associated with SE fibrosis ($R^2 = 0.76$; $P < 0.0001$) and with $+dP/dt$ ($R^2 = 0.55$; $P = 0.0004$) and $-dP/dt$ ($R^2 = 0.91$; $P < 0.0001$). Final CDP correlated with both the expression ($R^2 = 0.55$; $P < 0.0001$) and the activity of metalloproteinase-2 ($R^2 = 0.88$; $P < 0.0001$) and SE fibrosis correlated with both $+dP/dt$ ($R^2 = 0.55$; $P = 0.0004$) and $-dP/dt$ ($R^2 = 0.85$; $P < 0.0001$). **Conclusion** Low coronary driving pressure early in the course of ACF is associated with SE damage characterized by ischemia, oxidative stress, increase in cytokines and MMP-2, the development of fibrosis and by this mechanism interferes negatively in left ventricular function.

Descriptors: 1. Subendocardial fibrosis 2. Hemodynamics 3. Interleukins 4. Matrix metalloproteinases 5. Cardiac remodeling.

Introdução

O remodelamento cardíaco é caracterizado pelo conjunto de alterações da expressão gênica, molecular e celular que se manifestam por alterações do tamanho, forma e função do coração submetido a uma determinada injúria ¹.

Uma das manifestações do remodelamento é a hipertrofia, que se caracteriza pelo o aumento da massa do coração. Há aumento de volume dos miócitos, mas também aumento dos componentes da matriz extracelular, tais como: fibras colágenas, proteoglicanos, glicoproteínas adesivas, fibronectina, metaloproteinases (MMPs) e interleucinas ².

A hipertrofia é um mecanismo de adaptação do coração em resposta a uma sobrecarga de pressão ou de volume ou a uma injúria miocárdica ³. Há duas formas de hipertrofia: concêntrica e excêntrica ⁴. A hipertrofia concêntrica ocorre em resposta à sobrecarga de pressão. Há aumento da massa ventricular com aumento da espessura da parede e redução da cavidade, em decorrência da replicação em paralelo dos sarcômeros ^{5,6}. Exemplos de patologias associadas à hipertrofia concêntrica são: a coarctação da aorta ^{7,8}, a estenose da válvula aórtica ^{9,10} e a hipertensão arterial ^{11,12}.

A hipertrofia excêntrica ocorre em resposta à sobrecarga de volume. O aumento da massa ventricular acompanha o aumento do volume da cavidade e se dá por uma replicação em série dos sarcômeros ^{5,13}. Exemplos de patologias associadas à hipertrofia excêntrica são: a regurgitação da valva aórtica ^{14,15} e da valva mitral ^{16,17} e a fístula arteriovenosa ^{18,19}.

Uma das principais características da hipertrofia é o aumento da deposição de fibras colágenas da matriz extracelular ²⁰ que se dá de duas formas. A forma reativa corresponde à fibrose intersticial e a reparativa à fibrose cicatricial. A fibrose intersticial é caracterizada pelo aumento das fibras colágenas entre os espaços intramusculares. Já a fibrose reparativa é caracterizada pela substituição da perda de miócitos necrosados por fibras colágenas ^{21,22}.

Na sobrecarga de pressão, a hipertrofia concêntrica e a fibrose intersticial são predominantemente associadas à disfunção diastólica ²³. No modelo de coarctação de aorta em ratos, a hipertrofia acompanha-se de fibrose intersticial e associa-se a disfunção ventricular diastólica ²⁴. No modelo de hipertensão renovascular em ratos, tanto a fibrose intersticial, quanto a disfunção diastólica, são prevenidas por inibidores da enzima conversora de angiotensina ²⁵.

Na hipertrofia por sobrecarga de volume, a dilatação das câmaras cardíacas e a alteração da matriz extracelular estão associadas com a disfunção sistólica ventricular ²⁶. No modelo de infarto do miocárdio em ratos, há fibrose intersticial no miocárdio remoto associada à disfunção sistólica ²⁷. No modelo de insuficiência aórtica em ratos, o excesso de fibronectina e a disfunção sistólica foram prevenidos por inibidores da enzima conversora de angiotensina ¹⁵.

Na fístula aorto-cava, a existência de aumento de fibras colágenas no interstício é controversa. Alguns trabalhos indicam que não há fibrose ^{28,29,30}. Porém, outros, reportam a existência de fibrose intersticial, principalmente em corações dilatados, hipertrofiados e com disfunção ^{31,32,33}.

Além da fibrose intersticial, a hipertrofia cardíaca pode acompanhar-se de aumento de fibras colágenas na região subendocárdica do ventrículo esquerdo. A presença de fibrose subendocárdica foi descrita no remodelamento miocárdico de animais com coarctação de aorta ³⁴, com regurgitação da valva aórtica e com infarto do miocárdio ³⁵. O mecanismo etiopatogênico desta fibrose subendocárdica tem sido pouco estudado. O aspecto histológico observado é de nichos isolados com acúmulo de fibras colágenas de extensão variada e é compatível com a fibrose

reparativa ²².

Entre as diversas alterações hemodinâmicas que ocorrem no período imediato após o infarto, observamos que a pressão de perfusão coronariana (PPC) foi a que melhor explicava o desenvolvimento subsequente da fibrose subendocárdica no miocárdio remoto ³⁵.

Na fístula aorto-cava, observamos o aparecimento de fibrose na região subendocárdica do ventrículo esquerdo. Neste modelo, entre as alterações hemodinâmicas observadas, a diminuição da pressão arterial diastólica concorre para a queda da PPC. De fato, tal como no infarto, o remodelamento cardíaco em resposta à fístula aorto-cava foi acompanhado de fibrose subendocárdica e esta atribuída à queda da PPC ³⁶. Assim, neste modelo, uma redução preferencial do fluxo no subendocárdio é esperada, mas ainda não foi investigada.

Em aparente contradição com o aumento de fibras colágenas intersticiais e possivelmente subendocárdicas, a disfunção ventricular na fístula aorto-cava acompanha-se de ativação de MMPs ^{37,38,39}. As MMPs são proteases presentes na matriz extracelular com capacidade de quebrar seus componentes, principalmente o colágeno ⁴⁰. Já foram descritos mais de 20 diferentes tipos de MMPs nos mamíferos. Elas foram classificadas

em seis grupos: collagenases (MMP-1, 8 e 13), gelatinases (MMP-2 e 9), estromelisinases (MMP-3, 10 e 11), matrilisinas (MMP-7), metaloelastases (MMP-12) e MMPs de membranas (MMP-14, principalmente) ⁴⁰. Várias MMPs podem degradar um mesmo substrato. Os proteoglicanos, as fibronectinas e as lamininas são degradadas por matrilisinas, estromelisinases e MMPs de membranas. As fibras colágenas são degradadas tanto por collagenases, quanto por gelatinases ⁴¹. As gelatinases exercem o papel de degradação final das duas porções restantes após a ação das collagenases ^{42,43}.

Inúmeros estímulos favorecem a ativação das MMPs: o estresse mecânico, a isquemia miocárdica, o processo inflamatório, o estresse oxidativo, diversos fatores de transcrição, componentes do sistema simpático e do sistema renina angiotensina ⁴⁴. O estresse mecânico sobre cardiomiócitos de ratos neonatais promove aumento da expressão e da atividade das MMP-2 e MMP-14, que pode ser prevenido pelo tratamento com um inibidor da enzima conversora de angiotensina ⁴⁵. Cardiomiócitos isolados, quando submetidos a isquemia com reperfusão, apresentam aumento da troponina I e ativação da MMP-2 ⁴⁶. Na sepse, o aumento de óxido nítrico e de prostaglandinas contribui para inflamação e para a ativação da MMP-9 ⁴⁷. Neutrófilos, macrófagos ⁴⁸, mastócitos ³⁸ e as interleucinas, TNF- α e IL-1 β ⁴⁹, já foram

associados à ativação de diversas MMPs em diferentes modelos experimentais. Na fístula aorto-cava, observou-se que o aumento do estresse oxidativo miocárdico foi relacionado à ativação da MMP-2⁵⁰.

É possível que na fístula aorto-cava haja ativação distinta de MMPs no subendocárdio em relação ao restante do ventrículo esquerdo em decorrência do aumento de estresse oxidativo e da resposta inflamatória preferencial nesta região. Nossa hipótese é que a fibrose subendocárdica represente um processo reparativo à injúria crônica desta região promovida por um estado isquêmico persistente. Por outra, o remodelamento subendocárdico pode potencialmente interferir na capacidade de adaptação funcional do miocárdio hipertrofiado.

Objetivos

Os objetivos do presente estudo são:

1. Examinar o fluxo miocárdico, a presença de estresse oxidativo, o processo inflamatório, a expressão e a atividade de MMPs e o desenvolvimento de fibrose em duas regiões distintas do ventrículo esquerdo, o subendocárdio (SE) e o não subendocárdio (não SE).
2. Investigar a possível associação da PPC com o fluxo miocárdico e o desenvolvimento de fibrose nestas duas regiões.
3. Investigar a possível associação da PPC com a capacidade de adaptação funcional do ventrículo esquerdo.
4. Investigar a possível associação entre o dano subendocárdico e o desenvolvimento de disfunção ventricular.

Materiais e métodos

Modelo Biológico

Este estudo foi realizado de acordo com as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e pelo The Universities Federation for Animal Welfare e o protocolo experimental foi aprovado pela Cappesq-HCFMUSP (nº 1020/03).

Ratos machos Wistar, pesando entre 330-350 g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo foram utilizados. Os animais foram divididos em 2 grupos, um submetido à cirurgia de fístula aorto-cava e outro submetido à cirurgia fictícia – sham.

Os seguintes grupos experimentais foram constituídos:

1. 18 animais submetidos a fístula aorto-cava (FAC) e 11 animais submetidos a cirurgia sham (SH) realizaram as seguintes avaliações hemodinâmicas: inicial, realizada uma semana após a cirurgia, e final, realizada 8 semanas após a cirurgia, que foram complementadas por estudo morfométrico.
2. 12 animais submetidos a fístula aorto-cava e 10 animais submetidos a cirurgia fictícia realizaram estudo ecocardiográfico 8 semanas após a cirurgia.
3. 11 animais submetidos a fístula aorto-cava e 7 animais

submetidos a cirurgia sham realizaram estudo do fluxo miocárdico 8 semanas após a cirurgia.

Nos seguintes experimentos, a mediana dos valores da PPC inicial obtidos no experimento 1 foi utilizada para as comparações:

4. 4 animais com fístula aorto-cava e PPC final ≤ 60 mmHg e 4 animais com fístula aorto-cava e PPC de >60 mmHg foram utilizados para o estudo da expressão e atividade de MMPs 8 semanas após a cirurgia. Os resultados foram normalizados em relação ao coração de um animal controle não submetido à cirurgia.

5. 10 animais com fístula aorto-cava e PPC final ≤ 60 mmHg e 10 animais submetidos a cirurgia sham foram utilizados para o estudo do estresse oxidativo 8 semanas após a cirurgia.

6. 4 animais com fístula aorto-cava e PPC final ≤ 60 mmHg e 6 animais controles não submetidos a cirurgia foram utilizados para o estudo da atividade de mieloperoxidase e dos níveis de interleucinas 8 semanas após a cirurgia.

Modelo Experimental de Fístula Aorto-Cava

O modelo de FAC em ratos correspondeu a uma modificação da técnica descrita por Garcia e Diebold ⁵¹. Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 10% (300 mg/Kg i.p.) ⁵² e

submetidos a laporotomia mediana. Os intestinos foram afastados e a aorta abdominal e a veia cava isoladas. Abaixo da emergência das artérias renais foram inseridos dois *clamps* vasculares de modo a interromper a circulação sangüínea. Uma agulha, jelco 18G, foi inserida na aorta e cuidadosamente avançada até a parede posterior onde realizaram-se de 4 a 5 perfurações em direção a veia cava. Após a remoção da agulha, a hemostasia foi realizada com administração de cianoacrilato sobre o orifício aórtico. A eficiência da fístula foi verificada pela passagem de sangue arterial em direção à cava com o ingurgitamento desta. Os intestinos foram reposicionados e a cavidade abdominal lavada com solução fisiológica com temperatura de 37°C.

A sutura da parede abdominal foi realizada com fio de algodão 3.0 e os animais recolocados em suas gaiolas após a recuperação plena do anestésico.

Os animais foram examinados diariamente e a patência da fístula verificada com auxílio de um estetoscópio infantil.

A mortalidade até 48 horas foi de 8% e durante o seguimento de oito semanas foi de 54%.

Hemodinâmica

As avaliações hemodinâmicas foram realizadas sob anestesia

com hidrato de cloral 10% (300 mg/Kg) intraperitoneal.

Para a medida das pressões sistêmicas, foi realizada a canulação da artéria femural esquerda com um cateter de policloreto de vinila (0,01 mm de diâmetro), preenchido com solução heparinizada (0,1 mL, 100 UI, Roche), avançado até a aorta abdominal. O cateter foi acoplado a um transdutor de pressão para identificação da curva de pressão arterial sistêmica.

Para a medida das pressões do ventrículo esquerdo, foi realizada a canulação da artéria carótida direita, logo após a bifurcação, ocluindo-se o outro ramo temporariamente. Tal procedimento visou preservar a artéria carótida comum para a avaliação hemodinâmica final. Um cateter de policloreto de vinila (0,05 mm de diâmetro), também preenchido com solução fisiológica heparinizada, foi introduzido até o ventrículo esquerdo e acoplado ao transdutor de pressão para identificação e registro das curvas hemodinâmicas ventriculares.

Os transdutores de pressão foram acoplados a um pré-amplificador calibrado (General Purpose Amplifier 4 – modelo 2, Stemtech Inc., Wiscowsin, EUA) e a um sistema computadorizado de aquisição (Windaq/Dataq, Dataq Instruments Inc., Akron, Ohio, EUA). As avaliações hemodinâmicas sistêmicas e ventriculares foram registradas, simultaneamente, batimento a batimento.

Em seguida, os animais foram entubados oro-traquealmente com Jelco 14G e submetidos à ventilação mecânica (Rodent Ventilator, modelo 683, Harvard, EUA) com frequência de 60 ciclos/min e volume corrente de 10 mL/Kg.

Registros hemodinâmicos de 10 minutos de duração foram computados após a estabilização das curvas.

Os seguintes parâmetros foram determinados: pressão arterial sistólica (PAS, mmHg), pressão arterial diastólica (PAD, mmHg), pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE, mmHg), pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDfVE, mmHg), velocidade máxima de elevação da pressão ventricular durante a sístole ($+dP/dt$, mmHg/s) e velocidade máxima de diminuição da pressão ventricular durante a diástole ($-dP/dt$, mmHg/s).

A $+dP/dt$ foi utilizada como índice de função sistólica e a $-dP/dt$ foi utilizada como índice de função diastólica do ventrículo esquerdo.

A pressão de pulso (PPulso, mmHg) foi calculada pela diferença entre a PAS e a PAD.

A PPC (mmHg) foi calculada pela diferença entre PAD e a PDfVE⁵³.

Morfometria

Após a avaliação hemodinâmica final, os animais foram sacrificados com cloreto de cádmio (3 mL, 100 mM, Sigma). Em seguida, os corações foram perfundidos com solução fisiológica e fixados com solução tamponada de formol 10%, sob pressão de perfusão correspondente à PAD anterior à eutanásia.

Os corações foram removidos, limpos e pesados. O peso do coração foi normalizado pelo peso corpóreo final dos animais para obtenção do peso relativo (g/Kg).

Uma fatia transversal do miocárdio na porção equatorial dos ventrículos foi processada em parafina e dela obtidos os cortes histológicos. A porção equatorial dos ventrículos foi processada em parafina e cortes coronais de 5 µm de espessura realizados.

As medidas morfométricas foram realizadas utilizando-se um sistema computadorizado de imagens (Leica Q500 iW e Leica DMLS, Leica Imaging Systems Ltd,. Cambridge, UK).

Para a avaliação da hipertrofia cardíaca, foram utilizados cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina (HE), sob aumento de 1000x. A hipertrofia foi medida pelo diâmetro dos miócitos em torno do núcleo (µm). Foram selecionados apenas miócitos da parede do ventrículo esquerdo com disposição longitudinal e núcleos ovalados e centralizados.

Para a avaliação da fibrose miocárdica foram utilizados cortes histológicos corados com *Sirius red*, sob aumento de 580x. A fibrose foi estimada pela fração de volume do colágeno (FVC, %), calculada pela razão percentual entre a área de tecido corado positivamente para colágeno, em vermelho, e a área total do miocárdio.

Para estas análises morfométricas, 20 campos da região SE e outros 20 campos da região não SE foram examinados.

Ecocardiografia

Ao final de 8 semanas, os animais realizaram estudo ecocardiográfico sob anestesia com hidrato de cloral 10% (300 mg/Kg i.p., Merck). Foi utilizado o aparelho modelo HDI-1500 Philips com transdutor de 4 a 7 MHz. As medidas foram realizadas em modo M, a partir de traçados bidimensionais, conforme as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia ⁵⁴. Os seguintes parâmetros foram determinados: aorta (mm) e átrio esquerdo (mm), diâmetros diastólico (DD, mm) e sistólico (DS, mm) do ventrículo esquerdo, espessuras diastólicas da parede posterior (PP, mm) e do septo interventricular (SIV, mm). A média de 3 medidas foi calculada para cada parâmetro examinado.

A espessura relativa de parede (ERP) foi calculada utilizando-

se a seguinte fórmula:

$$ERP = 2 \times (PP + SIV) / DD$$

A fração de encurtamento do ventrículo esquerdo (FEn, %) foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$FEn\% = [(DD - DS) / DD] \times 100$$

Fluxo miocárdico

Ao final da semana 1, foram realizadas as medidas do fluxo miocárdico pelo método de microesferas coloridas ⁵⁵.

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 10% intraperitoneal (300 mg/Kg) e realizada canulação da artéria femoral esquerda com cateter de policloreto de vinila (0,01 mm de diâmetro), preenchido com solução heparinizada (0,1 mL, 100 UI, Roche), avançado até a aorta abdominal para coleta do sangue de referência. A artéria carótida direita foi canulada com um cateter de policloreto de vinila (0,05 mm de diâmetro), também preenchido com solução fisiológica heparinizada, introduzido até o ventrículo esquerdo para a infusão das microesferas amarelas com diâmetro de 15 µm (Dye-Trak CM; Triton Technology, EUA). A suspensão original de microesferas foi sonicada por 5 minutos e

diluída em solução fisiológica contendo Tween 0,01% para obtenção de uma concentração final de 300.000 microesferas. Esta solução foi sonicada por 1 minuto. Uma das extremidades de um tubo de polietileno, preenchido com 180 μ L da solução final, foi conectada ao cateter ventricular esquerdo e a outra extremidade conectada a uma seringa contendo 0,5 mL de solução fisiológica pré-aquecida a 37°C. Esta seringa foi conectada a uma bomba de infusão (Harvard Apparatus, modelo 55-1111, EUA). Uma bomba de aspiração (Harvard Apparatus, modelo 901, EUA) foi conectada ao cateter da artéria femoral com uma seringa pré-heparinizada para coleta da amostra do sangue de referência. A coleta desta amostra iniciou-se 10 segundos antes do início da infusão das microesferas e continuou por 75 segundos a uma velocidade de 0,36 mL/min. O infusato de microesferas e a solução fisiológica pré-aquecida foram infundidos por 50 segundos a uma velocidade de 0,5 mL/min.

Após a infusão, o coração e os rins foram retirados e pesados. O coração foi separado em regiões SE e não SE. Os rins foram utilizados como padrão de adequação da perfusão tecidual das microesferas. Os resultados de 2 animais em que se observou diferença de fluxo entre os rins maior que 30% foram descartados.

As regiões SE e não SE, os rins e a amostra de sangue de

referência foram processados conforme descrito por Hakkinen e col.⁵⁶ com pequenas modificações.

Os reagentes utilizados para digestão dos tecidos e do sangue foram:

Reagente I – solução de Triton X-100 a 10%

A solução de Triton X-100 10% foi preparada com 12,12 g de Tris-base, 0,2 g de azida sódica, 200 mL de Triton X-100 e 1.800 mL de água destilada sob agitação e aquecimento a 50°C. Em seguida, ajustou-se o pH para 8,5.

Reagente II – Ácido deoxicólico sódico

A solução de ácido deoxicólico sódico foi preparada com 6,06 g de Tris-base, 0,5 mL de Tween 80, 0,10 g de azida sódica, 20,73 g de ácido deoxicólico sódico em 1L de água destilada sob agitação e aquecimento a 50°C. Em seguida, ajustou-se o pH para 8,5.

Reagente de hemólise

A preparação desta solução foi realizada adicionando, sob agitação, 200 mL de etanol absoluto em 1L de solução Triton-X 100 10% (reagente I).

No tubo falcon contendo o sangue, foi adicionado 4 mL do reagente de hemólise, que foi centrifugado a 4.000 rpm por 30 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e adicionado 4 mL de NaOH 2M. Nos tubos contendo os órgãos,

também foi adicionado 4 mL de NaOH 2M. Todos os tubos foram aquecidos a 70°C, homogeneizados a cada 30 minutos e deixados durante uma noite em temperatura ambiente.

No dia seguinte, os tubos foram novamente aquecidos a 70°C para dissolução completa dos órgãos. Adicionou-se 9 mL do reagente I a todos os tubos para homogeneização e centrifugação a 4.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi desprezado e foi adicionado 10 mL do reagente II. Os tubos foram homogeneizados usando o *vortex* e aquecidos a 70°C durante mais uma noite. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm por 30 minutos e o sobrenadante aspirado e desprezado. Adicionou-se 1,9 mL de álcool absoluto gelado em todos os tubos, que foram novamente homogeneizados e as amostras centrifugadas a 4.000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi novamente aspirado e desprezado. Os tubos contendo o precipitado de microesferas foram deixados em estufa a 60°C durante mais uma noite para evaporar o álcool residual. Foram adicionados 300 µL de dimetilformamida em todos os tubos para homogeneização e centrifugação a 4.000 rpm por 10 minutos.

A leitura do sobrenadante foi realizada em espectrofotômetro (Hitachi, modelo U-1100, Japão) a 448 nm usando cubeta de quartzo, com largura de banda <1,8nm.

Para a determinação dos fluxos miocárdico e renal, o fluxo sanguíneo total de cada animal foi calculado, inicialmente. Utilizou-se a fórmula seguinte:

$$\text{Fluxo sanguíneo total (mL/min)} = (\text{peso do sangue (g)} / \text{densidade específica do sangue (g/mL)}) / (\text{volume do sangue (mL)} / \text{velocidade de retirada do sangue (mL/min)})$$

onde, a densidade específica do sangue é igual a 1,05 g/mL e a velocidade de retirada do sangue é igual a 0,5 mL/min.

Para o cálculo do fluxo sanguíneo da região SE, utilizou-se a fórmula seguinte:

$$\text{Fluxo SE (mL/min/g)} = [(\text{absorbância do tecido}) \times (\text{fluxo sanguíneo total (mL/min)}) / (\text{absorbância do sangue})] / \text{peso SE (g)}$$

Para o cálculo do fluxo sanguíneo da região não SE utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Fluxo não SE (mL/min/g)} = [(\text{absorbância do tecido}) \times (\text{fluxo sanguíneo total (mL/min)}) / (\text{absorbância do sangue})] / \text{peso não SE (g)}$$

Para o cálculo do fluxo renal utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Fluxo renal (mL/min/g)} = [(\text{absorbância do tecido}) \times (\text{fluxo sangüíneo total (mL/min)}) / (\text{absorbância do sangue})] / \text{peso renal (g)}$$

Metaloproteinases, TBARS, mieloperoxidase e interleucinas

Ao final de 8 semanas, os animais foram sacrificados e o coração foi rapidamente removido. Um corte coronal correspondente a porção medial do ventrículo esquerdo foi obtido no plano equatorial e dividido em regiões: SE e não SE. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido.

Metaloproteinases

Para o estudo das MMPs as amostras das duas regiões do ventrículo esquerdo (100 mg para cada 1 mL de tampão) foram lisadas em tampão RIPA gelado (Triton X-100 1%, ácido deoxicólico 0,5%, SDS 0,1%, Tris HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Na₂HPO₄ 2 mM e NaF 20 mM) sob agitação por uma hora a 4°C. Os extratos foram centrifugados a 10.000 *g*, por 15 minutos, a 4°C. As amostras foram aliquotadas e estocadas a -80°C. A concentração proteica foi medida pelo método de Bradford

(BioRad).

Expressão

O estudo da expressão das MMPs foi realizado pelo método de *Western Blot* nas regiões SE e não SE do ventrículo esquerdo. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE (10% de acrilamida) e transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com os anticorpos primários policlonais IgG de coelho anti-MMP-2 e anti-MMP-9 (ambos: diluição 1:1000; Santa Cruz Biotechnology, USA) por 12 horas. A seguir, procedeu-se à incubação com o anticorpo secundário de cabra anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (diluição 1:1000; Santa Cruz Biotechnology, USA).

A detecção foi realizada por quimioluminescência com o reagente ECL (Amersham Biosciences, USA) e a intensidade das bandas de MMPs foi quantificada por densitometria. Todos os resultados foram normalizados percentualmente em relação aos extratos das regiões do SE e não SE de um animal controle não submetido a cirurgia ³⁸.

Atividade

A atividade das MMPs foi avaliada pelo método da zimografia

nas regiões SE e não SE do ventrículo esquerdo. Quantidades iguais de proteína das amostras de cada extrato tecidual foram adicionadas de tampão Laemmli não redutor e realizou-se a eletroforese (SDS-PAGE) em condições não denaturnantes em gel contendo acrilamida 10% e 1 mg/mL de gelatina. A seguir, os géis foram lavados por 1 hora em Triton X-100 2% para remover o SDS e permitir a renaturação enzimática. Os géis foram incubados em tampão de revelação (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 200 mM, CaCl₂ 5 mM e NaN₃ 0,02%) por 18 horas a 37°C, para a ativação enzimática. Após este período, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue 0,1% e a atividade das MMPs visualizadas pela digestão da gelatina, que se manifesta na forma de bandas não coradas contra o fundo azul. Estas bandas foram quantificadas por densitometria usando-se o programa ImageQuant Molecular Dynamics. Os resultados foram normalizados percentualmente em relação aos extratos das regiões do SE e não SE de um animal controle não submetido a cirurgia ³⁸.

TBARS

Para o estudo das espécies reativas de oxigênio utilizou-se o método do ácido tiobarbitúrico (TBARS), que quantifica a peroxidação lipídica tecidual. As regiões SE e não SE do ventrículo

esquerdo (100 mg de tecido para cada 1 mL de tampão) foram homogeneizadas em solução de KCl 1,15% e centrifugadas a 14.000 *g*, por 10 minutos, a 4°C. A 200 µL do homogenato, foram adicionados 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico 0,8%, 200 µL de dodecilsulfato de sódio (SDS) 8,1%, 1,5 mL de ácido acético 20% (pH 3,5), todos diluídos em 600 mL de água destilada a 90°C por uma hora. Após resfriamento em temperatura ambiente, a solução foi centrifugada (10.000 *g* por 10 minutos).

A reação foi quantificada por espectrofotometria com leitura de absorbância em 532 nm a 37°C, usando um leitor de microplacas. A curva padrão foi realizada através das diluições séricas com 1,1,3,3-tetrametoxipropano ⁵⁷. As medidas proteicas foram realizadas pelo método de Bradford (Bio-Rad) e os resultados expressos em nM/mg de proteínas .

Mieloperoxidase

Para o estudo do índice de infiltração tecidual de neutrófilos, mediu-se a atividade da mieloperoxidase nas regiões SE e não SE do ventrículo esquerdo. Os tecidos (50 mg de tecido para cada 1 mL de tampão) foram homogeneizados em brometo de hexa-decil-trimetilamônio 0,5% e ácido 3-N-morfolinopropanosulfônico 10 mM. O homogenato foi centrifugado a 15.000 *g*, por 40 minutos, a

4°C. Uma alíquota do sobrenadante foi misturada em solução de tetrametilbenzidina 16 mM e peróxido de hidrogênio 1 mM. A atividade da solução foi quantificada por espectrofotometria com leitura da absorbância em 650 nm a 37°C, usando um leitor de microplacas ⁵⁸. As medidas proteicas foram realizadas pelo método de Bradford (Bio-Rad) e os resultados foram expressos em mU/mg de proteínas.

Interleucinas

Para a quantificação das interleucinas, as amostras das regiões SE e não SE do ventrículo esquerdo (100 mg para cada 1 mL de tampão) foram lisadas em tampão RIPA gelado (Triton X-100 1%, ácido deoxicólico 0,5%, SDS 0,1%, Tris HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Na₂HPO₄ 2 mM e NaF 20 mM) sob agitação por uma hora a 4°C. Os extratos foram centrifugados a 10.000 *g*, por 15 minutos, a 4°C. As amostras foram aliquotadas e estocadas a -80°C. A concentração proteica foi medida pelo método de Bradford (BioRad).

A quantificação das interleucinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 foi determinada por ELISA, através do método de anticorpo de captura, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (BioSource).

Análise estatística

Os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão. O tipo de distribuição das variáveis e a hipótese de igualdade das variâncias foram testadas em todos os casos.

O teste *t* de Student não pareado e o teste de Mann Whitney foram utilizados, quando apropriados, para a comparação dos dados morfométricos e ecocardiográficos entre os grupos.

A análise de variância para medidas repetidas foi utilizada para o restante das análises estatísticas, que incluíram os dados da hemodinâmica, da quantificação da fibrose, do fluxo miocárdico, de TBARS, mieloperoxidase, interleucinas e MMPs. O método de Bonferroni foi utilizado para a realização de comparações múltiplas.

A regressão linear foi utilizada para testar as possíveis associações das variáveis da hemodinâmica inicial, determinada na semana 1, com a fibrose e a função do ventrículo esquerdo determinadas na semana 8. A regressão linear múltipla *Forward Stepwise* foi realizada para identificar, entre as variáveis da hemodinâmica inicial, aquela(s) associada(s) de forma independente com a fibrose e a função do ventrículo esquerdo em 8 semanas. A regressão linear também foi utilizada para testar as associações da PPC com o fluxo miocárdico e da fibrose com a função ventricular.

O nível de significância estatística foi estabelecido pelo valor de $P < 0,05$. Todas as análises foram realizadas pelo programa Software Sigma Stat Statistical (versão 1) e SAS (Statistical Analysis System, versão 8.0).

Resultados

Hemodinâmica

Os resultados das avaliações hemodinâmicas inicial e final estão descritos na tabela 1. Em comparação com SH, a pressão de pulso inicial e a pressão de pulso final foram 30% maiores, enquanto que a PPC inicial e a PPC final foram 35% menores em FAC. As pressões sistólicas do ventrículo esquerdo, inicial e final, foram 10% menores e as pressões diastólicas finais do ventrículo esquerdo, inicial e final, foram três vezes maiores em FAC. Não houve diferença significativa da $+dP/dt$ e da $-dP/dt$ iniciais entre FAC e SH, mas a $+dP/dt$ e a $-dP/dt$ finais foram 23% menores em FAC. As pressões sistêmicas sistólica e diastólica, iniciais e finais, foram 13% e 24% menores na FAC, respectivamente. Os valores de frequência cardíaca não foram diferentes entre os dois grupos.

Morfometria

As medidas morfométricas estão descritas na tabela 2. Onze dos 18 ratos estudados exibiram sinais de falência cardíaca, representados por derrame pleural e ascite. Comparados com SH, os animais do grupo FAC apresentaram maiores peso relativo do coração e diâmetro dos miócitos. A fibrose em FAC foi

predominantemente maior na região SE (sete vezes), mas também foi maior na região não SE (cinco vezes) do ventrículo esquerdo.

A figura 1 ilustra exemplos representativos da fibrose das regiões SE e não SE de um animal do grupo FAC comparado a um animal do grupo SH.

Ecocardiografia

Comparados a SH, as dimensões da aorta e do átrio esquerdo foram significativamente maiores em FAC. Embora as espessuras de septo interventricular e da parede posterior do ventrículo esquerdo fossem comparáveis entre os grupos, as dimensões da cavidade do ventrículo esquerdo foram maiores em FAC. Estes resultados indicam desadaptação da hipertrofia em FAC o que é corroborado pela menor espessura relativa da parede. De fato, a função sistólica do ventrículo esquerdo, avaliada pela fração de encurtamento, foi 20% menor em FAC (tabela 3).

Fluxo miocárdico

Os resultados da avaliação hemodinâmica realizada nos animais submetidos ao estudo do fluxo miocárdico estão apresentados na tabela 4. Em comparação com SH, a pressão de pulso foi 30% maior, enquanto a PPC foi 66% menor em FAC. A

pressão sistólica do ventrículo esquerdo foi 23% menor e a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo foi três vezes maior. A $+dP/dt$ foi 39% menor e a $-dP/dt$ foi 44% menor. As pressões sistêmicas, sistólica e diastólica, foram 28% e 47% menores em FAC, respectivamente. A frequência cardíaca não foi diferente entre os dois grupos.

O grupo FAC apresentou menor fluxo na região SE quando comparado ao fluxo da região não SE e às duas regiões miocárdicas do grupo SH (figura 2). Apesar da tendência observada de menor fluxo renal em FAC, o fluxo do rim direito (FAC = $1,9 \pm 0,5$ vs. SH = $2,6 \pm 0,4$) e o fluxo do rim esquerdo (FAC = $1,8 \pm 0,3$ vs. SH = $2,7 \pm 0,4$) não foram estatisticamente diferentes quando comparados entre os 2 grupos. Já o fluxo renal global foi diferente estatisticamente entre os grupos (FAC = $1,7 \pm 0,2$ vs. SH = $2,6 \pm 0$).

No grupo FAC, houve correlação positiva da PPC com o fluxo da região SE ($R = 0,65$; $R^2 = 0,42$; $P = 0,032$; $PPC = 20,8 + [3,16 \times \text{fluxo SE}]$) e com o fluxo da região não SE ($R = 0,62$; $R^2 = 0,38$; $P = 0,044$; $PPC = 20,6 + [1,81 \times \text{fluxo não SE}]$). A figura 3 representa graficamente estas relações.

Metaloproteinases

Expressão

A expressão da MMP-2 foi determinada nas regiões SE e não SE do ventrículo esquerdo de ratos do grupo FAC com PPC ≤ 60 mmHg e >60 mmHg (40 ± 7 mmHg e 75 ± 3 mmHg, respectivamente). Os resultados estão representados na figura 4. A expressão de MMP-2 foi maior nos animais com PPC ≤ 60 mmHg. Nestes animais, a expressão de MMP-2 foi quatro vezes maior na região SE do que na região não SE. A expressão de MMP-2 na região SE dos animais com PPC ≤ 60 mmHg foi ainda 3 e 10 vezes maior quando comparada às regiões SE e não SE dos animais com PPC >60 mmHg, respectivamente.

Houve correlação inversa entre a PPC e a expressão de MMP-2 ($R = -0,74$; $R^2 = 0,55$; $P < 0,0001$; $PPC = 81,7 - [0,606 \times \text{MMP-2}]$).

Nenhuma expressão da MMP-9 foi detectável nos animais com fístula aorto-cava, independentemente da magnitude da PPC.

Atividade

A atividade da MMP-2 foi determinada na região SE e na região não SE do ventrículo esquerdo de ratos do grupo FAC com PPC ≤ 60 mmHg e >60 mmHg (40 ± 7 mmHg e 75 ± 3 mmHg,

respectivamente). Os resultados estão representados na figura 5. A atividade de MMP-2 foi maior nos ratos com PPC ≤ 60 mmHg. Nestes animais, a atividade de MMP-2 na região SE foi cerca de 70% maior do que na região não SE. A atividade de MMP-2 na região SE dos animais com PPC ≤ 60 mmHg foi ainda 70% e 83% maior do que nas regiões SE e não SE dos animais com PPC > 60 mmHg, respectivamente.

Houve correlação inversa entre a PPC e a atividade de MMP-2 ($R = -0,94$; $R^2 = 0,88$; $P < 0,0001$; $PPC = 87,5 - [0,469 \times \text{MMP-2}]$).

Nenhuma atividade da MMP-9 foi detectável nos animais com fístula aorto-cava, independentemente da magnitude da PPC.

TBARS

Os ratos do grupo FAC com PPC ≤ 60 mmHg (32 ± 4 mmHg), apresentaram um aumento significativo de TBARS na região SE (63 ± 2 nM/mg de proteínas) comparado à região não SE (57 ± 1 nM/mg de proteínas) e comparado às regiões SE (55 ± 1 nM/mg de proteínas) e não SE (56 ± 1 nM/mg de proteínas) de SH (PPC = 90 ± 2 mmHg).

Mieloperoxidase

A PPC do grupo FAC submetido ao estudo da atividade miocárdica de mieloperoxidase foi 40 ± 7 mmHg. A atividade de mieloperoxidase do grupo FAC foi comparável aos controles, tanto na região SE (FAC = 220 ± 38 e controles = 312 ± 62 um/mg de proteínas, respectivamente) quanto na região não SE (FAC = 269 ± 16 e controles = 367 ± 50 um/mg de proteínas, respectivamente).

Interleucinas

A PPC do grupo FAC submetido ao estudo das interleucinas miocárdicas foi 40 ± 7 mmHg. Neste grupo, os níveis de TNF- α e de IL-10 não foram estatisticamente diferentes dos controles em nenhuma das duas regiões examinadas (figura 3). Por outra, em FAC houve níveis maiores de IL-1 β e IL-6 na região SE comparados à região não SE e comparados às duas regiões, SE e não SE, dos controles (figura 6).

Determinantes hemodinâmicos da fibrose miocárdica

A hemodinâmica inicial foi utilizada para investigar a possível associação com o desenvolvimento de fibrose tardia na fístula aorto-cava. As pressões sistêmicas sistólica e diastólica, e a PPC,

apresentaram correlações inversas com a fração de volume do colágeno na região SE e com a fração de volume do colágeno na região não SE, determinadas na oitava semana. A pressão de pulso, a pressão sistólica do ventrículo esquerdo e a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo não apresentaram correlações significativas com a fração de volume do colágeno em nenhuma das 2 regiões examinadas (tabela 5).

A PPC foi a única variável da hemodinâmica inicial a explicar de modo independente o desenvolvimento de fibrose na região SE (parâmetro estimado = -0,08; intervalo de confiança, 95% = -0,10 a -0,05; $P < 0,0001$). A pressão arterial sistólica foi a única variável da hemodinâmica inicial a explicar de modo independente a fibrose na região não SE (parâmetro estimado = -0,043; intervalo de confiança, 95% = -0,07 a -0,01; $P = 0,008$).

Determinantes hemodinâmicos da função ventricular esquerda

A hemodinâmica inicial foi utilizada para investigar a possível associação com o desenvolvimento de disfunção tardia do ventrículo esquerdo na fístula aorto-cava. As pressões sistêmicas sistólica e diastólica, e a PPC, apresentaram correlações positivas com a $+dP/dt$ e com a $-dP/dt$, determinadas na oitava semana. A

pressão de pulso, a pressão sistólica do ventrículo esquerdo e a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo não se correlacionaram com a função ventricular (tabela 6).

A PPC foi a única variável da hemodinâmica inicial a explicar de modo independente a $+dP/dt$ (parâmetro estimado = 47,2; intervalo de confiança, 95% = 24,7 a 69,6; $P = 0,0004$) e a $-dP/dt$ (parâmetro estimado = 58,2; intervalo de confiança, 95% = 48,7 a 67,7; $P < 0,0001$).

A figura 7 representa graficamente as correlações encontradas entre a PPC e a fração de volume do colágeno da região SE e entre a PPC e as funções sistólica e diastólica. As associações observadas sugerem que a isquemia miocárdica precoce pode constituir um dos mecanismos para o desenvolvimento de fibrose da região SE preferencialmente e para o desenvolvimento de disfunção cardíaca, na fístula aorto-cava.

Associação entre a fibrose miocárdica e a função ventricular esquerda

A fração de volume do colágeno da região SE apresentou correlação inversa com a $+dP/dt$ e com a $-dP/dt$ determinadas na oitava semana. A fração de volume do colágeno da região não SE apresentou correlação inversa com a $+dP/dt$ (tabela 7, figura 8).

Discussão

O presente estudo demonstra que, no modelo de fístula aorto-cava em ratos, há queda precoce da PPC, observada na primeira semana, que se mantém diminuída até a oitava semana. O fluxo miocárdico também está diminuído na primeira semana, particularmente na região SE do ventrículo esquerdo. A fístula aorto-cava determina dilatação do ventrículo esquerdo, hipertrofia dos miócitos e desenvolvimento de disfunção sistólica e diastólica. O remodelamento ventricular acompanha-se de elevação de TBARS e de interleucinas, aumento da expressão e da atividade de MMP-2 e do desenvolvimento de fibrose, todos preferencialmente na região SE.

A fístula aorto-cava caracteriza-se pela diminuição da resistência vascular periférica. Os dados hemodinâmicos demonstram aumento da pressão de pulso já na primeira semana, que se mantém até a oitava semana. Houve queda da pressão sistêmica, tanto sistólica (16% na semana 1 e 9% na semana 8) quanto diastólica (26% na semana 1 e 22% na semana 8). Estes dados indicam que o aumento da pressão de pulso foi determinado pela queda da pressão diastólica mais expressiva em relação à pressão sistólica.

Na semana 1, a função ventricular, seja sistólica, representada pela $+dP/dt$, seja diastólica, representada pela $-dP/dt$, não se modificou, apesar da queda da pressão sistólica do ventrículo esquerdo e da elevação da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo. A diminuição da pressão sistólica ventricular parece ter sido resultado da queda da pressão sistêmica, uma vez que em FAC a $+dP/dt$ inicial se manteve comparável a SH. É possível que a menor pressão sistêmica em FAC seja resultado da hipovolemia que se segue ao trauma cirúrgico. A $-dP/dt$ inicial comparável em FAC a SH evidencia um relaxamento do ventrículo esquerdo ainda normal na semana 1. Uma dos mecanismos para a manutenção do relaxamento diante do aumento da pressão de enchimento é a dilatação da cavidade ventricular para compensar a elevação do estresse diastólico ⁴. A ausência de dados ecocardiográficos não permitiu comprovar a dilatação cardíaca já na semana 1.

Na semana 8, tanto a $+dP/dt$ quanto a $-dP/dt$ se modificam, indicando o desenvolvimento de disfunção sistólica e diastólica. Nesta fase, os dados ecocardiográficos confirmam a presença de hipertrofia excêntrica desadaptada. De acordo com a Lei de Laplace, quando há dilatação da câmara, ocorre espessamento da parede para contrabalançar o estresse sistólico e, assim, manter o

consumo de oxigênio miocárdico e a função sistólica ⁵⁹. A espessura relativa de parede, porém, estava diminuída, indicando que a hipertrofia desenvolvida foi inapropriada e, portanto, incapaz de manter função sistólica. A dilatação ventricular foi também inapropriada para compensar o estresse diastólico, surgindo a disfunção diastólica.

A queda da pressão sistêmica e o aumento da pressão de enchimento do ventrículo esquerdo determinaram queda da PPC, observada já na semana 1. Muitas vezes, a PPC atingiu valores <60 mmHg, abaixo da capacidade de auto-regulação coronariana ⁶⁰ e implicando em isquemia por diminuição do fluxo miocárdico. De fato, havia hipofluxo preferencialmente na região SE. Mais ainda, observou-se correlação direta entre a PPC e o fluxo desta região. Estes dados estão de acordo com o fato de ser o subendocárdio a região do ventrículo esquerdo mais susceptível à queda da pressão de perfusão coronariana ^{61,62}.

Um dos mecanismos possivelmente implicados no desenvolvimento de hipertrofia desadaptada durante o remodelamento é a perda de fibras contráteis ⁶³. A alteração patológica mais evidente observada na região SE foi caracterizada pela deposição de fibras colágenas. O aparecimento de fibrose nesta região correlacionou-se inversamente com a PPC medida na

semana 1, o que sugere um processo cicatricial em resposta à isquemia crônica. Esta isquemia também deve ter sido responsável pela presença de espécies reativas de oxigênio e pela elevação de citocinas. A ausência de sinais de necrose não afasta a perda de miócitos em fases mais precoces. Ao mesmo tempo, não foram observados aumento da atividade de mieloperoxidase ou a presença de um infiltrado inflamatório marcante. Miócitos, células endoteliais e miofibroblastos podem ser as células responsáveis pelo aumento dos níveis de interleucinas nesta fase tardia do remodelamento ^{64,65,66}. Desta forma, os aumentos de IL-1 β e IL-6 podem resultar de isquemia persistente, mesmo na ausência de necrose e de infiltrado inflamatório. Segue-se o aumento da expressão e da atividade de MMP-2. Nesta fase tardia, tanto as interleucinas quanto o estresse oxidativo são capazes de ativar MMPs ^{49,61,67}. Assim, o desenvolvimento de fibrose da região SE pode ser um processo reparativo resultante da perda de miócitos em fases mais precoces e/ou representar o acúmulo de fibras colágenas resultante de isquemia persistente desta região.

A presença de fibrose intersticial, observada na região não SE do ventrículo esquerdo, é reconhecida como uma alteração patológica característica do remodelamento cardíaco ^{68,69,70}. O grau de fibrose observado nesta região, embora comparável a alguns

estudos ^{71,72}, foi marcante em relação ao observado em outros ^{29,73}. Na fístula aorto-cava, a presença de fibrose intersticial tem sido associada ao desenvolvimento da disfunção ventricular ³³. De fato, a maioria dos animais estudados demonstravam sinais evidentes de falência cardíaca. Um dos mecanismos aventados para o desenvolvimento da fibrose intersticial é a ativação neurohumoral da insuficiência cardíaca ⁷⁴. Mais ainda, neste modelo de fístula, a diminuição do fluxo visceral pode concorrer para o aumento da secreção de renina pelos rins com ativação do sistema renina-angiotensina circulante. A relação inversa encontrada entre a pressão sistólica sistêmica e a fibrose da região não SE suportam esta hipótese. É possível que, tal como em outros modelos de hipertrofia em que a fibrose intersticial foi relacionada com a ativação local do sistema renina-angiotensina ⁷⁵, na fístula haja participação do sistema renina-angiotensina circulante.

O remodelamento ventricular da fístula aorto-cava tem sido associado à ativação de MMPs, dano miocárdico, dilatação ventricular e desenvolvimento de fibrose intersticial ^{38,39}. As MMPs podem ser expressas pela sobrecarga hemodinâmica ⁷⁶ e sua ativação ser responsável pela disfunção ventricular ^{39,65}. Até então, o papel do remodelamento da região SE em comparação à região não SE, intersticial, sobre a função cardíaca não havia sido

investigada, particularmente neste modelo de fístula aorto-cava. A análise multivariada, indicou que, entre todas as variáveis da hemodinâmica inicial estudadas, a PPC foi a única associada de modo independente, e inversamente, ao desenvolvimento de fibrose na região SE e à função ventricular. Também, houve associação inversa da PPC final com a expressão e a atividade da MMP-2 nesta região. Mais ainda, a fibrose da região SE foi associada diretamente ao desenvolvimento de disfunção sistólica e diastólica. Em contrapartida à PPC, a pressão de enchimento do ventrículo esquerdo, uma medida indireta da pré-carga, não se correlacionou nem com a MMP-2, nem com a fibrose da região SE e nem com a função ventricular. Assim, a hipótese de que a sobrecarga de volume e o correspondente aumento do estresse mecânico são os mecanismos principais envolvidos na ativação de MMPs, dilatação ventricular e disfunção não foi corroborada pelos presentes resultados. Nossos dados indicam que é o dano da região SE, com ativação de MMP-2 como resultado de isquemia crônica desta região, o principal responsável pela desadaptação ventricular.

Implicação clínica

Tal como demonstrado no modelo de FAC, a queda da PPC

pode ser um mecanismo importante de disfunção ventricular em outros tipos de sobrecarga de volume mais comuns na prática médica como as insuficiências valvares aórtica e mitral. Nestas duas patologias, o benefício dos inibidores da enzima conversora da angiotensina e dos antagonistas do receptor AT1 da angiotensina ainda não foi comprovado. É possível que sua utilidade em prevenir ou reverter o remodelamento cardíaco seja limitada por sua ação hemodinâmica resultando em queda da PPC com dano da região SE.

Sumário

O presente estudo demonstrou que no modelo de fístula aorto-cava há:

1. diminuição da PPC, da pressão sistólica do ventrículo esquerdo e das pressões sistêmicas sistólica e diastólica com aumento da pressão de pulso e da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo;
2. remodelamento cardíaco evidenciado por aumento do peso relativo do coração, do diâmetro dos miócitos, desenvolvimento de fibrose das regiões SE e não SE do ventrículo esquerdo;
4. hipertrofia inapropriada do ventrículo esquerdo evidenciada por diminuição da espessura relativa da parede, da

fração de encurtamento do ventrículo esquerdo, da $+dP/dt$ e da $-dP/dt$;

5. diminuição do fluxo miocárdico na região SE;

6. aumento da expressão e da atividade de MMP-2, de TBARS e das interleucinas IL-1 β e IL-6;

7. associação direta da PPC com o desenvolvimento de fibrose SE;

8. associação direta da PPC com a expressão e a atividade de MMP-2;

9. associação direta da PPC com o fluxo miocárdio;

10. associação direta da PPC com a função sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo;

11. associação direta da fibrose da região SE com a função sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo.

Conclusões

Na fistula aorto-cava, a queda da PPC está associada com dano subendocárdico caracterizado por isquemia, estresse oxidativo, aumento de citocinas pró-inflamatórias, de MMP-2 e desenvolvimento de fibrose.

A queda da PPC e a deposição de fibrose na região SE contribuem negativamente para a função cardíaca.

Referências bibliográficas

1. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. J Am Coll Cardiol 2000; 35:569-582.
2. Olivetti G, Cigola E, Maestri R, Lagrasta C, Corradi D, Quaini F. Recent advances in cardiac hypertrophy. Cardiovasc Res 2000; 45:68-75.
3. Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA. Controversies in ventricular remodelling. Lancet 2006; 367:356-367.
4. Grossman W. Cardiac hypertrophy: useful adaptation or pathologic process? Am J Med 1980; 69:576-584.
5. Cantor EJ, Babick AP, Vasanji Z, Dhalla NS, Netticadan T. A comparative serial echocardiographic analysis of cardiac structure and function in rats subjected to pressure or volume overload. J Mol Cell Cardiol 2005; 38:777-786.
6. Litwin SE, Katz SE, Weinberg EO, Lorell BH, Aurigemma GP, Douglas PS. Serial echocardiographic-Doppler assessment of left ventricular geometry and function in rats with pressure-overload hypertrophy. Chronic angiotensin-converting

- enzyme inhibition attenuates the transition to heart failure. *Circulation* 1995; 91:2642-2654.
7. Wang LJ, He JG, Ma H, Cai YM, Liao XX, Zeng WT, *et al.* Chronic administration of angiotensin-(1-7) attenuates pressure-overload left ventricular hypertrophy and fibrosis in rats. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2005; 25:481-487.
 8. Kobayashi S, Yano M, Kohno M, Obayashi M, Hisamatsu Y, Ryoke T, *et al.* Influence of aortic impedance on the development of pressure-overload left ventricular hypertrophy in rats. *Circulation* 1996; 94:3362-3368.
 9. Bregagnollo EA, Okoshi K, Bregagnollo IF, Padovani CR, Okoshi MP, Cicogna AC. Effects of the prolonged inhibition of the angiotensin-converting enzyme on the morphological and functional characteristics of left ventricular hypertrophy in rats with persistent pressure overload. *Arq Bras Cardiol* 2005; 84:225-232.
 10. Bregagnollo EA, Mestrinel MA, Okoshi K, Carvalho FC, Bregagnollo IF, Padovani CR, *et al.* Relative role of left ventricular geometric remodeling and of morphological and functional myocardial remodeling in the transition from compensated hypertrophy to heart failure in rats with

- supravalvar aortic stenosis. *Arq Bras Cardiol* 2007; 88:225-233.
11. Tsotetsi OJ, Woodiwiss AJ, Netjhardt M, Qubu D, Brooksbank R, Norton GR. Attenuation of cardiac failure, dilatation, damage, and detrimental interstitial remodeling without regression of hypertrophy in hypertensive rats. *Hypertension* 2001; 38:846-851.
 12. McCrossan ZA, Billeter R, White E. Transmural changes in size, contractile and electrical properties of SHR left ventricular myocytes during compensated hypertrophy. *Cardiovasc Res* 2004; 63:283-292.
 13. Rossi MA, Carillo SV. Cardiac hypertrophy due to pressure and volume overload: distinctly different biological phenomena? *Int J Cardiol* 1991; 31:133-141.
 14. Couet J, Gaudreau M, Lachance D, Plante E, Roussel E, Drolet MC, *et al.* Treatment of combined aortic regurgitation and systemic hypertension: Insights from an animal model study. *Am J Hypertens* 2006; 19:843-850.
 15. Plante E, Gaudreau M, Lachance D, Drolet MC, Roussel E, Gauthier C, *et al.* Angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril prevents volume overload cardiomyopathy in

- experimental chronic aortic valve regurgitation. *Can J Physiol Pharmacol* 2004; 82:191-199.
16. Conway MA, Bottomley PA, Ouwerkerk R, Radda GK, Rajagopalan B. Mitral regurgitation: impaired systolic function, eccentric hypertrophy, and increased severity are linked to lower phosphocreatine/ATP ratios in humans. *Circulation* 1998; 97:1716-1723.
17. Pu M, Gao Z, Li J, Sinoway L, Davidson WR Jr. Development of a new animal model of chronic mitral regurgitation in rats under transesophageal echocardiographic guidance. *J Am Soc Echocardiogr* 2005; 18:468-474.
18. Ryan TD, Rothstein EC, Aban I, Tallaj JA, Husain A, Lucchesi PA, *et al*. Left ventricular eccentric remodeling and matrix loss are mediated by bradykinin and precede cardiomyocyte elongation in rats with volume overload. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49:811-821.
19. Gerdes AM, Clark LC, Capasso JM. Regression of cardiac hypertrophy after closing an aortocaval fistula in rats. *Am J Physiol* 1995; 268:H2345-2351.
20. Caulfield JB, Borg TK. The collagen network of the heart. *Lab Invest* 1979; 40:364-372.

21. Janicki JS, Brower GL. The role of myocardial fibrillar collagen in ventricular remodeling and function. *J Card Fail* 2002; 8:S319-325.
22. Weber KT, Brilla CG, Janicki JS. Myocardial fibrosis: functional significance and regulatory factors. *Cardiovasc Res* 1993; 27:341-348.
23. Brilla CG, Janicki JS, Weber KT. Cardioreparative effects of lisinopril in rats with genetic hypertension and left ventricular hypertrophy. *Circulation* 1991; 83:1771-1779.
24. Doering CW, Jalil JE, Janicki JS, Pick R, Aghili S, Abrahams C, *et al*. Collagen network remodelling and diastolic stiffness of the rat left ventricle with pressure overload hypertrophy. *Cardiovasc Res* 1988; 22:686-695.
25. Jalil JE, Janicki JS, Pick R, Weber KT. Coronary vascular remodeling and myocardial fibrosis in the rat with renovascular hypertension. Response to captopril. *Am J Hypertens* 1991; 4:51-55.
26. Cicogna AC, Matsubara BB, Matsubara LS, Okoshi K, Gut AL, Padovani CR, *et al*. Volume overload influence on hypertrophied myocardium function. *Jpn Heart J* 2002; 43:689-695.

27. Raya TE, Gaballa M, Anderson P, Goldman S. Left ventricular function and remodeling after myocardial infarction in aging rats. *Am J Physiol* 1997; 273:H2652-2658.
28. Michel JB, Salzmann JL, Ossondo Nlom M, Bruneval P, Barres D, Camilleri JP. Morphometric analysis of collagen network and plasma perfused capillary bed in the myocardium of rats during evolution of cardiac hypertrophy. *Basic Res Cardiol* 1986; 81:142-154.
29. Namba T, Tsutsui H, Tagawa H, Takahashi M, Saito K, Kozai T, *et al.* Regulation of fibrillar collagen gene expression and protein accumulation in volume-overloaded cardiac hypertrophy. *Circulation* 1997; 95:2448-2454.
30. Matsubara LS, Narikawa S, Ferreira AL, Paiva SA, Zornoff LM, Matsubara BB. Myocardial remodeling in chronic pressure or volume overload in the rat heart. *Arq Bras Cardiol* 2006; 86:126-130.
31. Brower GL, Henegar JR, Janicki JS. Temporal evaluation of left ventricular remodeling and function in rats with chronic volume overload. *Am J Physiol* 1996; 271:H2071-2078.
32. Dolgilevich SM, Siri FM, Atlas SA, Eng C. Changes in collagenase and collagen gene expression after induction of

- aortocaval fistula in rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2001; 281:H207-214.
33. Karram T, Abbasi A, Keidar S, Golomb E, Hochberg I, Winaver J, *et al.* Effects of spironolactone and eprosartan on cardiac remodeling and angiotensin-converting enzyme isoforms in rats with experimental heart failure. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005; 289:H1351-1358.
34. Hittinger L, Shannon RP, Bishop SP, Gelpi RJ, Vatner SF. Subendomyocardial exhaustion of blood flow reserve and increased fibrosis in conscious dogs with heart failure. Circ Res 1989; 650:971-980.
35. de Carvalho Frimm C, Koike MK, Curi M. Subendocardial fibrosis in remote myocardium results from reduction of coronary driving pressure during acute infarction in rats. Arq Bras Cardiol 2003; 80:509-520.
36. Guido MC, Koike MK, Frimm Cde C. Low coronary perfusion pressure is associated with endocardial fibrosis in a rat model of volume overload cardiac hypertrophy. Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo 2004; 59:228-235.
37. Brower GL, Levick SP, Janicki JS. Inhibition of Matrix Metalloproteinase Activity by ACE Inhibitors Prevents Left

- Ventricular Remodeling in a Rat Model of Heart Failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; [Epub ahead of print].
38. Brower GL, Chancey AL, Thanigaraj S, Matsubara BB, Janicki JS. Cause and effect relationship between myocardial mast cell number and matrix metalloproteinase activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283:H518-525.
39. Chancey AL, Brower GL, Peterson JT, Janicki JS. Effects of matrix metalloproteinase inhibition on ventricular remodeling due to volume overload. *Circulation* 2002; 105:1983-1988.
40. Jones CB, Sane DC, Herrington DM. Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in acute coronary syndrome. *Cardiovasc Res* 2003; 59:812-823.
41. Brauer PR. MMPs-role in cardiovascular development and disease. *Front Biosci* 2006; 11:447-478.
42. Aimes RT, Quigley JP. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem* 1995; 270:5872-5876.
43. Cleutjens JP. The role of matrix metalloproteinases in heart disease. *Cardiovasc Res* 1996; 32:816-821.

44. Deschamps AM, Apple KA, Leonardi AH, McLean JE, Yarbrough WM, Stroud RE, *et al.* Myocardial interstitial matrix metalloproteinase activity is altered by mechanical changes in LV load: interaction with the angiotensin type 1 receptor. *Circ Res* 2005; 96:1110-1118.
45. Wang TL, Yang YH, Chang H, Hung CR. Angiotensin II signals mechanical stretch-induced cardiac matrix metalloproteinase expression via JAK-STAT pathway. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 37:785-794.
46. Wang W, Sawicki G, Schulz R. Peroxynitrite-induced myocardial injury is mediated through matrix metalloproteinase-2. *Cardiovasc Res* 2002; 53:165-174.
47. Cuenca J, Martin-Sanz P, Alvarez-Barrientos AM, Bosca L, Goren N. Infiltration of inflammatory cells plays an important role in matrix metalloproteinase expression and activation in the heart during sepsis. *Am J Pathol* 2006; 169:1567-1576.
48. Tao ZY, Cavaasin MA, Yang F, Liu YH, Yang XP. Temporal changes in matrix metalloproteinase expression and inflammatory response associated with cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *Life Sci* 2004; 74:1561-1572.

49. Gao CQ, Sawicki G, Suarez-Pinzon WL, Csont T, Wozniak M, Ferdinandy P, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 mediates cytokine-induced myocardial contractile dysfunction. *Cardiovasc Res* 2003; 57:426-433.
50. Cox MJ, Sood HS, Hunt MJ, Chandler D, Henegar JR, Aru GM, *et al*. Apoptosis in the left ventricle of chronic volume overload causes endocardial endothelial dysfunction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282:H1197-1205.
51. Garcia R, Diebold S. Simple, rapid, and effective method of producing aortocaval shunts in the rat. *Cardiovasc Res* 1990; 24:430-432.
52. Zausinger S, Baethmann A, Schmid-Elsaesser R. Anesthetic methods in rats determine outcome after experimental focal cerebral ischemia: mechanical ventilation is required to obtain controlled experimental conditions. *Brain Res Brain Res Protoc* 2002; 9:112-121.
53. Cross CE, Rieben PA, Salisbury PF. Coronary driving pressure and vasomotor tonus as determinants of coronary blood flow. *Circ Res* 1961; 9:589-600.
54. Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A. Recommendations regarding quantitation in M-mode

- echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation* 1978; 58:1072-1083.
55. De Angelis K, Gama VM, Farah VA, Irigoyen MC. Blood flow measurements in rats using four color microspheres during blockade of different vasopressor systems. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38:119-125.
56. Hakkinen JP, Miller MW, Smith AH, Knight DR. Measurement of organ blood flow with coloured microspheres in the rat. *Cardiovasc Res* 1995; 29:74-79.
57. Liaudet L, Pacher P, Mabley JG, Virag L, Soriano FG, Szabo C. Activation of poly(ADP-Ribose) polymerase-1 is a central mechanism of lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:372-377.
58. Soriano FG, Liaudet L, Szabo E, Virag L, Mabley JG, Pacher P, *et al.* Resistance to acute septic peritonitis in poly(ADP-ribose) polymerase-1-deficient mice. *Shock* 2002; 17:286-292.
59. Grossman W, Jones D, McLaurin LP. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest* 1975; 56:56-64.

60. Spaan JAE, Piek JJ, Hoffman JIE, Siebes M. Physiological basis of clinically used coronary hemodynamic indices. *Circulation* 2006; 113:446-455.
61. Buckberg GD. Left ventricular subendocardial necrosis. *The Annals of Thoracic Surgery* 1977; 24:379-393.
62. Wang J, Abraham TP, Korinek J, Urheim S, McMahon EM, Belohlavek M. Delayed onset of subendocardial diastolic thinning at rest identifies hypoperfused myocardium. *Circulation* 2005; 111:2943-2950.
63. Pearlman ES, Weber KT, Janicki JS, Pietra GG, Fishman AP. Muscle fiber orientation and connective tissue content in the hypertrophied human heart. *Lab Invest* 1982; 46:158-164.
64. Yin F, Li P, Zheng M, Chen L, Xu Q, Chen K, *et al.* Interleukin-6 family of cytokines mediates isoproterenol-induced delayed STAT3 activation in mouse heart. *J Biol Chem* 2003; 278:21070-21075.
65. Dai RP, Dheen St, He BP, Tay SS. Differential expression of cytokines in the rat heart in response to sustained volume overload. *Eur J Heart Fail* 2004; 6:693-703.

66. Gaertner R, Jacob MP, Prunier F, Angles-Cano E, Mercadier JJ, Micjel JB. The plasminogen-MMP system is more activated in the scar than in viable myocardium 3 months post-MI in the rat. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 38:193-204.
67. Siwik DA, Pagano PJ, Colucci WS. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280:C53-60.
68. Rossi MA. Patterns of myocardial fibrosis in idiopathic cardiomyopathies and chronic Chagasic cardiopathy. *Can J Cardiol* 1991; 7:287-94.
69. Jugdutt BI, Joljart MJ, Khan MI. Rate of collagen deposition during healing and ventricular remodeling after myocardial infarction in rat and dog models. *Circulation* 1996; 94:94-101.
70. Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Franco M, Cicogna AC. Myocardial fibrosis rather than hypertrophy induces diastolic dysfunction in renovascular hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1997; 75:1328-1334.
71. Michel JB, Lattion AL, Salzmann JL, Cerol ML, Philippe M, Camilleri JP, Corvol P. Hormonal and cardiac effects of

converting enzyme inhibition in rat myocardial infarction. *Circ Res* 1988; 62:641-650.

72. Cox MJ, Hawkins UA, Hoit BD, Tyagi SC. Attenuation of oxidative stress and remodeling by cardiac inhibitor of metalloproteinase protein transfer. *Circulation* 2004; 109:2123-2128.
73. Brower GL, Janicki JS. Contribution of ventricular remodeling to pathogenesis of heart failure in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280:H674-683.
74. Brilla CG, Reams GP, Maisch B, Weber KT. Renin-angiotensin system and myocardial fibrosis in hypertension: regulation of the myocardial collagen matrix. *Eur Heart J* 1993; 14SupplJ:57-61.
75. de Carvalho Frimm C, Sun Y, Weber KT. Angiotensin II receptor blockade and myocardial fibrosis of the infarcted rat heart. *J Lab Clin Med* 1997; 129:439-446.
76. Lehoux S, Lemarie CA, Esposito B, Lijnen HR, Tedgui A. Pressure-induced matrix metalloproteinase-9 contributes to early hypertensive remodeling. *Circulation* 2004; 109:1041-1047.

Tabela 1. Resultados da avaliação hemodinâmica inicial (semana 1) e final (semana 8).

	inicial		final	
	SH	FAC	SH	FAC
PPulso (mmHg)	28±1	33±1*	28±1	37±2*
PPC (mmHg)	86±3	52±5*	86±2	54±4*
PSVE (mmHg)	122±1	109±2*	122±2	110±2*
PDfVE (mmHg)	6±1	16±1*	6±1	18±1*
+dP/dt (mmHg.s ⁻¹)	5813±383	4768±244	5917±266	4511±285*
-dP/dt (mmHg.s ⁻¹)	5284±204	5017±227	5639±396	4343±274*
PAS (mmHg)	120±1	101±4*	120±3	109±4
PAD (mmHg)	92±2	68±5*	92±2	72±4*
FC (bat/min)	386±7	374±9	387±7	361±13

SH, grupo sham; FAC, grupo fístula aorto-cava; PPulso, pressão de pulso; PPC, pressão de perfusão coronariana; PSVE, pressão sistólica do ventrículo esquerdo; PDfVE, pressão diastólica final do ventrículo esquerdo; +dP/dt, velocidade máxima de elevação da pressão ventricular durante a sístole; -dP/dt, velocidade máxima de diminuição da pressão ventricular durante a diástole; PAS, pressão sistólica sistêmica; PAD, pressão diastólica sistêmica; FC, frequência cardíaca; bat, batimento; *, P <0,05 vs. SH.

Tabela 2. Resultados da morfometria cardíaca realizada na semana 8.

	SH	FAC
PC (g/Kg)	3,6 ± 0,1	4,6 ± 0,3*
Diâmetro dos miócitos (µm)	7,3 ± 0,1	10,9 ± 0,2*
FVC _{SE} (%)	1,1 ± 0,1	7,7 ± 0,4*†
FVC _{não SE} (%)	1,0 ± 0,1	4,9 ± 0,3*

SH, sham; FAC, fístula aorto-cava; PC, peso relativo do coração; FVC_{SE}, fração de volume do colágeno da região SE; FVC_{nãoSE}, fração de volume do colágeno da região não SE; *, P <0.05 vs. SH; †, P <0,05 vs. FVC_{não SE}.

Tabela 3. Resultados da ecocardiografia realizada na semana 8.

	SH	FAC
Ao (mm)	3,82 ± 0,06	4,31 ± 0,12*
AE (mm)	4,18 ± 0,05	6,02 ± 0,32*
DDVE (mm)	5,26 ± 0,17	7,01 ± 0,31*
DSVE (mm)	2,43 ± 0,11	3,78 ± 0,25*
PP (mm)	2,03 ± 0,05	2,11 ± 0,06
SIV (mm)	1,72 ± 0,05	1,88 ± 0,06
ERP (mm)	0,72 ± 0,02	0,58 ± 0,03*
FEn (%)	55,8 ± 1,19	45,1 ± 2,07*

SH, sham; FAC, fístula aorto-cava; Ao, aorta; AE, átrio esquerdo; DDVE, diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; DSVE, diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; PP, espessura diastólica da parede posterior do ventrículo esquerdo; SIV, espessura diastólica do septo interventricular; ERP, espessura relativa de parede do ventrículo esquerdo; FEn, fração de encurtamento do ventrículo esquerdo; *, P <0,05 vs. SH.

Tabela 4. Resultados da hemodinâmica realizada na semana 1 para a medida do fluxo miocárdico.

	SH	FAC
PPulso (mmHg)	30±2	39±3*
PPC (mmHg)	85±2	29±2*
PSVE (mmHg)	124±2	95±5*
PDfVE (mmHg)	7±1	20±1*
+dP/dt (mmHg.s ⁻¹)	6366±239	3855±395*
-dP/dt (mmHg.s ⁻¹)	6235±244	3500±394*
PAS (mmHg)	122±1	88±4*
PAD (mmHg)	92±2	49±3*
FC (bat/min)	394±12	406±10

SH, sham; FAC, fístula aorto-cava; PPulso, pressão de pulso; PPC, pressão de perfusão coronariana; PSVE, pressão sistólica do ventrículo esquerdo; PDfVE, pressão diastólica final do ventrículo esquerdo; +dP/dt, velocidade máxima de elevação da pressão ventricular durante a sístole; -dP/dt, velocidade máxima de diminuição da pressão ventricular durante a diástole; PAS, pressão sistólica sistêmica; PAD, pressão diastólica sistêmica; FC, frequência cardíaca; bat, batimento; *, P <0,05 vs. SH.

Tabela 5. Coeficientes de correlação de Pearson da análise de regressão linear simples entre as medidas da hemodinâmica inicial determinadas na semana 1 e a fibrose do ventrículo esquerdo determinada na semana 8.

	FVC _{SE}			FVC _{não SE}		
	R	R ²	P	R	R ²	P
PPCi (mmHg)	-0,88	0,76	<0,0001	-0,54	0,25	0,021
PPulsoi (mmHg)			NS			NS
PASi (mmHg)	-0,55	0,26	0,017	-0,60	0,32	0,008
PADi (mmHg)	-0,53	0,24	0,024	-0,57	0,28	0,014
PSVEi (mmHg)			NS			NS
PDfVEi (mmHg)			NS			NS

FVC_{SE}, fração de volume do colágeno da região SE; FVC_{não SE}, fração de volume do colágeno da região não SE; i, inicial; PPC, pressão de perfusão coronariana; PPulso, pressão de pulso; PAS, pressão sistólica sistêmica; PAD, pressão diastólica sistêmica; PSVE, pressão sistólica do ventrículo esquerdo; PDfVE, pressão diastólica final do ventrículo esquerdo; NS, P >0,05.

Tabela 6. Coeficientes de correlação de Pearson da análise de regressão linear simples entre as medidas da hemodinâmica inicial determinadas na semana 1 e a função do ventrículo esquerdo determinada na semana 8.

	+dP/dt			-dP/dt		
	R	R ²	P	R	R ²	P
PPCi (mmHg)	0,74	0,53	0,0004	0,96	0,91	<0,0001
PPulsoi (mmHg)			NS			NS
PASi (mmHg)	0,56	0,27	0,0155	0,65	0,39	0,003
PADi (mmHg)	0,55	0,26	0,0017	0,66	0,40	0,003
PSVEi (mmHg)			NS			NS
PDfVEi (mmHg)			NS			NS

+dP/dt, velocidade máxima de elevação da pressão ventricular durante a sístole; -dP/dt, velocidade máxima de diminuição da pressão ventricular durante a diástole; i, inicial; PPC, pressão de perfusão coronariana; PPulso, pressão de pulso; PAS, pressão sistólica sistêmica; PAD, pressão diastólica sistêmica; PSVE, pressão sistólica do ventrículo esquerdo; PDfVE, pressão diastólica final do ventrículo esquerdo; NS, P >0,05.

Tabela 7. Coeficientes de correlação de Pearson da análise de regressão linear simples entre a fibrose miocárdica e a função ventricular esquerda determinadas na semana 8.

	+dP/dt			-dP/dt		
	R	R ²	P	R	R ²	P
FVC _{SE} (%)	-0,74	0,55	0,0004	-0,92	0,85	<0,0001
FVC _{não SE} (%)	-0,59	0,41	0,0106			NS

+dP/dt, velocidade máxima de elevação da pressão ventricular durante a sístole; -dP/dt, velocidade máxima de diminuição da pressão ventricular durante a diástole; FVC_{SE}, fração de volume do colágeno da região SE; FVC_{não SE}, fração de volume do colágeno da região não SE; NS, P >0,05.

Figura 1. Fotomicrografias do tecido miocárdico do ventrículo esquerdo corado com *Sirius red* sob aumento de 580x dos 2 grupos estudados: FAC e SH. A presença de fibrose (fibras colágenas coradas em vermelho) nas regiões SE e não SE é evidente em FAC (painéis B e D, respectivamente) quando comparada com sham (painéis A e C, respectivamente).

Figura 2. Fluxo miocárdico das regiões SE e não SE do ventrículo esquerdo dos dois grupos estudados: FAC e SH. *, $P < 0,05$ vs. SH_{SE} ; #, $P < 0,05$ vs. $SH_{não\ SE}$; †, $P < 0,05$ vs. $FAC_{não\ SE}$.

Figura 3. Relações da pressão de perfusão coronariana com os fluxos das regiões SE (gráfico superior) e não SE (gráfico inferior) do ventrículo esquerdo determinados na semana 1.

Expressão de MMP-2

Figura 4. Porcentagem de expressão da MMP-2 na região SE e não SE do ventrículo esquerdo de ratos do grupo FAC com PPC ≤ 60 mmHg e > 60 mmHg. *, $P < 0,05$ vs. SE PPC > 60 mmHg; #, $P < 0,05$ vs. não SE PPC > 60 mmHg; †, $P < 0,05$ vs. SE PPC ≤ 60 mmHg.

Atividade de MMP-2

Figura 5. Porcentagem de atividade da MMP-2 na região SE e não SE do ventrículo esquerdo de ratos do grupo FAC com PPC ≤ 60 mmHg e > 60 mmHg. *, $P < 0,05$ vs. SE PPC > 60 mmHg; #, $P < 0,05$ vs. não SE PPC > 60 mmHg; †, $P < 0,05$ vs. SE PPC ≤ 60 mmHg; \$, $P < 0,05$ vs. não SE PPC > 60 mmHg.

Figura 6. Níveis de interleucinas das regiões SE e não SE do ventrículo esquerdo dos grupos FAC e controle *, $P < 0,05$ vs. controle_{SE}; #, $P < 0,05$ vs. controle_{não SE}; †, $P < 0,05$ vs. FAC_{não SE}.

Figura 7. Relações da pressão de perfusão coronariana inicial determinada na semana 1 com a fibrose SE (gráfico superior) e com as funções sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo (gráficos inferiores) determinadas na semana 8.

Figura 8. Relações da fibrose SE com a função sistólica (gráfico superior) e diastólica (gráfico inferior) do ventrículo esquerdo determinadas na semana 8.