Flávia Regina Ruppert Mazzo

**A diminuição da perfusão e o dano isquêmico do
subendocárdico resultam em disfunção do ventrículo
esquerdo na fase aguda da fístula aorto-cava**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de: Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios do Crescimento
Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientador Dr. Clovis de Carvalho Frimm

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Mazzo, Flávia Regina Ruppert

A diminuição da perfusão e o dano isquêmico do subendocárdico resultam em disfunção do ventrículo esquerdo na fase aguda da fístula aorto-cava / Flávia Regina Ruppert Mazzo. -- São Paulo, 2011.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientador: Clovis de Carvalho Frimm.

Descritores: 1.Remodelamento ventricular 2.Fibrose 3.Fístula arteriovenosa
4.Ratos Wistar 5.Pressão de perfusão coronariana

USP/FM/DBD-293/11

À minha irmã.
Aos animais, parte do meu viver.

Meu obrigada:

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para eu alcançar esta realização.

Em especial às minhas queridas Alezinha, Drezinha e Fezinha.

À Fernanda Cordeiro, querida, que acreditou em mim antes de mim mesma.

Aos meus pais, Laurindo e Rosely.

À Marcia Moura Coelho por me fazer acreditar, conhecer e ultrapassar.

Aos colegas do LIM, apoio nas horas difíceis e boas risadas.

À Marcia Kiyomi Koike.

Especial agradecimento ao Clovis, ele sabe por quê.

Aos ratos.

Eu sou feita de duas partes:
uma de sonho e outra de
coragem.

Quando recebemos um
ensinamento devemos recebê-
lo como um valioso presente e
não como uma dura tarefa. Eis
aqui a diferença que
transcende.
Albert Einstein

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Objetivo	5
2	MÉTODOS	6
2.1	Modelo Biológico.....	6
2.2	Modelo experimental de fístula aorto-cava.....	8
2.3	Estudo hemodinâmico	9
2.4	Estudo morfométrico.....	10
2.5	Estudo do fluxo miocárdico.....	13
2.6	Estudo da atividade de metaloproteinase-2 , atividade da mieloperoxidase e níveis das citocinas interleucina-1 β , fator de necrose tumoral- α , interleucina-6 e interleucina-10.....	17
2.6.1	Metaloproteinase-2'	18
2.6.2	Mieloperoxidase	19
2.6.3	Interleucinas	20
2.6.4	Estatística	21
3	RESULTADOS	22
3.1	Estudo Hemodinâmico	22
3.2	Estudo morfométrico.....	23
3.3	Estudo do fluxo miocárdico.....	26
3.4	Mieloperoxidase.....	30
3.5	Interleucinas	31
3.6	Metaloproteinase-2	34
4	SUMÁRIO	39
5	DISCUSSÃO.....	40
6	LIMITAÇÕES.....	44
7	IMPLICAÇÕES.....	46
8	CONCLUSÃO.....	47
9	REFERÊNCIAS.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

+ dP/dp	índice de função sistólica do ventrículo esquerdo - velocidade máxima de elevação da pressão ventricular durante a sístole
- dP/dp	índice de função diastólica do ventrículo esquerdo - velocidade máxima de diminuição da pressão ventricular durante a diástole
1d	1 dia
3d	3 dias
7d	7 dias
°C	graus Celsius
>	maior
<	menor
≤	menor ou igual
%	porcentagem
ANOVA	análise univariada
AE	átrio esquerdo
Cappesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
FAC	grupo de fístula aorto-cava
FVC	fração de volume de colágeno
g	grama
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HE	hematoxilina-eosina
IL-1β	interleucina- 1 beta
IL-6	interleucina- 6
IL-10	interleucina- 10
i.p.	intraperitoneal
Kg	kilograma
L	litro
MMP	metaloproteinase
MPO	mieloperoxidase
ml	miligrama
min	minuto

mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
mm Hg	milímetro de mercúrio
mU	miliunidade
μm	micrometro
n	número
não SE	região não subendocárdica
nM	nanomolar
PAD	pressão arterial diastólica
PAS	pressão arterial sistólica
PC	peso relativo do coração
PDfVE	pressão diastólica final do ventrículo esquerdo
pg	picograma
PPC	pressão de perfusão coronariana
PP	pressão de pulso
PR_{ve}	área da parede ventricular esquerda
PSVE	pressão sistólica do ventrículo esquerdo
rpm	rotação por minuto
s	segundo
SAS	Statistical Analyses System
SE	região subendocárdica
SH	grupo de cirurgia fictícia
TNF- α	fator de necrose tumoral - α
Total_{ve}	área total do ventrículo esquerdo
UI	unidade internacional
vs	versus

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotomicrografias representativas do remodelamento subendocárdico do ventrículo esquerdo durante a fase aguda após fístula aorto-cava.	25
Figura 2. Fluxo miocárdico das regiões subendocárdica SE e não subendocárdica do ventrículo esquerdo em 7 dias.	27
Figura 3. Relações da PPC com os fluxos das regiões subendocárdica e não subendocárdica do ventrículo esquerdo em 7 dias.....	28
Figura 4. Relação da PPC com a função sistólica e diastólica em 7 dias.....	29
Figura 5. Atividade de MPO das regiões subendocárdica e não subendocárdica do ventrículo esquerdo em 1, 3 e 7 dias.....	30
Figura 6. Níveis de IL-1 β das regiões subendocárdica e não subendocárdica do ventrículo esquerdo em 1, 3 e 7 dias.	32
Figura 7. Níveis de TNF- α das regiões subendocárdica e não subendocárdica do ventrículo esquerdo em 1, 3 e 7 dias.	32
Figura 8. Níveis de IL-6 das regiões subendocárdica e não subendocárdica do ventrículo esquerdo em 1, 3 e 7 dias	33
Figura 9. Níveis de IL-10 das regiões subendocárdica e não subendocárdica do ventrículo esquerdo em 1, 3 e 7 dias	33
Figura 10. Atividade de MMP-2 em 1 dia na região subendocárdica e não subendocárdica do ventrículo esquerdo.....	34
Figura 11. Atividade de MMP-2 em 3 dias na região subendocárdica e não subendocárdica do ventrículo esquerdo.....	35
Figura 12. Atividade de MMP-2 em 7 dias na região subendocárdica e não subendocárdica do ventrículo esquerdo.....	36
Figura 13. Relações da pressão de perfusão coronariana com a atividade MMP-2 no ventrículo esquerdo em 1, 3 e 7 dias	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados hemodinâmicos	22
Tabela 2. Dados morfométricos	24
Tabela 3. Dados hemodinâmicos para a medida do fluxo miocárdico, em 7 dias	26

RESUMO

Mazzo FRR. *A diminuição da perfusão e o dano subendocárdico resultam em disfunção do ventrículo esquerdo na fase aguda da fístula aorto-cava* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011, 54p.

Recentemente demonstramos o desenvolvimento de fibrose na região subendocárdica (SE) do ventrículo esquerdo (VE) em resposta a sobrecarga de volume na fístula aorto-cava (FAC) crônica. A pressão de perfusão coronariana (PPC) associou-se com fibrose SE e com disfunção do VE subsequentes, sugerindo ser o hipofluxo um dos mecanismos envolvidos no remodelamento ventricular. O remodelamento agudo do VE após FAC ainda é desconhecido. O objetivo deste estudo foi investigar a perfusão e o remodelamento cardíaco nas fases agudas após FAC e as possíveis implicações resultantes sobre a função do VE. Ratos *Wistar* foram submetidos a cirurgia fictícia (sham) ou a FAC e examinados em 3 períodos de seguimento: 1, 3 e 7 dias. Medidas hemodinâmicas sistêmicas e do VE foram realizadas para calcular a PPC e determinar a função do VE. Cortes teciduais do coração foram submetidos à coloração com HE e *Sirius red*. A necrose de miócitos, o infiltrado leucocitário e a fração de volume de colágeno foram determinados. O fluxo miocárdico, estimado por microesferas coloridas, a atividade de mieloperoxidase (MPO), a expressão de citocinas e a atividade de metaloproteinase-2 (MMP-2) foram determinados ao final de cada seguimento, todos examinados em duas regiões distintas do VE: SE e não SE. Comparados a sham, os grupos FAC apresentaram (média $\pm$ desvio-padrão, $P < 0,05$) menores pressões sistêmicas no dia 1 (PAS: 116 ± 6 vs. 88 ± 17 ; PAD: 84 ± 13 vs. 51 ± 19 mm Hg/s), no dia 3 (PAS: 121 ± 4 vs. 83 ± 28 ; PAD: 92 ± 5 vs. 46 ± 21 mm Hg/s) e no dia 7 (PAS: 122 ± 6 vs. 96 ± 21 ; PAD: 93 ± 6 vs. 66 ± 21 mm Hg/s); maior pressão diastólica final do VE no dia 1 (7 ± 3 vs. 15 ± 6 mm Hg/s), no dia 3 (7 ± 3 vs. 18 ± 3 mm Hg/s) e no dia 7 (7 ± 3 vs. 18 ± 5 mmHg/s); menor PPC no dia 1 (77 ± 14 vs. 37 ± 18 mmHg/s), no dia 3 (86 ± 5 vs. 29 ± 20 mmHg/s) e no dia 7 (86 ± 6 vs. 48 ± 19 mmHg/s). Menor função sistólica e diastólica do VE no dia 1 (+dP/dt: 7898 ± 4045 vs. 5828 ± 2262 ; -dP/dt: 6626 ± 1717 vs. 4728 ± 863 mmHg/s) e no dia 7 (+dP/dt: 7924 ± 2317 vs. 4564 ± 2044 ; -dP/dt: 6435 ± 1302 vs. 4750 ± 1442 mmHg/s). Houve maior necrose de miócitos no dia 1 no SE (114 ± 5 vs. 208 ± 8) e no não SE (27 ± 3 vs. 42 ± 10) e no dia 3 no SE (82 ± 12 vs. 148 ± 31) e no não SE (21 ± 3 vs. 31 ± 6); maior infiltrado leucocitário no dia 1 no SE (48 ± 5 vs. 84 ± 13) e no não SE (33 ± 4 vs. 40 ± 6), no dia 3 no SE (48 ± 10 vs. 117 ± 13) e no não SE (41 ± 6 vs. 65 ± 8) e no dia 7 no SE (33 ± 5 vs. 50 ± 6) e no não SE (27 ± 6 vs. 38 ± 7); maior fibroplasia no dia 3 no SE ($11 \pm 2,6$ vs.

26±10) e no dia 7 no SE (11±2,3 vs 47±11); maior fibrose no dia 1 no não SE (1,2±0,2 vs. 1,7±0,5), no dia 3 no SE (1,7±0,3 vs. 5,4±0,1) e no não SE (1,4±0,3 vs. 1,8±0,3) e no dia 7 no SE (1,8±0,4 vs. 10,3±2,3) e no não SE (1,7±0,1 vs. 2,8±0,7). O fluxo miocárdico total no dia 7 foi menor, mais intensamente no SE do que no não SE (6.7±1.2 vs. 2.7±1.6 e 7.5±1.3 vs. 4.8±2.6 mL/min/g). Houve maiores níveis de IL-1 β no SE e não SE no dia 1 (1050±145 vs. 4225±792 e 1070±138 vs. 4084±359 pg/mg); de TNF- α no SE no dia 3 (1415±447 vs. 2037±200 e 1387±279 vs. 1412±301 pg/mg) e IL-6 no SE no dia 7 (3499±397 vs. 4955±429 e 3653±331 vs. 4297±743 pg/mg). No grupo FAC, os animais com PPC <60 mmHg comparados àqueles com PPC >60 mmHg apresentaram maior atividade de MMP-2 no SE e no não SE no dia 1 (69.1±7 e 66.1±7.0 vs. 13.2±4.0 e 11.2±3.4 %), no SE no dia 3 (104.7±39.5 e 22.3±9.0 vs. 26.3±11.3 e 11.5±2.7 %) e no SE do dia 7 (60.5±12.7 e 48.7±4.2 vs. 29.2±8.0 e 6.7±5.8 %). A PPC apresentou correlação direta e significativa com o fluxo do SE (R=0,65), e com o fluxo do não SE (R= 0,62). O fluxo do SE, porém não o do não SE, apresentou correlação direta e significativa tanto com a +dP/dt (R=0,62) quanto com a – dP/dt (R=0,67). A PPC apresentou correlação inversa e significativa com a MMP-2 no dia 1 (R=0,86), no dia 3 (R=0,88) e no dia 7 (R=0,93). O remodelamento cardíaco após FAC aguda caracteriza-se por dano isquêmico no SE, resultante da queda da perfusão e implica em disfunção precoce do VE.

Descritores: 1.Ratos wistar 2.Fístula arteriovenosa 3.Pressão de pressão coronariana 4.Remodelamento ventricular 5.Fibrose

SUMMARY

Mazzo FRR. *Low myocardial perfusion and subendocardial ischemia result in left ventricular dysfunction during the acute phase of aortocaval fistula* [dissertation] Sao Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2011. 54p.

Recently, we have demonstrated that fibrosis develops within the subendocardial region (SE) of the left ventricle (LV) in response to chronic volume overload following aortocaval fistula (ACF). Initially low coronary driving pressure (CDP) was associated with subsequent SE fibrosis and LV dysfunction, suggesting that prior low myocardial perfusion may be one of the mechanisms involved in LV remodeling. This study aimed at investigating the role of myocardial blood flow (MBF) in the development of LV remodeling, particularly within SE, during the acute phases of ACF. Wistar rats were submitted to sham (SH) or ACF operations and examined after 1, 3, and 7 days. Apart from haemodynamics, histology (HE- and Sirius red-stained tissue sections), microsphere MBF, and biochemical studies were undertaken in two different LV myocardial regions: SE and non-SE. Compared with SH, ACF showed (mean $\pm$ S.D.) lower systemic and higher LV end-diastolic pressures resulting in lower CDP at days 1 (77 ± 14 vs. 37 ± 18 mmHg/s), 3 (86 ± 5 vs. 29 ± 20 mmHg/s), and 7 (86 ± 6 vs. 48 ± 19 mmHg/s) with lower systolic and diastolic LV function at days 1 (+dP/dt: 7898 ± 4045 vs. 5828 ± 2262 ; -dP/dt: 6626 ± 1717 vs. 4728 ± 863 mmHg/s), and 7 (+dP/dt: 7924 ± 2317 vs. 4564 ± 2044 ; -dP/dt: 6435 ± 1302 vs. 4750 ± 1442 mmHg/s). There was a higher number of myocyte necrotic cells (cells/mm²) within SE (114 ± 5 vs. 208 ± 8) and non-SE (27 ± 3 vs. 42 ± 10) at day 1, and within SE (82 ± 12 vs. 148 ± 31) and non-SE (21 ± 3 vs. 31 ± 6) at day 3; a higher number of leukocyte cells within SE (48 ± 5 vs. 84 ± 13) and non-SE (33 ± 4 vs. 40 ± 6) at day 1, within SE (48 ± 10 vs. 117 ± 13) and non-SE (41 ± 6 vs. 65 ± 8) at day 3, and within SE (33 ± 5 vs. 50 ± 6) and non-SE (27 ± 6 vs. 38 ± 7) at day 7; a greater fibroplasia within SE ($11\pm 2,6$ vs. 26 ± 10) at day 3, and within SE ($11\pm 2,3$ vs. 47 ± 11) at day 7; a greater fibrosis deposition within SE ($1,7\pm 0,3$ vs. $5,4\pm 0,1\%$) and non-SE ($1,4\pm 0,3$ vs. $1,8\pm 0,3\%$) at day 3, and within SE ($1,8\pm 0,4$ vs. $10,3\pm 2,3\%$) and non-SE ($1,7\pm 0,1$ vs. $2,8\pm 0,7\%$) at day 7. Compared with controls, ACF showed increased IL-1 β levels within SE and non-SE at day 1 (1050 ± 145 vs. 4225 ± 792 and 1070 ± 138 vs. 4084 ± 359 pg/mg); increased TNF- α levels within SE at day 3 (1415 ± 447 vs. 2037 ± 200 pg/mg); increased IL-6 levels within SE at day 7 (3499 ± 397 vs. 4955 ± 429 pg/mg). Compared with ACF rats with CDP >60 mmHg, MMP-2 activity was increased in rats with CDP ≤ 60 mmHg within SE and non-SE at day 1 (13.2 ± 4.0 vs. 69.1 ± 7.6 and 11.2 ± 3.4 vs. $66.1\pm 7.0\%$), and within SE at day 3 (26.3 ± 11.3 vs. 104.7 ± 39.5 and 11.5 ± 2.7 vs. $22.3\pm 9.0\%$). At day 7,

MBF was more pronouncedly reduced within SE than within non-SE (6.7 ± 1.2 vs. 2.7 ± 1.6 and 7.5 ± 1.3 vs. 4.8 ± 2.6 mL/min/g). CDP was positively and significantly related to MBF in both SE ($R=0.65$) and non-SE ($R=0.62$). MBF within SE was directly and significantly related to both $+dP/dt$ ($R=0.61$) and $-dP/dt$ ($R=0.67$). CDP showed negative and significant correlations with SE MMP-2 at days 1 ($R=0.86$), 3 ($R=0.88$), and 7 ($R=0.93$). LV remodeling during the acute phases of ACF occurs within the SE predominantly, results from low perfusion pressure, and contributes to early LV dysfunction.

Descriptors: 1.Rats wistar 2.Ateriovenous fistula 3.Coronary driving pressure 4.Ventricular remodeling 5.Fibrosis

1 Introdução

O remodelamento cardíaco está associado a maior morbidade e mortalidade cardiovascular¹.

Ele caracteriza-se por alterações na expressão gênica, molecular e celular que se manifestam por alterações no tamanho, forma e função do coração².

A fístula aorto-cava (FAC) em ratos é um modelo experimental de sobrecarga de volume que resulta em remodelamento cardíaco excêntrico³.

Na sobrecarga de volume há aumento da pré-carga e elevação do estresse diastólico de parede. O coração desenvolve hipertrofia com replicação em série dos sarcômeros, alongamento dos miócitos e aumento do volume das câmaras cardíacas⁴. O aumento do diâmetro do ventrículo esquerdo (VE) implica, entretanto, na elevação do estresse sistólico da parede. A adaptação fisiológica à dilatação do VE consiste no aumento da espessura da parede ventricular. De acordo com a lei de Laplace, este aumento da espessura reduz o estresse sistólico e consequentemente o consumo de oxigênio miocárdico. Desta maneira, a função sistólica é preservada. Se houver desproporção entre o aumento do volume ventricular e da espessura da parede por limitação da fibra cardíaca de hipertrofiar-se, haverá aumento do estresse sistólico e do consumo de oxigênio miocárdico resultando em falência cardíaca⁵.

Nas sobrecargas de pressão, a hipertrofia é do tipo concêntrica. Há aumento da pós-carga com elevação do estresse sistólico da parede. A replicação dos sarcômeros ocorre de forma paralela resultando em aumento da espessura da parede, diminuição do volume das câmaras cardíacas, manutenção do consumo de oxigênio e preservação da função sistólica^{6,7}.

Nas últimas duas décadas do século passado, observou-se que o remodelamento cardíaco acompanha-se de alterações da matriz extracelular, caracterizadas principalmente pela deposição de fibrose intersticial⁸. À fibrose foi atribuído um papel de hipertrofia patológica, uma vez que a ela foi demonstrada estar associada maior morbimortalidade cardiovascular. Mais ainda, o aumento da fibrose foi associado à disfunção e à falência cardíaca^{9,10}. Em contrapartida à sobrecarga de pressão, a hipertrofia que acompanha as sobrecargas de volume, em particular aquela em resposta ao treinamento físico isotônico, é tida como fisiológica por manter a função cardíaca normal. Não há aumento de fibrose no interstício miocárdico^{11,12}.

A participação da matriz extracelular no remodelamento miocárdico que acompanha o modelo experimental de FAC começou a ser investigada recentemente^{13,14}. O aumento de fibras colágenas no miocárdio intersticial é achado ainda controverso. Ele é mais comumente observado nos casos avançados em que já ocorreu falência cardíaca^{13,15}. Por outra, mais que a presença de fibrose intersticial, nossos estudos mostraram que as fibras colágenas depositam-se preferencialmente na região subendocárdica do VE¹⁵.

Para haver dilatação ventricular, além do alongamento das fibras cardíacas é necessária uma readaptação da matriz extracelular. Evidências recentes indicam que a ativação de metaloproteinases (MMP) participa deste processo. De fato, Brower e Janick¹⁶ encontraram ativação de MMP-1, MMP-2 e MMP-9 na primeira semana de FAC. O estresse diastólico parece exercer papel etiopatogênico relevante no desenvolvimento de uma reação inflamatória miocárdica. Observou-se aumento do estresse oxidativo¹⁷, migração e degranulação de mastócitos¹⁸ e ativação de citocinas inflamatórias^{15,19}. A consequência desta inflamação é a ativação das MMPs e o resultado dela a dilatação ventricular. Neste caso, não há aumento de colágeno intersticial e a função cardíaca é mantida enquanto o aumento da espessura da parede for capaz de manter normal o estresse sistólico e o consumo de oxigênio miocárdico¹⁶.

Entretanto, é possível que além do componente hemodinâmico, outros fatores possam contribuir para o remodelamento cardíaco na sobrecarga de volume. Nossos experimentos em ratos com FAC crônica mostraram não haver relação entre a pressão de enchimento do VE, isto é o estresse diastólico, e a ativação da MMP-2¹⁵. Estes mesmos experimentos mostraram que além da deposição de fibrose, ocorrem também aumento de IL-1 β , IL-6, de espécies reativas de oxigênio e ativação de MMP-2, tudo preferencialmente no SE. Mais ainda, a fibrose SE foi relacionada ao grau de disfunção do VE. Finalmente, observamos haver redução da pressão de perfusão coronariana (PPC) como consequência do aumento da pressão de enchimento do VE e da diminuição da pressão sistêmica.

A queda da PPC, observada já na semana um, foi relacionada ao advento posterior da fibrose SE em oito semanas. Assim, é possível que à par da necessidade de adaptar-se à sobrecarga de volume, o coração está ainda sujeito a um processo de isquemia que acomete preferencialmente o SE e ocasiona provavelmente perda de fibras cardíacas com inflamação e fibrose reativas.

Em outro modelo de sobrecarga de volume, o infarto do miocárdio, observamos achados correspondentes¹⁹. Na região do SE remota ao infarto, ocorre necrose de miócitos, inflamação, fibroplasia, infiltração de mastócitos e fibrose reparativa. A lesão do SE foi determinante para a dilatação do VE e associada à disfunção do VE²⁰.

A nossa hipótese é que na sobrecarga de volume a capacidade de adaptação cardíaca é limitada pelo prejuízo que a queda de perfusão acarreta, particularmente no SE, resultando em perda de miócitos. É possível que antes de haver remodelamento geométrico com dilatação ventricular, a isquemia resulte em disfunção ventricular precoce, cuja gravidade depende do grau de queda da PPC.

As fases precoces do remodelamento ventricular em resposta à FAC ainda não foram examinadas. Segundo a nossa hipótese, durante a primeira semana de FAC, esperamos haver redução da PPC, isquemia e necrose de miócitos, reação inflamatória com ativação de citocinas, ativação de MMP e, de acordo com nossos estudos prévios, que estas lesões se apresentem preferencialmente no SE e se relacionem a eventual disfunção miocárdica precoce.

1.1 Objetivo

Investigar a perfusão miocárdica em um modelo agudo de FAC em ratos e as implicações resultantes sobre o remodelamento cardíaco agudo e a função do ventrículo esquerdo.

2 Métodos

2.1 Modelo Biológico

Este estudo foi realizado de acordo com as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e pelo *The Universities Federation for Animals Welfare* e o protocolo experimental foi aprovado pela Cappesq-HCFMUSP (nº1071/08).

Ratos machos Wistar, pesando entre 300 e 350 gramas, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo foram utilizados. Os animais foram divididos em grupos e submetidos à cirurgia de FAC ou à cirurgia fictícia – sham (SH).

Os seguintes grupos experimentais foram constituídos:

1. 18 animais submetidos a cirurgia SH e 25 animais submetidos a FAC foram utilizados para estudo hemodinâmico de 1 dia de seguimento. Destes, 8 animais submetidos a cirurgia SH e 11 animais submetidos a FAC foram utilizados para estudo morfométrico e 9 animais submetidos a cirurgia SH e 14 animais submetidos a FAC foram utilizados para estudo geométrico.
2. 10 animais submetidos a cirurgia SH e 11 animais submetidos a FAC foram utilizados para estudo hemodinâmico de 3 dias de seguimento. Destes, 5 animais submetidos a cirurgia SH e 11 animais submetidos a FAC foram utilizados para estudo

morfométrico e 7 animais submetidos a cirurgia SH e 11 animais submetidos a FAC foram utilizados para estudo geométrico.

3. 18 animais submetidos a cirurgia SH e 27 animais submetidos a FAC foram utilizados para o estudo hemodinâmico de 7 dias de seguimento. Destes, 8 animais submetidos a cirurgia SH e 14 animais submetidos a FAC foram utilizados para estudo morfométrico e 8 animais submetidos a cirurgia SH e 13 animais submetidos a FAC foram utilizados para estudo geométrico.
4. 7 animais submetidos a cirurgia SH e 11 animais a FAC foram utilizados para o estudo do fluxo miocárdico de 7 dias de seguimento.
5. 4 animais com FAC e PPC ≤ 60 mm Hg e 6 animais controles não submetidos a cirurgia foram utilizados para estudo dos níveis de interleucinas e da atividade de mieloperoxidase em 1, 3 e 7 dias.
6. 4 animais com FAC e PPC ≤ 60 mm Hg e 4 animais com FAC e PPC > 60 mmHg foram utilizados para estudo da atividade de MMP-2 em 1, 3 e 7 dias. Os resultados foram normalizados em relação ao coração de um animal controle não submetido a cirurgia.

2.2 Modelo experimental de fístula aorto-cava

O modelo de FAC em ratos correspondeu a uma modificação da técnica descrita por Garcia e Dielbold³. Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 10% (330 mg/kg i.p.)²¹ e submetidos à laparotomia mediana. Os intestinos afastados e a aorta abdominal e veia cava isolados. Foi inserido um *clamp* vascular abaixo da emergência das artérias renais e outro acima da emergência das artérias lombares de modo a interromper a circulação sanguínea. Uma agulha, Jelco 18G, foi inserida na aorta e cuidadosamente avançada até a parede posterior onde 4 a 5 perfurações foram feitas em direção à veia cava. Após a remoção da agulha, a hemostasia foi realizada com administração de cianoacrilato sobre orifício aórtico. Os dois *clamps* foram retirados e a eficiência da fístula foi verificada pela passagem de sangue arterial em direção a cava com o ingurgitamento desta. Os intestinos foram reposicionados e a cavidade abdominal lavada com solução fisiológica em 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 recuperação plena do anestésico.

Os animais foram examinados diariamente e a patência da fístula verificada pela presença de sopro auscultado com auxílio de estetoscópio infantil.

A mortalidade durante o seguimento de 1 dia foi de 22%, em 3 dias de 20% e em 7 dias de 24%.

2.3 Estudo hemodinâmico

As avaliações hemodinâmicas foram realizadas sob anestesia com hidrato de cloral 10% (300mg/kg) intraperitoneal.

Os animais foram entubados oro-traquealmente com Jelco 14G e submetidos à ventilação mecânica (Harvard Rodent Ventilator, model 683) com frequência de 60 ciclos por minuto e volume corrente de 10 ml/kg.

Para medida das pressões do VE e sistêmicas, foi realizada a canulação da artéria carótida comum. Um cateter de policloreto de vinila (0,5 mm de diâmetro), preenchido com solução fisiológica heparinizada (0,1 mL, 100UI, Roche), foi introduzido até o VE e acoplado ao transdutor de pressão para identificação e registro das curvas hemodinâmicas ventriculares. Na sequência, o cateter foi removido do coração permanecendo na carótida para registro das curvas hemodinâmicas sistêmicas.

Os transdutores de pressão foram acoplados a um pré-amplificador calibrado (General Purpose Amplifier 4 – modelo 2, Stemtech Inc., Wisconsin, EUA) e um sistema computadorizado de aquisição (Windaq/Dataq, Dataq Instruments Inc., Akron, Ohio, EUA). Registros hemodinâmicos de 10 minutos de duração foram computados após a estabilização das curvas.

Os seguintes parâmetros foram determinados: pressão arterial sistólica sistêmica (PAS, mm Hg), pressão diastólica sistêmica (PAD, mm Hg), pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE, mm Hg) e pressão diastólica final do VE (PDfVE, mm Hg).

Foi considerada como índice de função sistólica a velocidade máxima de elevação da pressão ventricular durante a sístole ($+dP/dt$, mmHg/s) e índice de função diastólica a velocidade máxima de diminuição da pressão ventricular durante a diástole ($-dP/dt$, mmHg/s).

A pressão de pulso (PP, mm Hg) foi obtida pela diferença entre a PAS e a PAD.

A PPC (PPC, mm Hg) foi calculada como a diferença entre a PAD e a PDfVE²⁰.

2.4 Estudo morfométrico

Após a avaliação hemodinâmica e o sacrifício, os animais receberam cloreto de cádmio (3 ml, 100 mM, Sigma). Em seguida, o coração foi perfundido com solução fisiológica e fixado com solução tamponada de formol 10%, sob pressão de perfusão correspondente à PAD anterior à eutanásia.

O coração, pulmões e fígado foram removidos, limpos e pesados. Os pesos foram normalizados pelo peso corporal final dos animais, para obtenção do peso relativo (g/kg).

Uma pequena porção dos pulmões e fígado, de aproximadamente 60 mg, foi separada, pesada e colocada em estufa a 37°C. Após 7 dias, os fragmentos foram novamente pesados para obtenção do peso final referente a matéria seca. Os pesos secos dos pulmões e do fígado foram usados

para calcular a porcentagem de água contida em cada tecido, o que estimou o grau de congestão dos órgãos.

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

As áreas da cavidade e da parede do VE incluindo o septo interventricular foram determinadas utilizando-se fotografias digitais obtidas com uma lente óptica tele-macro (Carl Zeiss, Vario Tessar, 2,8-5,8/5,35-21,4) de cortes corados com hematoxilina-eosina, e analisados em programa de análise de imagens (Image J, NIH).

A adequação da hipertrofia excêntrica do VE foi estimada pela razão entre a área da parede ventricular esquerda $(Pr)_{ve}$ pela área total do VE $(total)_{ve}$.

As medidas histomorfométricas foram realizadas utilizando-se um sistema computadorizado de análise de imagens (Nikon Image System Elements AR 3.1, Japão).

A avaliação da necrose de miócitos, inflamação, hipertrofia de miócitos, fibroplasia e fibrose foi realizada, separadamente, em duas regiões distintas: SE e não SE. O SE foi definido como o terço endocárdico da parede ventricular e o não SE, como os dois terços restantes.

Para a estimativa de necrose de miócitos foram utilizados cortes corados com hematoxilina-eosina sob aumento de 1000x. A necrose foi identificada pelo aspecto do núcleo (picnose ou cariólise) e pelo aspecto do citoplasma (contração de bandas, vacuolização, hipereosinofilia). A necrose

de miócitos foi estimada pela razão entre o número de células com alterações nucleares e/ou citoplasmáticas e a área do miocárdio (células/mm²)²².

Para estimativa da infiltração leucocitária foram utilizados cortes corados com hematoxilina-eosina sob aumento de 1000x. As células foram identificadas morfológicamente pelo aspecto nuclear e citoplasmático. As células com aspecto morfológico de fibroblastos, de células endoteliais ou de miócitos foram identificadas e excluídas da contagem²³. A infiltração de leucócitos foi estimada pela razão entre o número de leucócitos e a área do miocárdio (células/mm²).

Para a avaliação de hipertrofia de miócitos, foram utilizados cortes histológicos corados com HE, sob aumento de 1000x. A hipertrofia foi medida pelo menor diâmetro dos miócitos em torno do núcleo (μm). Foram selecionados apenas miócitos do septo interventricular com disposição longitudinal e núcleos ovalados e centralizados.

Para a estimativa de fibroplasia, os miofibroblastos foram marcados utilizando-se a técnica de imunohistoquímica com anticorpo de camundongo anti-α-actina de células musculares lisas humanas (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) com diluição de 1:800. A revelação foi realizada pelo método da diaminobenzidina-peroxidase, seguindo o protocolo descrito pelo fabricante (Dako Cytomation LSAB+ System-HRP, California, USA). Os cortes foram contracorados com hematoxilina. A fibroplasia foi estimada pela quantificação do número de células marcadas positivamente para α-actina por área do miocárdio (células/mm²). Apenas células com aspecto alongado, núcleo fracamente basófilo e sem conformação vascular foram consideradas.

Para a avaliação da fibrose foram utilizados cortes histológicos corados com Sirius red²⁴, sob aumento de 580x. A fibrose foi estimada pela fração de volume de colágeno (FVC, %), calculada pela razão percentual entre a área do tecido miocárdico corado positivamente e a área total do miocárdio²⁵

A região SE e a região não SE foram examinadas em 15 campos por corte histológico para necrose de miócitos, infiltrado leucocitário e fibroplasia. Para a hipertrofia de miócitos e a deposição de fibrose foram examinados 20 campos por corte histológico.

2.5 Estudo do fluxo miocárdico

Ao final da semana 1 foram realizadas as medidas do fluxo miocárdico pelo método de microesferas coloridas²⁶.

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 10% intraperitoneal (330 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 (0,5 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 sonificada 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 sonificada por 1 minuto. Uma das extremidades de um tubo de polietileno, preenchido com 180 μ m da solução final, foi conectada ao cateter ventricular esquerdo e a outra extremidade conectada a uma seringa contendo 0,5mL 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 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 et al.²⁷ 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 a 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 1 mL 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 1 L de solução Triton-X 100 10% (reagente I).

No tubo Falcom 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 *vórtex* 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 U1100, Japão) a 448 nm usando cubeta de quartzo, com largura de banda de <1,8 nm.

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 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 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 cálculo do fluxo renal utilizou-se a seguinte fórmula:

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

2.6 Estudo da atividade de MMP-2, atividade da mieloperoxidase e das citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10

Ao final de cada seguimento, os animais foram sacrificados e o coração foi rapidamente removido. Um corte coronal correspondente à porção medial do VE foi obtido no plano equatorial e dividido em duas regiões: SE e não SE. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido.

2.6.1 MMP-2

Para o estudo da atividade de MMP-2, as amostras das duas regiões do VE, SE e não SE (100 mg para cada 1 ml de tampão) foram pulverizadas em nitrogênio líquido e homogeneizada em tampão de lise Triton X-100 (1% Triton X-100, 10% glicerol, 135 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8,0). Após centrifugação (14000 g, 10 minutos, 4°C), o sobrenadante foi coletado, aliquoteado e estocado a -80°C. A concentração de proteínas foi quantificada pelo método de Bradford (Bio-Rad).

A atividade da MMP-2 foi avaliada em cada uma das duas regiões do VE pelo método da zimografia. Vinte e cinco microgramas de proteína foram acrescidas de tampão (2% de SDS, 60 mM Tris pH 6,8, 30% de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol), carregadas em gel de poliacrilamida a 10% com 0,2% de gelatina e submetidas à eletroforese. O gel foi lavado em tampão de Tris (10 mM de Tris, pH 8,0 com 2,5% de Triton X-100) para remoção do SDS e renaturação das proteínas. Em seguida, o gel foi incubado em solução tampão reveladora do gel (50 mM de Tris pH 8,8, 5 mM CaCl₂, 0,02% NaN₃) por 20 horas a 37°C. A seguir, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 (Amersham) por 4 horas e descorado em solução de metanol e ácido acético glacial (4:1) em água destilada. As MMP foram identificadas como bandas claras de lise em fundo azul.

Para confirmar se as bandas de lise observadas nos zimogramas foram devido à ação de metaloproteinases da matriz, foram realizados experimentos para controle negativo. Metaloproteinases dependem de cálcio e metais pesados (zinco) para exercer sua atividade enzimática.

Dessa forma, foi adicionado ao tampão de revelação dos zimogramas 10 mM de EDTA (quelante de cálcio) ou 5 mM de 1,10 fenantrolina (quelante de metais pesados). Esses quelantes inibem a ação das metaloproteinases, conseqüentemente, não se observou a formação das bandas gelatinolíticas claras observadas nos zimogramas.

As bandas foram quantificadas por densitometria utilizando-se o programa Image Quant Molecular Dynamics. Os resultados foram normalizados em relação aos extratos das regiões do SE e não SE de um rato não operado.

2.6.2 Mieloperoxidase (MPO)

Para o estudo do índice de infiltração tecidual de neutrófilos mediu-se a atividade de MPO nas regiões SE e não SE do VE. Os tecidos (50 mg para cada 1 mL de tampão) foram homogeneizados em brometo de hexa-decil-trimetilamonio 0,5% e ácido 3-N-morfolinopropanosulfônico 10 mM. O homogenato foi centrifugado a 15.000 g por 40 minutos, a 4°C²⁸. 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-se um leitor de microplacas. As medidas protéicas foram realizadas pelo método de Bradford (Bio-Rad) e os resultados expressos em mU/mg de proteínas. Os resultados foram normalizados em relação aos extratos das regiões do SE e não SE de um rato não operado.

2.6.3 Interleucinas

Para o estudo das citocinas foram utilizadas amostras das duas regiões do VE. Aproximadamente 100 mg de tecido foram homogeneizados em 1 ml de solução de RIPA (100 mM de Tris-HCl pH 7.5, 1% de desoxicolato de sódio, 1% de NP40, 150 mM NaCl, 0.1% de SDS). Os extratos foram centrifugados (4.000 g, 20 minutos, 4°C) e os sobrenadantes foram aliquotados e estocados a -80°C. As medidas foram normalizadas pela concentração de proteínas na solução (Método de Bradford – Bio-Rad).

As quantificações de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10 foram realizadas por ELISA, com kit da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)²⁹. Foram utilizadas placas de 96 poços adsorvidas com anticorpo de captura monoclonal anti-citocina de rato, diluído em PBS por 12 horas, lavadas com solução de PBS contendo 0,05% de Tween 20 e bloqueadas para sítios inespecíficos com PBS contendo 1% de BSA (soro albumina bovina – Sigma) por 1 hora. As amostras e os padrões foram colocados nos poços e incubados por 2 horas. Ao final do período, as placas foram lavadas para adição do anticorpo de detecção, foi conjugada a peroxidase, e incubadas por 2 horas. As placas foram novamente lavadas. Ao final das lavagens, foi adicionado o tetrametilbenzidina, que reagiu por 15 a 20 minutos. A reação peroxidase-tetrametilbenzidina gera cor azul. Ao final da incubação adicionou-se solução de parada (H₂SO₄ – 2N) obtendo-se coloração amarela. As citocinas foram quantificadas pela leitura da absorbância (450 nm) e os resultados foram expressos em picogramas de antígeno por miligrama de proteína.

Os resultados foram normalizados em relação aos extratos das regiões do SE e não SE de um rato não operado.

2.6.4 Estatística

Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. O tipo de distribuição das variáveis e a hipótese de igualdade da variância foram testados em todos os casos.

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

A análise de variância para medidas repetidas foi utilizada para a análise morfométrica, fluxo miocárdico, mieloperoxidase e metaloproteinases. O método de Bonferrone, Duncan ou Turkey foram utilizados para comparações múltiplas.

A regressão linear foi utilizada para testar as associações das metaloproteinases com a PPC, da PPC com o fluxo miocárdico e do fluxo miocárdico com a função ventricular.

Foi considerado estatisticamente significativo o valor de $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas pelo programa Sigma Stat Statistical Software (versão 3.1; Jandel Scientific Software, San Rafael, CA, EUA) e Statistical Analyses System (versão 9.1; SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA).

3 Resultados

3.1 Estudo Hemodinâmico

Os resultados do estudo hemodinâmico nos três períodos de seguimento: 1, 3 e 7 dias estão apresentados na tabela 1. Em comparação aos grupos SH, a PAS e a PAD foram menores e a PDfVE maior nos 3 períodos. Em consequência, a PPC foi 48% menor em 1 dia, 52% menor em 3 dias e 56% menor em 7 dias. Houve disfunção sistólica e diastólica do VE nos dias 1 e 7.

Tabela 1. Dados hemodinâmicos

Grupos	SH1d	FAC1d	SH3d	FAC3d	SH7d	FAC7d
PP (mm Hg)	33±10	37±11	29±5	38±11	29±6	31±8
PAS (mm Hg)	116±6	88±17*	121±4	83±28*	122±6	96±21*
PAD (mm Hg)	84±13	51±19*	92±5	46±21*	93±6	66±21*
PPC (mm Hg)	77±14	37±18*	86±5	29±20*	86±6	48±19*
PDfVE (mm Hg)	7±3	15±6*	7±3	18±3*	7±3	18±5*
+dP/dt (mm Hg/s)	7898±4045	5828±2262*	5594±571	4553±983*	7924±2317	4564±2044*
-dP/dt (mm Hg/s)	6626±1717	4728±863*	5309±1325	4528±803	6435±1302	4750±1442*

SH, grupo sham; FAC, grupo fistula aorto-cava; 1d, um dia; 3d, três dias; 7d, sete dias; PP, pressão de pulso; PAS, pressão arterial sistólica; PAD pressão arterial diastólica; PPC, pressão de perfusão coronariana; PDfVE, pressão diastólica final de ventrículo esquerdo; +dP/dt, índice de função sistólica do ventrículo esquerdo; -dP/dt, índice de função diastólica de ventrículo esquerdo. * P <0,05 vs. SH.

3.2 Estudo morfométrico

Os resultados do estudo morfométrico estão apresentados na tabela 2. Comparados aos grupos SH, o peso seco dos pulmões foi maior nos 3 períodos de seguimento e o peso seco do fígado foi maior em 7 dias, apenas. Houve dilatação do VE, onde a relação $(Pr/total)_{ve}$ foi 19% menor em 3 dias e 22% menor em 7 dias. A hipertrofia de miócitos ocorreu em 3 dias, onde foi 28% maior e em 7 dias, onde foi 21% maior.

A necrose dos miócitos nos grupos FAC foi observada nos 2 períodos de seguimento mais precoces: 1 dia e 3 dias. O número de miócitos com sinais de necrose foi 5 vezes maior no SE se comparado ao não SE nestes 2 períodos.

A infiltração leucocitária nos grupos FAC foi observada nos 3 períodos de seguimento. Nos 2 períodos mais precoces o número de leucócitos foi 2 vezes maior no SE.

A fibroplasia foi maior nos dois últimos períodos de seguimento, em que o número de miofibroblastos foi 2 e 3 vezes maior no SE do que no não SE, respectivamente.

A deposição de colágeno foi maior em FAC, particularmente no SE dos 2 últimos períodos de seguimento, em que a FVC foi 3 vezes maior no SE comparada ao não SE.

Na figura 1 são apresentadas fotomicrografias representantes das alterações histológicas observadas no remodelamento do SE em cada um

dos 3 períodos de seguimento investigados: necrose de miócitos em 1 dia, infiltração de leucócitos em 3 dias, fibroplasia e fibrose em 7 dias.

Tabela 2. Dados morfométricos

Grupos		SH 1d	FAC 1d	SH 3d	FAC 3d	SH 7d	FAC 7d
PC (g/Kg)		3,2±0,3	3,5±0,6	3,6±0,1	3,3±0,3	3,4±0,2	3,2±0,8
Peso seco (%)	Pul	76,5±4,	83,7±4,0*	79,0±2	82,8±2,0*	78,1±2,0	80,7±1,0*
	Fig	75,2±0,1	74,7±2,0	73,2±0,5	74,0±3	73,8±0,4	78,3±1,0*
Área (Pr/total) _{ve}		0,77±0,04	0,71±0,1	0,88±0,02	0,71±0,15*	0,77±0,07	0,60±0,12*
Hipertrofia de miócitos (µm)		10±0,6	11±1,4	10±0,2	14±0,1*	11±1,1	14±1,0*
Necrose de miócitos (células/mm ²)	SE	114±5 [†]	208±8* [†]	82±12 [†]	148±31* [†]	34±12 [†]	42±9 [†]
	NSE	27±3	42±10*	21±3	31±6*	17±2	21±4
Leucócitos (células/mm ²)	SE	48±5 [†]	84±13* [†]	48±10	117±13* [†]	33±5 [†]	50±6* [†]
	NSE	33±4	40±6*	41±6	65±8*	27±6	38±7*
Fibroplasia (células/mm ²)	SE	10,9±4,0	14,6±15,7	10,8±2,6	26,1±10,0* [†]	10,9±2,3	47,5±12,0* [†]
	NSE	10,9±1,6	10,9±2,6	9,8±1,6	11,7±2,6	10,8±2,2	15,3±2,5*
FVC (%)	SE	1,2±0,4	1,2±0,2 [†]	1,7±0,3	5,4±0,1* [†]	1,8±0,4	10,3±2,3* [†]
	NSE	1,2±0,2	1,7±0,5*	1,4±0,3	1,8±0,1*	1,7±0,	2,8±0,7*

SH, grupo sham; FAC, grupo fístula aorto-cava; 1d, um dia; 3d, três dias; 7d, sete dias; PC, peso relativo do coração; Pul, pulmão; Fig, fígado; Área (Pr/total)_{ve}, razão entre a área da parede e a área total do ventrículo esquerdo; FVC, fração de volume de colágeno. *, P <0,05 vs. SH; [†], vs. NSE.

Figura 1. Fotomicrografias representativas do remodelamento subendocárdico do ventrículo esquerdo durante a fase aguda após fístula aorto-cava. No dia 1, observa-se necrose celular de miócitos corados com HE apresentando cariólise nuclear (seta), vacuolização citoplasmática e contração de bandas (cabeça de seta) (painel a). No dia 3, infiltrado inflamatório evidenciado com coloração HE (painel b). No dia 7, fibroplasia evidenciada por miofibroblastos corados em marrom pela imunohistoquímica para alfa-actina (painel c), e fibrose evidenciada por depósito de fibras colágenas coradas em vermelho com Sirius red (painel d)

3.3 Estudo do fluxo miocárdico

Os animais do grupo FAC submetidos ao estudo do fluxo miocárdico apresentaram alterações hemodinâmicas semelhantes àqueles dos grupos FAC de 7 dias, ou seja, menores pressão sistêmica, maior PDfVE, menor PPC e disfunção sistólica e diastólica (Tabela 3).

Tabela 3. Dados hemodinâmicos para a medida do fluxo miocárdico, em 7 dias

Grupos	SH 7d	FAC 7d
PP (mm Hg)	30±2	39±3*
PAS (mm Hg)	122±1	88±4*
PAD (mm Hg)	92±2	49±3*
PPC (mm Hg)	85±2	29±2*
PDfVE (mm Hg)	7±1	20±1*
+dP/dt (mm Hg/s)	6366±239	3855±395*
-dP/dt (mm Hg/s)	6235±244	3500±394*

SH, grupo sham; FAC, grupo fístula aorto-cava; 7d, sete dias; n, número de animais; PP, pressão de pulso; PAS, pressão arterial sistólica; PAD pressão arterial diastólica; PPC, pressão de perfusão coronariana; PD2VE, pressão diastólica final de ventrículo esquerdo; +dP/dt, índice de função sistólica do ventrículo esquerdo; -dP/dt, índice de função diastólica de ventrículo esquerdo. *P <0,05 vs SH.

Na figura 2, estão representados os resultados do fluxo miocárdico. Comparado ao grupo SH, o grupo FAC apresentou menor fluxo. O hipofluxo ocorreu preferencialmente no SE.

Na figura 3, estão representadas as relações avaliadas entre a PPC e o fluxo miocárdico. Houve correlação positiva entre a PPC e o fluxo miocárdico total, o fluxo do SE e o fluxo do não SE.

Figura 2. Fluxo miocárdico das regiões SE e não SE do ventrículo esquerdo em 7 dias. FAC, fístula aorto-cava; SH, sham. *, $P < 0,05$ vs. SH SE; #, $P < 0,05$ vs. SH não SE; †, $P < 0,05$ vs. FAC não SE

Figura 3. Relações da PPC com os fluxos das regiões SE (gráfico superior), não SE (gráfico inferior) do ventrículo esquerdo em 7 dias

Houve correlação positiva entre o fluxo do SE com a $+dP/dt$ e com $-dP/dt$ (Figura 4). Por outra, não houve correlação estatisticamente significativa do fluxo do não SE com os índices de função do VE.

Figura 4. Relação da PPC com a função sistólica (gráfico superior) e diastólica (gráfico inferior) em 7 dias

3.4 Mieloperoxidase

A PPC dos grupos FAC submetidos ao estudo da atividade miocárdica de MPO foi 36 ± 16 mm Hg em 1 dia, 47 ± 6 mm Hg em 3 dias e 55 ± 3 mm Hg em 7 dias. Os resultados estão representados na figura 5. Comparados ao miocárdio do animal controle, os 3 grupos FAC apresentaram maior atividade de MPO tanto no SE, quanto no não SE. A atividade de MPO não foi diferente entre o SE e o não SE.

Figura 5. Atividade de MPO das regiões SE e não SE do ventrículo esquerdo em 1, 3 e 7 dias. MPO, atividade de mieloperoxidase; *, $P < 0,05$ vs. Controle SE; †, $P < 0,05$ vs. Controle nãoSE. FAC, fístula aorto-cava. Todos animais apresentavam PPC ≤ 60 mm Hg

3.5 Interleucinas

A PPC dos grupos FAC submetidos ao estudo das interleucinas foi 36 ± 16 mm Hg em 1 dia, 47 ± 6 mm Hg em 3 dias e 55 ± 3 mm Hg em 7 dias. Os resultados dos níveis de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10 estão representados nas figuras 6, 7, 8 e 9, respectivamente.

Quando comparado ao miocárdio do animal controle, o grupo FAC de 1 dia apresentou maior IL-1 β tanto no SE, quanto no não SE. A IL-1 β não foi diferente nos grupos FAC de 3 dias e 7 dias.

Comparado ao miocárdio do animal controle, o grupo FAC de 3 dias apresentou maior TNF- α , mas apenas no SE.

Comparado ao miocárdio do animal controle, o grupo FAC de 7 dias apresentou maior IL-6, mas apenas no SE.

Comparados ao miocárdio do animal controle, os grupos FAC não apresentaram IL-10 diferença tanto no SE, quanto no não SE.

Figura 6. Níveis de IL-1 β das regiões SE e não SE do ventrículo esquerdo em 1, 3 e 7 dias. *, $P < 0,05$ vs. Controle SE; †, $P < 0,05$ vs. Controle não SE. FAC, fístula aorto-cava. Todos animais apresentavam PPC ≤ 60 mm Hg

Figura 7. Níveis de TNF- α das regiões SE e não SE do ventrículo esquerdo em 1, 3 e 7 dias. *, $P < 0,05$ vs. Controle SE; †, $P < 0,05$ vs. Controle não SE. FAC, fístula aorto-cava. Todos animais apresentavam PPC ≤ 60 mm Hg

Figura 8. Níveis de IL-6 das regiões SE e não SE do ventrículo esquerdo em 1,3 e 7 dias. *, $P < 0,05$ vs. Controle SE; †, $P < 0,05$ vs. Controle não SE. FAC, fístula aorto-cava. Todos animais apresentavam PPC ≤ 60 mm Hg

Figura 9. Níveis de IL-10 das regiões SE e não SE do ventrículo esquerdo FAC, fístula aorto-cava. Todos animais apresentavam PPC ≤ 60 mm Hg

3.6 Metaloproteinase-2

A atividade de MMP-2 foi determinada nos grupos FAC com PPC ≤ 60 mm Hg (37 ± 16 , 47 ± 6 , 55 ± 3 mm Hg em 1, 3, 7 dias, respectivamente) e com PPC > 60 mm Hg (78 ± 6 , 64 ± 3 , 64 ± 1 mmHg em 1, 3, 7 dias, respectivamente).

Em 1 dia, a atividade de MMP-2 dos animais com PPC ≤ 60 mm Hg foi 5 vezes maior no SE e no não SE comparada com o SE e o não SE dos animais com PPC > 60 mm Hg. Nos animais com PPC ≤ 60 mm Hg a atividade de MMP-2 não diferiu entre as 2 regiões (Figura 10).

Figura 10. Atividade de MMP-2 em 1 dia na região SE e não SE do ventrículo esquerdo de ratos com fístula aorto-cava (FAC) com PPC ≤ 60 mm Hg e > 60 mm Hg. †, $P < 0,05$ vs. > 60 mm Hg SE; #, $P < 0,05$ vs. > 60 mm Hg não SE

Em 3 dias, a atividade de MMP-2 dos animais com PPC ≤ 60 mm Hg foi 5 vezes maior no SE comparada com o não SE; e também com o SE e o não SE dos animais com PPC > 60 mm Hg. A atividade de MMP-2 do não SE dos animais com PPC ≤ 60 mm Hg não diferiu daquela dos animais com PPC > 60 mm Hg (Figura 11).

Figura 11. Atividade de MMP-2 em 3 dias na região SE e não SE do ventrículo esquerdo de ratos com fístula aorto-cava (FAC) com PPC ≤ 60 mm Hg e > 60 mm Hg. *, $P < 0,05$ vs. ≤ 60 mm Hg não SE; †, $P < 0,05$ vs. > 60 mm Hg SE; #, $P < 0,05$ vs. > 60 mm Hg não SE

Em 7 dias, a atividade de MMP-2 dos animais com PPC ≤ 60 mm Hg foi maior, particularmente no SE, comparada com o SE e o não SE dos animais com PPC >60 mm Hg. Nos animais com PPC ≤ 60 mm Hg a atividade de MMP-2 não diferiu entre as 2 regiões (Figura 12).

Figura 12. Atividade de MMP-2 em 7 dias na região SE e não SE do ventrículo esquerdo de ratos com fístula aorto-cava (FAC) com PPC ≤ 60 mm Hg e >60 mm Hg. †, P $<0,05$ vs. >60 mm Hg SE; #, P $<0,05$ vs. >60 mm Hg não SE

Foram observadas correlações inversas importantes entre a PPC e a atividade de MMP-2 em 1, 3 e 7 dias (Figura 13).

Figura 13. Relações da pressão de perfusão coronariana (PPC) com a atividade MMP-2 no ventrículo esquerdo em 1 dia (gráfico superior), em 3

dias (gráfico inferior esquerdo) e em 7 dias (gráfico inferior direito)

4 Sumário

O presente trabalho demonstrou que durante primeira semana após a realização de fístula aorto-cava em ratos:

1. a pressão sistêmica é menor e a PDfVE é maior, resultando em PPC menor;
2. há disfunção sistólica e diastólica e insuficiência cardíaca;
3. há alterações morfométricas seqüenciais caracterizadas por necrose de miócitos, infiltrado leucocitário e fibrose, preferencialmente no SE;
4. o fluxo miocárdico é menor, principalmente no SE;
5. a atividade de MPO é maior no SE e no não SE nos 3 períodos; a IL-1 β é maior no SE e não SE em 1 dia, o TNF- α é maior no SE em 3 dias e a IL-6 é maior no SE em 7 dias;
6. a atividade de MMP-2 é maior no SE, e também no não SE, quando a PPC é PPC <60 mm Hg;
7. a PPC relaciona-se diretamente com o fluxo miocárdico;
8. a PPC relaciona-se inversamente com a atividade de MMP;
9. o fluxo miocárdico relaciona-se diretamente com a função do VE, tanto sistólica, quanto diastólica.

5 Discussão

Em estudo prévio de FAC crônica em ratos¹⁵, observamos o desenvolvimento de hipertrofia do VE com aumento de fibrose miocárdica predominantemente no SE. O remodelamento excêntrico acompanhou-se de disfunção sistólica e diastólica. A disfunção foi relacionada com a fibrose presente no SE, particularmente. Houve diminuição da PPC como resultado de queda da pressão sistêmica e da elevação da PDfVE. Esta diminuição foi associada a sinais de isquemia e de inflamação no SE, e foi determinante da fibrose resultante nesta região. A importância da diminuição da perfusão miocárdica e do dano SE para o remodelamento patológico do VE no modelo experimental de FAC ainda não foi inteiramente esclarecida. Em particular, as alterações estruturais e funcionais nas fases precoces após FAC são desconhecidas.

O presente estudo foi realizado para investigar a estrutura e a função do VE na primeira semana após realização de FAC em ratos, com atenção à perfusão do SE e às consequências para a função ventricular. Observamos o aparecimento de necrose de miócitos agudamente, seguido de inflamação, de fibroplasia e de fibrose. Todas estas alterações patológicas encontradas principalmente no SE.

Houve diminuição da PPC que implicou em queda da perfusão miocárdica demonstrada 7 dias após FAC. De fato, os valores persistentemente menores do que 60 mmHg estão abaixo dos limites de auto-

regulação do fluxo miocárdico³⁰. Nestes níveis, é a PPC que determina o fluxo diretamente, o que foi comprovado pela correlação positiva observada entre PPC e fluxo tanto no SE, quanto no não SE. O fluxo miocárdico, por sua vez, apresentou correlação direta com a função do VE. De forma interessante, o hipofluxo do SE, mas não o do não SE, associou-se à disfunção, implicando o dano isquêmico regional do SE com a incapacidade do coração manter agudamente a função ventricular, neste modelo.

Na primeira semana após FAC, em corroboração com estudos prévios^{16,31,32}, o VE já apresentou remodelamento excêntrico. Esta hipertrofia, entretanto não foi adaptativa e acompanhou-se de insuficiência cardíaca, com aumento do peso dos pulmões e do fígado.

É reconhecida a participação da ativação de MMPs miocárdicas, associada à infiltração de neutrófilos, no mecanismo fisiopatológico que resulta em remodelamento excêntrico em resposta à FAC³¹. A implicação das MMPs foi comprovada pela prevenção da dilatação e da disfunção com o uso de drogas inibidoras de sua ativação^{14,32}. Assim, quando exagerada, a ativação de MMPs pode resultar em remodelamento patológico, na medida em que o aumento da espessura da parede for insuficiente para neutralizar a elevação do estresse sistólico que acompanha a dilatação. Em nosso estudo de FAC crônica¹⁵, observamos que, ao contrário da PDfVE, era a baixa PPC e a consequente fibrose SE que determinavam a disfunção do VE. Houve ainda, correlação inversa marcante entre a PPC e a ativação de MMP-2 no SE. Estes dados sugeriram que mais que a pré-carga, era a perfusão comprometida a responsável por isquemia, inflamação, ativação de MMPs e

disfunção. E mais, que o dano maior, incluindo a maior ativação de MMPs, era observado no SE.

No presente estudo, demonstramos haver associação entre a diminuição da PPC e a ativação de MMP-2 no SE. A ativação de MMP-2 inicia-se precocemente; ela acompanha a necrose de miócitos observada em 1 dia, é maior durante o processo inflamatório predominante em 3 dias, e ainda está elevada, embora menos, 7 dias após FAC. Esses resultados da fase aguda corroboram com aqueles já descritos na fase crônica¹⁵ e indicam que a ativação de MMPs responde a um processo de isquemia miocárdica resultado da queda da pressão de perfusão. O papel determinante da isquemia pode ser mais bem estimado pela quantidade observada de miócitos que apresentavam sinais patológicos de necrose: cerca de 10% das fibras do SE no dia 1, o que corresponde a 3 a 4% do total de miócitos. Mais, a necrose também atingiu o não SE e persistiu por até 3 dias após FAC.

Além da necrose, a inflamação local também contribui para a disfunção ventricular. É reconhecida a associação entre níveis de citocinas e remodelamento patológico cardíaco³³. Níveis elevados de TNF- α e IL-1 β foram relacionados a fibrose, a apoptose, a hipertrofia de miócitos, a dilatação ventricular e a disfunção sistólica³⁴. No presente estudo, o aumento miocárdico de TNF- α , IL-6, IL-1 β , o infiltrado de leucócitos e a ativação de MPO aconteceram até 7 dias após a FAC. Previamente, já havíamos observado que a inflamação persiste até a fase crônica¹⁵, quando a ativação de MPO e o aumento de citocinas ainda ocorrem no SE, predominantemente.

É sabido que o SE é a primeira região a sofrer as consequências negativas da isquemia e de forma mais marcante. Nesta região, com menor número de vasos colaterais, a atividade metabólica, a tensão e a extração de oxigênio são mais elevadas do que no restante do miocárdio^{36,37}. Assim, o SE é a região com mais necrose de miócitos nos infartos não transmurais, e a primeira região comprometida nos infartos transmurais³⁸. No modelo experimental de infarto em ratos, observamos dano estrutural da região do miocárdio remota ao infarto, mais uma vez predominantemente no SE, e de características patológicas semelhantes às aquelas aqui descritas no modelo de FAC²⁰. Neste modelo, foi a queda da PPC que mais bem explicou a dilatação e a disfunção do VE que ocorreram durante o remodelamento¹⁵.

Os resultados do presente trabalho sugerem que o miocárdio apresenta capacidade limitada de adaptação ao aumento da pré-carga por perda de miócitos, principalmente no SE, resultante da diminuída pressão de perfusão e do hipofluxo. Como ocorre no infarto, a capacidade de adaptação cardíaca dependerá da quantidade de perda de miócitos viáveis. Tanto na FAC, como no IAM, o diâmetro dos miócitos remanescentes aumenta, mas o espessamento da parede resultante não é suficiente para impedir a disfunção ventricular. Quanto maior a FAC, maior a queda esperada da PPC e, em consequência, pior a disfunção. Assim, os presentes resultados indicam que o modelo de FAC implica em insuficiência cardíaca aguda perpetuada e agravada pela queda da PPC com limitação da capacidade de adaptação do miocárdio à sobrecarga de volume por perda isquêmica de fibras cardíacas.

6 Limitações

A hipertrofia excêntrica pode ser melhor avaliada *in vivo* com métodos não invasivos como o ecocardiograma. De fato, mesmo com o uso de equipamento antigo foi possível detectar, medir e comparar a dilatação do VE e o grau de hipertrofia miocárdica na FAC crônica¹⁵. No presente estudo de FAC aguda, o acesso distante ao aparelho inviabilizou seu emprego para não aumentar a taxa de mortalidade. Outra forma de quantificar a hipertrofia excêntrica, porém *ex vivo*, é por microscopia eletrônica, medindo a extensão dos sarcômeros³⁹. A opção de não realizá-la deveu-se a escrúpulos éticos diante do elevado número de animais envolvidos neste projeto.

No grupo SH houve dano SE, embora significativamente menor do que nos grupos FAC. Observamos necrose e infiltração leucocitária de pequena monta que, entretanto, não resultaram em fibrose evidente. Os valores de FVC medidos nesses animais SH são compatíveis com o conteúdo de colágeno do miocárdio normal. Entre as causas de dano SE nos controles SH, podem estar envolvidos o procedimento cirúrgico e a anestesia. Mesmo de pequena monta, o comprometimento do retorno venoso e a diminuição das pressões sistêmicas ocasionados pela ventilação por pressão positiva poderiam comprometer agudamente a perfusão ideal do miocárdio. O papel de diferentes anestésicos com respostas hemodinâmicas diversas sobre perfusão e a integridade do SE é projeto de estudo a ser executado proximo em nosso laboratório. Ainda, há que ser

investigado em que medida a injúria peritoneal da cirurgia fictícia acarreta em diminuição do retorno venoso por sequestro de líquidos no compartimento extravascular e resulta em queda da pressão sistêmica.

O fato de não conhecermos a magnitude da FAC implica em dúvidas quanto o grau de sobrecarga de volume a que os animais foram submetidos. Grosseiramente, o tamanho da FAC pode ser estimado pela pressão de pulso sistêmica. Na FAC crônica, havia aumento da pressão de pulso¹⁵. Na FAC aguda, o aumento não foi significativo provavelmente devido ao trauma cirúrgico, à queda da pressão e à inadaptção funcional da vasculatura sistêmica. Mais ainda, como havia disfunção do VE, a capacidade do coração para gerar um aumento substancial da pressão sistólica pode ter sido comprometida. De qualquer forma, a permeabilidade da FAC foi comprovada diariamente pelo método auscultatório. Finalmente, a presença de fístula significativa pode ser inferida pelo aumento da PDfVE, um indicador, embora indireto, da sobrecarga de volume.

7 Implicações

O benefício dos inibidores da enzima de conversão da angiotensina e dos antagonistas do receptor de AT1 na prevenção do remodelamento cardíaco e no aumento da sobrevida de pacientes com IC é amplamente reconhecido^{40,41,42}. Nas cardiopatias resultantes de sobrecarga de volume, com exceção do infarto do miocárdio, o efeito destas drogas sobre o remodelamento cardíaco ainda não foi devidamente investigado⁴³. Os presentes resultados sugerem que o efeito benéfico ao prevenir o acúmulo de fibrose pode não ser alcançado se houver redução da PPC de tal monta a comprometer a perfusão miocárdica.

8 Conclusão

O remodelamento agudo do coração após a FAC caracteriza-se por dano isquêmico do SE, resultante da queda da PPC, que impede a adaptação miocárdica adequada à sobrecarga de volume e resulta em disfunção precoce do VE.

9 Referências

1. Fedak PWM, Verma S, Weisel RD, Li R. Cardiac remodeling and failure: from molecules to man (part I). *Cardiovasc. Pathol.* 2005; 14: 1-11.
2. 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; 35:569-82.
3. Garcia R, Diebold S. Simple rapid and effective method of producing aortocaval shunt in the rat. *Cardiovasc. Res.* 1990; 24:430-2.
4. Olivetti G, Cigola E, Maestri R, Lagrasta C, Corradi D, Quani F. Recent advances in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* 2000; 45:68-75.
5. Grossman W, Jones D, McLaurin LP. Wall stress and patterns of hypertrophy. *J. Clin. Invest.* 1975; 56:56-64.
6. Cantor E, Babick AP, Vasanjii Z, Dhalla NS, Netticadan T. A comparative echocardiographic analysis of cardiac structure and function in rats subjected to pressure or volume overload. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2005; 38:777-86.
7. Carabello BA. Concentric versus eccentric remodeling. *J Card Fail* 2002; 8:S258-63.
8. Karl T. Weber. From Inflammation to Fibrosis: A Stiff Stretch of Highway. *Hypertension* 2004; 43: 716-719.

9. Foronjy R, Sun J, Lemaitre V, D'armiento JM. Transgenic Expression of Matrix Metalloproteinase-1 Inhibits Myocardial Fibrosis and Prevents the Transition to Heart Failure in a Pressure Overload Mouse Model. *Hyperten. Res.* 2008; 31: 725-735.
10. Brilla CG, Rupp H, Maisch B. Effects of ACE inhibition versus non-ACE inhibitor antihypertensive treatment on myocardial fibrosis in patients with arterial hypertension. *Hertz* 2003; 28:744-53.
11. Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol. Ther.* 2010; 128:191-227.
12. Emter CA, Baines CP. Low-intensity aerobic interval training attenuates pathological left ventricular remodeling and mitochondrial dysfunction in aortic-banded miniature swine. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2010; 299:H1348-56.
13. 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:H207-14.
14. Cox MJ, Hawkins UA, Hoit BD, Tyagi SC. Attenuation of oxidative stress and remodeling by cardiac inhibitor of metalloproteinase protein transfer. *Circulation* 2004; 109:2123-28.
15. Guido MC, de Carvalho Frimm C, Koike MK, Cordeiro FF, Moretti AIS, Godoy LC. Low coronary driving pressure is associated with subendocardial remodeling and left ventricular dysfunction in aortocaval fistula. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2007; 34:1165-72.

16. Brower GL, Janicki JS. Contribution of ventricular remodeling to pathogenesis of heart failure in rats. *Am. J. physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2001; 280:H674-83.
17. Cox MJ, Sood HS, Hunt MJ, Chandler D, Henegar JR, Aru GM, Tyagi SC. Apoptosis in the left ventricle of chronic volume overload causes endocardial endothelial dysfunction in rats. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2002; 282:H1197-205.
18. Janicki JS, Brower GL, Gardner JD, Forman MF, Stewart JA Jr, Murray DB, Chancey AL. Cardiac mast cell regulation of matrix metalloproteinase-related ventricular remodeling in chronic pressure or volume overload. *Cardiovasc. Res.* 2006; 69:657-65.
19. Koike MK, de Carvalho Fimm C, Higuchi ML. Bradykinin B₂ receptor antagonism attenuates inflammation, mast cell infiltration and fibrosis in remote myocardium after infarctions in rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2005; 32:1131-6.
20. Koike MK, de Carvalho Frimm C, Cúri M. Low coronary pressure early in the course of myocardial infarction is associated with subendocardial remodeling and left ventricular dysfunction. *Int. J. Exp. Pathol.* 2007; 88:279-90.
21. 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.* 2002; 9:112-21.
22. Robbins and Cotran's Pathologic Basis of Disease. 7a ed. Filadelfia, EUA: Elsevier health Sciences; 2004.

23. Junqueira LC & Carneiro J. *Histologia básica*, 10a edição, Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2004.
24. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem. J.* 1979; 11: 447-55.
25. 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; 129:439-46.
26. 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; 38:119-25.
27. Hakkinen JP, Miller MW, Smith AH, Knight DR. Measurement of organ blood flow with colored microspheres in the rat. *Cardiovasc. Res.* 1995; 29: 74-9.
28. Soriano FG, Liaudet L, Szabó E, vitaq L, Mabley JG, Pacher P, Szabó C. Resistance to acute septic peritonitis in poly (ADP-ribose) polymerase-1-deficient mice. *Shock* 2002; 17: 286-92.
29. Deten A, Volz HC, Briest W, Zimmer HG. Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. Experimental studies in rats. *Cardiovasc. Res.* 2002; 55: 329-40.
30. Mosher P, Ross J Jr, Mcfate PA, Shaw RF: Control of coronary blood flow by an autoregulatory mechanism. *Circ. Res.* 1964,14:250-259.
31. Ryan T, Rothstein EC, Aban I, Tallaj JA, Husain A, Luchesi PA, Dell'Italia LJ. Left ventricular eccentric remodeling and matrix loss are mediated by

- bradikinin and precede cardiomyocyte elongation in rats with volume overload. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007;49:811-21.
32. Kolpakov MA, Seqqat R, Rafiq K, Xi H, Margulies KB, Libonati JR, Powel P, Houser SR, Dell'Italia LJ, Sabri A. Pleiotropic effects of neutrophils on myocyte apoptosis and left ventricular remodeling during early volume overload. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2009; 47:634-45.
33. 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; 292:H3057-64.
34. Hwang MW, Matsumori A, Furukawa Y, Ono K, Okada M, Iwasaki A, Hara M, Miyamoto T, Touma M, Sasayama S. Neutralization of interleukin-1beta in the acute phase of myocardial infarction promotes the progression of left ventricular remodeling. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2001; 38: 1546-1553.
35. Yndestad A, Damas JK, Oie E, Ueland T, Gullestad L, Aukrust P. Systemic inflammation in heart failure – the whys and wherefores. *Heart Fail. Rev.* 2006; 11:83-92.
36. Moss AJ. Intramyocardial oxygen tension. *Cardiovasc. Res.* 1968; 2:314-8.
37. Weiss HR, Sinha AK. Regional oxygen saturation of small arteries and veins in the canine myocardium. *Circ. Res.* 1978; 42:119-26.
38. Kuwada Y, Takenaka K. Transmural heterogeneity of the left ventricular wall: subendocardial layer and subepicardial layer. *J. Cardiol.* 2000; 35:205-18.

39. Myers J, Tirosh R, Jacobson RC, Pollack GH. Phase-locked loop measurement of sarcomere length with high time resolution. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 1982; 29:463-6.
40. Pfeffer MA, Braunwald E, Moya LA, Basta L, Brown EJ Jr, Cuddy TE, Davis BR, Geltman EM, Goldman S, Flaker GC, Klein M, Lamas GA, Packer M, Rouleau J, Rouleau JL, Rutherford J, Wertheimer JH, Hawkins M. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction - Results of the survival and ventricular enlargement Trial. *N. Engl. J. Med.* 1992; 327:669-77.
41. The SOLVD investigators. Studies of left ventricular dysfunction (SOLVD) - rationale, design and methods: two trials that evaluate the effect of enalapril in patients with reduced ejection fraction. *Am. J. Cardiol.* 1990; 66:315-22.
42. Pitt B, Poole-Wilson PA, Segal R, Martinez FA, Dickstein K, Camm AJ, Konstam MA, Riegger G, Klinger GH, Neaton J, Sharma D, Thiyagarajan B. Effect of losartan compared with captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure: randomised trial—the Losartan Heart Failure Survival Study ELITE II. *The Lancet* 2000; 355: 1582 -7.
43. Jong P, Demers D, McKelvie RS, Liu PP. Angiotensin receptor blockers in heart failure: meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Coll Cardiol*, 2002; 39:463-70.