

Leonardo Jensen Socas

**Restauração das alterações cardíacas e cerebrais após
remoção da estenose aórtica em modelo C57b6**

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

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Maria Claudia Costa Irigoyen

São Paulo

2021

Leonardo Jensen Socas

**Restauração das alterações cardíacas e cerebrais após
remoção da estenose aórtica em modelo C57b6**

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

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Maria Claudia Costa Irigoyen

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Socas, Leonardo Jensen
Restauração das alterações cardíacas e cerebrais
após remoção da estenose aórtica em modelo C57b6 /
Leonardo Jensen Socas. -- São Paulo, 2021.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientadora: Maria Claudia Costa Irigoyen.

Descritores: 1.Hipertensão 2.Estenose aórtica
3.Disfunção ventricular 4.Doenças cardiovasculares
5.Camundongos endogâmicos C57BL

USP/FM/DBD-398/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Agradecimentos

Agradeço ao sistema educacional público do Brasil por me dar a oportunidade de estudar em um centro de excelência em pesquisa, educação e assistência, em especial às agências de fomento CAPES, CNPQ e FAPESP. Agradeço ao departamento de Fisiopatologia Experimental pelo apoio de sempre, em especial à Dra. Elia, que fez a diferença no meu processo de amadurecimento em pesquisa e conhecimento.

Agradeço a minha orientadora Dra. Maria Claudia Irigoyen que com inteligência, generosidade e respeito me apoiou nesta longa jornada do doutorado. Obrigado pela confiança Dra. Claudia, você sem dúvida é exemplo e motivo de inspiração para mim.

Agradeço a minha família por todo o apoio, em especial a minha esposa Natalia Sanchez Jensen por todo o seu amor, carinho e parceria nestes anos todos de lutas e conquistas, sem você eu não teria chegado até aqui. Agradeço a minha mãe querida, meu pai, meus irmãos e amigos.

Agradeço a todos os funcionários da FMUSP, Hospital das Clínicas, Instituto do Coração, CNPEM, InRad que me apoiaram nos experimentos. Sem a estrutura e o apoio humano este trabalho não poderia ter sido realizado.

Agradeço imensamente a esta rede de jovens pesquisadores que se apoiam e lutam todos os dias pelas suas carreiras e sobretudo pela pesquisa brasileira. Obrigado aos meus colegas de laboratório pela cumplicidade e pela troca de conhecimento.

Esta 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

Introdução	11
1.1. Epidemiologia e fisiopatologia das doenças cardiovasculares	11
1.2. Danos cardíacos na hipertensão	15
1.3. Repercussões cerebrovasculares na hipertensão.....	19
1.4. Modelo murino de hipertensão cerebral e cardíaca por meio de estenose aórtica.	21
1.5. Justificativa	23
2. Objetivo	24
2.1. Objetivos específicos	24
3. Materiais e métodos	25
3.1. Modelo animal.....	25
3.2. Avaliação histopatológica do coração.....	26
3.3. PCR em tempo real	27
3.4. Avaliação de congestão pulmonar e de congestão hepática.....	27
3.5. Avaliação da função cardíaca	28
3.6. Avaliação do consumo de glicose por imagem (PET scan)	29
3.7. Análises dos metabólitos séricos.....	30
3.8. Análise Estatística	33
3.9. Desenho Experimental	33
4. Resultados	34
5. Discussão	50
6. Bibliografia	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagem ilustrativa do método de TAC.....	26
Figura 2 – Desenho experimental.....	33
Figura 3 – Animais submetidos a colocação do clipe de titânio apresentaram alterações ecocardiográficas após 72 horas da cirurgia de colocação do clipe.....	35
Figura 4 – Análise biométrica cardíaca após reversão da hipertrofia do ventrículo esquerdo.....	37
Figura 5 – Análise estrutural e de expressão gênica ventricular relacionadas ao remodelamento ventricular.....	39
Figura 6 – Função cardíaca e hemodinâmica medidas por ecocardiografia...41	
Figura 7 – Parâmetros indicativos de insuficiência cardíaca do ventrículo esquerdo.....	42
Figura 8 – Incorporação e consumo de glicose marcada para diferentes regiões cerebrais.....	44
Figura 9 – Consumo de glicose marcada para diferentes regiões cerebrais..45	
Figura 10 – Análise sérica de moléculas envolvidas em diferentes vias metabólicas.....	47
Figura 11 – Análise de metabólitos séricos intermediários do ciclo do ácido cítrico para os diferentes grupos experimentais.....	49

LISTA DE SIGLAS

ADF	Área diastólica final
AE	Átrio esquerdo
ANOVA	Análise de variância
ANP	Peptídeo natriurético atrial
Ao	Aorta
ASF	Área sistólica final
ATP	Adenosina trifosfato
AVC	Acidente vascular cerebral
AP	Angina pectoris
BNP	Peptídeo natriurético cerebral
Ca	Cálcio
CTR	Controle
DA	Doença de Alzheimer
DCV	Doenças cardiovasculares
DDF	Diâmetro diastólico final
DDR2	<i>Discoidin domain receptor 2</i>
DP	Desvio-padrão
DSF	Diâmetro sistólico final
EA	Estenose aórtica
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECO	Ecocardiografia
EUA	Estados Unidos da América
FencVE%	Fração de encurtamento do ventrículo esquerdo
FEpVE	Fração de ejeção preservada do ventrículo esquerdo
FEVE	Fração de ejeção do ventrículo esquerdo
GAL-3	Galectina-3
GC-MS	<i>Gas chromatography–mass spectrometry</i>
GDF-15	<i>Growth differentiation factor-15</i>
GLUT 1	<i>Glucose transporter-1</i>
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HIF1A	Fator indutor de hipóxia 1 ^a

HR	<i>Hazard ratio</i>
IC	Insuficiência cardíaca
ICD	Insuficiência cardíaca diastólica
IP	Intraperitoneal
IRM	Imagem por ressonância magnética
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinases
MSTFA	N-methyl-N trimetilsililtrifluoroacetamina
NVSS	<i>National Vital Statistics System</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PET	<i>PET scan</i> (tomografia por emissão de pósitrons)
PI	Padrão de quantificação
PPD	Parede posterior na diástole
QC	Controle de qualidade
RAA	Renina-angiotensina-aldosterona
REM	Remoção da estenose
RNA	Ácido ribonucleico
RTL	Tempo de retenção
SIVD	Septo intraventricular na diástole
sSt2	<i>Soluble suppression of tumorigenicity-2</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
SUV	<i>Standardized uptake value</i>
TAC	Constricção transversa da aorta
TC	Tomografia computadorizada
TD	Tempo de desaceleração
TGF β 1	<i>Transforming growth factor-β1</i>
TIMP 1	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase-1</i>
TMCS	Trimetilclorosilano
TRIV	Tempo de relaxamento isovolumétrico
VDF	Volume diastólico final
VSF	Volume sistólico final
VE	Ventrículo esquerdo

RESUMO

Restauração das alterações cardíacas e cerebrais após remoção da estenose aórtica em modelo C57b6

As doenças cardiovasculares contribuem para 18,6 milhões de mortes ao ano no mundo; a hipertensão arterial sistêmica (HAS) é a etiologia mais frequente. Entre as consequências da sobrecarga pressórica tem-se a hipertrofia cardíaca, que é o maior fator preditivo para insuficiência cardíaca (IC), além de repercussões cerebrovasculares e dano renal. Um ponto que permanece pouco explorado na literatura refere-se às consequências celulares nos pacientes hipertensos tratados, buscando compreender as alterações remanescentes provenientes de um quadro de reversão do remodelamento cardíaco. O presente estudo tem por objetivo testar a hipótese de que animais submetidos a estenose aórtica por cinco semanas conseguem restaurar a estrutura, função cardíaca e cerebral após a retirada da constrição. Camundongos machos C57b6 foram operados para a colocação de clipe de titânio no topo do arco aórtico e permaneceram com a estenose por 5 semanas quando foram randomizados em grupos: REM (clipe retirado na quinta semana), TAC (permaneceram com o clipe por 10 semanas) e CTR (procedimento cirúrgico sem o posicionamento do clipe). A função cardíaca foi analisada por Eco, o consumo de glicose por PET scan, metabólitos séricos por GC-Massas e RT-pcr para a análise da expressão gênica tecidual. Análises estatísticas foram realizadas por ANOVA uma via representadas por média \pm desvio padrão. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. O grupo TAC apresentou maior espessura da parede cardíaca quando comparado ao CTR, bem como aumento significativo da massa ventricular e da fibrose em 10 semanas. A expressão de TIMP 1 foi maior no grupo REM, para o ANP a expressão foi maior nos grupos REM e TAC5 versus CTR e TAC10. Para diferentes regiões cerebrais, o grupo REM apresentou menor incorporação de glicose comparado ao CTR. O rastreamento de metabólitos séricos mostrou menores concentrações circulantes de fumarato e malato para os grupos TAC5 e TAC10 vs REM e CTR. Em síntese, os dados do presente trabalho apontam a possível transição entre a hipertrofia cardíaca compensada para a descompensada, com preservação da função sistólica e reversão parcial das alterações cardíacas com disfunção diastólica discreta. Marcadores séricos como o malato e o fumarato em baixa concentração abrem caminho para diagnósticos bioquímicos de lesão precoce causada pela hipertensão e podem ser validados em estudos futuros em pacientes hipertensos.

Palavras-chave: Hipertensão, Estenose aórtica, Disfunção ventricular, Doenças cardiovasculares, Camundongos endogâmicos C57Bl

ABSTRACT

Restoration of cardiac and brain alterations after the removal of aortic stenosis in C57BL6 mice model

Cardiovascular diseases account for 18.6 million deaths per year worldwide; systemic arterial hypertension is the most common etiology. Pressure overload can lead to cardiac hypertrophy, which is the main predictive factor for heart failure (HF) and can also result in cerebrovascular repercussions and renal damage. An aspect that remains poorly investigated in the literature is related to the cellular consequences in patients with treated hypertension, in order to understand the remaining alterations resulting from a state of cardiac remodeling reversal. The present study aims to test the hypothesis that mice subjected to aortic stenosis for five weeks are able to restore cardiac structure and cardiac and brain function after the removal of the constriction. Male C57BL6 mice were operated for the placement of a titanium clip at the top of the aortic arch and remained with the stenosis for five weeks, then being randomized in groups: REM (clip removed at week 5), TAC (remained with the clip for 10 weeks) and CTR (surgical procedure without placement of the clip). Cardiac function was assessed by Echo, glucose uptake by PET scan, serum metabolites by GC-MS and RT-PCR for the analysis of tissue gene expression. Statistical analyses were performed by one way ANOVA and reported by means and standard deviation. P-values ≤ 0.05 were considered statistically significant. The TAC group presented increased cardiac wall thickness compared to the CTR, as well as a significant increase in ventricular mass and fibrosis at week 10. TIMP 1 expression was higher in the REM group, while ANP expression was higher in REM and TAC5 vs. CTR and TAC10. The REM group presented lower glucose uptake compared to the CTR in different brain regions. The screening of serum metabolites revealed lower circulating levels of fumarate and malate for TAC5 and TAC10 animals vs. REM and CTR. In conclusion, the data from the present study showed a possible transition between compensated and de-compensated cardiac hypertrophy, with preserved systolic function and partial reversal of cardiac alterations, with discrete diastolic dysfunction. Serum markers such as malate and fumarate in low concentrations pave the way for future studies regarding the biochemical diagnosis of early lesions caused by hypertension and can be validated in future research with hypertensive patients.

Keywords: Hypertension, Aortic stenosis, Ventricular dysfunction, Cardiovascular diseases, Inbred mice C57Bl

Introdução

1.1. Epidemiologia e fisiopatologia das doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCV) são as principais causas de morte em todo o mundo. Em 2014, 17,5 milhões de pessoas morreram por esta razão, representando 30,5% dos óbitos na população mundial (1). Em 2017, foram 17,8 milhões de mortes (2), em 2019 foram 18,6 milhões de mortes (3), e estima-se que em 2030 serão 22,3 milhões de mortes causadas pelas DCV (4). Nos Estados Unidos da América (EUA), as principais etiologias das DCV são representadas por 77,9 milhões de pessoas com hipertensão arterial sistêmica (HAS), 7,8 milhões com angina pectoris (AP), 7,6 milhões com infarto agudo do miocárdio (IAM), 6,8 milhões com acidente vascular cerebral (AVC) e 5,1 milhões com insuficiência cardíaca (IC). Estima-se que, em média, mais de 2150 pessoas morrem por dia por conta das DCV nos EUA, sendo aproximadamente 1 óbito a cada 40 minutos (5).

A epidemiologia das DCV no Brasil é similar aos achados Norte Americanos com relação à taxa de mortalidade, a cada 100.000 brasileiros, 286 indivíduos morrem por ano, superando outros países da América Latina, como Argentina (207/100.000) e Chile (160/100.000). As DCV oneram o Sistema Único de Saúde (SUS) no Brasil, representando 13% das admissões hospitalares. Para indivíduos maiores de 60 anos, as admissões hospitalares por DCV atingem 27% (6).

Os principais fatores de risco modificáveis para doença arterial coronariana são o aumento da pressão arterial e do colesterol plasmático, diabetes, tabagismo, excesso de peso, estresse, inatividade física e alimentação inadequada (baixo consumo de frutas, verduras, legumes, leguminosas, grãos integrais, castanhas e

sementes e consumo excessivo de carnes vermelhas e processadas, bebidas açucaradas, ácidos graxos trans e sódio) (7).

As DCV apresentam componentes semelhantes quando ocorre queda da função cardíaca. Independente do mecanismo causador, respostas adaptativas são estimuladas visando corrigir a disfunção ventricular. Nos pequenos danos miocárdicos, o remodelamento cardíaco é capaz de melhorar a função e, muitas vezes, normalizá-la. Nos comprometimentos maiores, estes mecanismos tornam-se insuficientes e, muitas vezes, a sua contínua estimulação pode desencadear um ciclo vicioso que leva à deterioração da função cardíaca (8).

A insuficiência cardíaca é uma síndrome decorrente de causas incluindo doença isquêmica coronariana, processos inflamatórios, doenças valvares e hipertensão arterial, sendo que em resposta às agressões desencadeia-se um processo de remodelamento ventricular e fibrose.

O remodelamento é definido por alterações no tamanho, geometria, forma, composição e função do coração após a agressão e, neste cenário, inicia-se uma resposta inflamatória que tem por objetivo eliminar as células residentes mortas e preparar o local para a recomposição tecidual. A invasão de fibroblastos na região atingida pela injúria dará início à formação de um tecido fibroso rico em colágeno. Esse tecido, diferentemente do músculo cardíaco, não tem capacidade contrátil e por isso contribui de maneira negativa para a função cardíaca. A disfunção ventricular resulta em insuficiência cardíaca, que causa comprometimento funcional de outros sistemas orgânicos do paciente (9).

A HAS é a doença mais prevalente entre as doenças DCV. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a HAS é a maior causadora de mortes prematuras no mundo e uma das metas globais é reduzir em 33% a prevalência entre

2010 e 2030 (10). Com base nos dados do *National Vital Statistics System* (NVSS) dos EUA, estima-se que, em 2017, 90.098 pacientes morreram por causas primárias causadas por HAS. Na comparação entre 2007 e 2017, foi possível observar um aumento de 25,7% nas taxas de morte, enquanto o atual número de mortes causadas por hipertensão aumentou 54,9% (11).

Com base em um banco de dados de 968.419 adultos de 90 países, a prevalência de hipertensão estimada em 2016 foi de 31,1% (IC95%: 30,0%-32,2%). A prevalência foi de 28,5% (IC95%: 27,3%–29,7%) para países desenvolvidos e de 31,5% (IC95%: 30,2%–32,9%) para países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Em valores brutos estimados, isto representa 1,39 bilhão de hipertensos no mundo, aproximadamente 349 milhões em países desenvolvidos e 1,04 bilhão em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (12).

Segundo a diretriz Europeia de hipertensão de 2018, o indivíduo considerado hipertenso apresenta pressão sistólica ≥ 140 mmHg e/ou diastólica ≥ 90 mmHg sustentadas. Todavia, indivíduos com pressão normal elevada podem ser tratados quando a sistólica está entre 130 e 139mmHg e a diastólica entre 85 e 89mmHg e se coexistir previamente algum risco cardiovascular ao paciente (13).

Os principais órgãos alvo da HAS são os rins e os sistemas cerebrovascular e cardiovascular. A HAS está ligada diretamente com a função renal, podendo os rins serem a causa ou a consequência da doença. A HAS crônica leva a lesões renais de perda da massa de néfrons, aumento da retenção de sódio, aumento da matriz extracelular, superativação simpatotônica e ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAA), além de disfunção endotelial (14, 15).

Com respeito às lesões cardiovasculares na HAS, na maioria das vezes estas se manifestam na sua forma crônica, gerando hipertrofia do ventrículo esquerdo e

direito, doença arterial coronariana e insuficiência cardíaca (16). O impacto da HAS para os demais sistemas será abordado nos capítulos seguintes.

Outra doença com fisiopatologia global distinta, mas com hipertensão ventricular significativa é a estenose aórtica (EA), uma doença estrutural gerada por sobrecarga de volume no ventrículo esquerdo e que, assim como a hipertensão, causa ao coração: hipertrofia, fibrose e insuficiência. A prevalência pode variar de acordo com a população estudada e a faixa etária analisada. Em algumas populações, a prevalência é de 3% para indivíduos ≥ 60 anos e 4,5% para indivíduos ≥ 70 anos (17). Todavia, projeções apontam que o número de pacientes com estenose aórtica nos EUA e na Europa irá mais do que dobrar até 2050 (11).

No registro canadense CANHEART *study* cerca de 1,12 milhão de pacientes foram acompanhados por 13 anos e 20.995 indivíduos desenvolveram EA severa. Curiosamente, os maiores preditores de EA severa estão associados com a HAS (HR 1,71 [IC95%: 1,66–1,76]), diabetes mellitus (HR 1,49 [IC95%: 1,44–1,54]) e dislipidemia (HR 1,17 [IC95%: 1,14–1,21]), com valor de $p < 0,001$ para todas as associações (18).

Assim como a hipertensão, a prevalência da EA aumenta conforme a idade e caracteriza-se por redução do volume ejetado durante a sístole através da valva aórtica, causada pela calcificação dos folhetos valvares, podendo ser acompanhada ou não de redução da fração de ejeção. Pacientes com área valvar $\leq 1\text{cm}^2$, gradiente de pressão na valva aórtica $\geq 40\text{mmHg}$ e/ou com velocidade de pico Doppler $\geq 4\text{m/s}$ podem ser diagnosticados com EA severa (19).

Todavia, há casos em que o pacientes com EA apresenta baixo fluxo e baixo gradiente com mudança estrutural do VE. Nestes casos, o diagnóstico é decisivo quando o exame de ecocardiografia de estresse com dobutamina é realizado (20).

1.2. Danos cardíacos na hipertensão

A hipertrofia cardíaca é o maior fator preditivo para IC, arritmias e morte súbita e pode ser caracterizada em diferentes situações patológicas como: injúria isquêmica, respostas anormais adrenérgicas e neuro-hormonais, além da elevada sobrecarga hemodinâmica (21, 22).

A hipertrofia cardíaca pode ser classificada em dois subtipos: excêntrica e concêntrica. A hipertrofia excêntrica é originada por estresse biomecânico e está relacionada com o aumento da pressão e/ou volume sanguíneo, ocorrendo aumento das câmaras cardíacas e deposição de sarcômeros em série em cardiomiócitos. A hipertrofia concêntrica é geralmente gerada por sobrecarga de pressão ou por aumento da resistência à ejeção, resultando em espessamento das paredes ventriculares e deposição de novos sarcômeros em paralelo, sem mudança no diâmetro do ventrículo (23).

Os fatores comuns à hipertrofia patológica são caracterizados pelo aumento da transcrição gênica e aumento de proteínas expressas no período fetal em cardiomiócitos. Estes eventos refletem em aumento da massa cardíaca que, em estágios avançados, provoca disfunção cardíaca (22).

No processo patológico de hipertrofia cardíaca observa-se redução da expressão de cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2a), o que leva ao acúmulo de cálcio (Ca) intracelular e relaxamento tardio do miócito, fato que compromete a sístole subjacente ao desequilíbrio da concentração de Ca. A desregulação nos níveis de Ca está associada com aumento da incidência de arritmias e faz com que os cardiomiócitos tenham maior gasto energético (24).

Um segundo mecanismo que está alterado na hipertrofia cardíaca patológica é o metabólico. Em situações normais, as células cardíacas dispõem dos substratos circulantes para obterem energia, ou seja, elas não se restringem a substratos específicos, sendo que os substratos disponíveis correspondem a ácidos graxos, glicose, lactato, aminoácidos e corpos cetônicos. Porém, ácidos graxos e glicose são abundantes na circulação e, conseqüentemente, são mais utilizados no metabolismo, de maneira que 65% e 30% da energia obtida provém desses dois substratos, respectivamente (25).

Assim, mais de 90% do ATP no coração é fornecido pela β -oxidação e pela glicólise, e os outros 10% pela glicólise anaeróbia. Nos casos de hipertrofia cardíaca induzida por sobrecarga de pressão, o metabolismo de ácidos graxos é diminuído e o consumo de glicose é aumentado (26).

A hipertrofia cardíaca patológica também é caracterizada pelo acúmulo de fibrose intersticial no miocárdio. A fibrose é caracterizada pelo acúmulo de colágeno fibrilar na matriz extracelular e está presente em diversas cardiomiopatias, recrutando células inflamatórias infiltrantes e causando morte celular. O fibroblasto é a célula responsável por produzir os componentes da matriz extracelular, principalmente colágeno tipo I e III. A matriz auxilia os cardiomiócitos na homeostase e no acoplamento elétrico (24, 27, 28).

Ademais, a morte de cardiomiócitos por necrose e apoptose aumenta a proliferação de fibroblastos, que por sua vez aumenta a produção e liberação de colágeno intersticial (24, 29). Os fibroblastos são células secretoras muito heterogêneas, sem marcadores específicos. Entretanto, um receptor celular de tirosina-quinase para colágeno (*Discoidin domain receptor 2* - DDR2) tem sido

utilizado para marcação de fibroblastos no coração. O colágeno intersticial é o principal marcador de fibrose; em modelos de hipertensão cardíaca, o colágeno predominante é do tipo I e produzido principalmente pelos miofibroblastos. O colágeno está relacionado com a integridade da matriz extracelular, prevenindo a dilatação das câmaras cardíacas (30, 31).

O processo de injúria tecidual causado pela hipertrofia cardíaca modula a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, que são células com características de músculo liso e expressam a proteína alfa-actina de músculo liso (α -SMA), com formação de fibras de estresse e extenso retículo endoplasmático. Os miofibroblastos não podem ser encontrados no músculo cardíaco saudável (32).

Os miofibroblastos, assim como os fibroblastos durante o processo de fibrose, liberam níveis elevados de proteínas da matriz extracelular (MEC) e são modulados pela morte de cardiomiócitos. A liberação do colágeno intersticial provoca a formação de fibrilas de colágeno, que por meio de ligações covalentes do tipo *cross-linking* são associadas às membranas celulares com a participação de inúmeras proteínas, incluindo metaloproteinases, fibronectinas e integrinas. As ligações do tipo *cross-linking* estão relacionadas com disfunção diastólica na fibrose cardíaca, causando o enrijecimento das câmaras cardíacas (33).

A disfunção cardíaca diastólica refere-se a problemas no relaxamento e no enchimento dos ventrículos, enquanto a insuficiência cardíaca diastólica (ICD) está relacionada com a síndrome clínica em que o paciente apresenta dilatação ventricular mínima e disfunção diastólica significativa. Nessa situação, tem-se redução da pressão de enchimento cardíaco e diminuição do pico $-dP/dT$, com tempo

isovolumétrico prolongado e constante, com aumento do tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), ocorrendo enchimento lento e incompleto dos ventrículos (34).

A ICD é comum em pacientes com hipertensão, que mesmo sob controle medicamentoso da pressão arterial estão susceptíveis aos problemas relacionados à fibrose cardíaca. A ICD pode estar relacionada ou não com a redução da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEpVE) e os esquemas normais de tratamento da IC como betabloqueadores, inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), vasodilatadores e diuréticos não apresentam efeitos significativos que beneficiem os pacientes com ICD quanto à sobrevida (35).

Além disso, pacientes com ICD alcançam taxas de mortalidade quatro vezes maior do que pacientes sem IC. Ademais, podem ser comparados com os gastos de internação e cuidados hospitalares com a IC sistólica. Estima-se que metade dos 550 mil americanos diagnosticados com IC todos os anos apresentam ICD. Ainda não se tem um tratamento de ação direta para a doença, apenas fármacos que atenuam os sintomas que agem em causas adjacentes à etiologia (36).

As principais ferramentas utilizadas para o diagnóstico da ICD são os exames de função cardíaca por meio de ecocardiografia (ECO) e de imagem por ressonância magnética (IRM) (37). Ademais, ainda não se tem um marcador real para o diagnóstico da ICD. Cho-Kai e colaboradores publicaram um estudo de associação entre níveis elevados de Galectina-3 no plasma e ICD diagnosticada por Eco, em que há aumento significativo dos níveis da proteína no soro após algumas horas de constrição transversa da aorta (TAC). Entretanto, este estudo apresenta limitações, sem analisar se os níveis de Galectina-3 permanecem elevados no decorrer de dias e meses (38).

1.3. Repercussões cerebrovasculares na hipertensão

Abordar a hipertensão no contexto cardiovascular não é suficiente para o entendimento das repercussões sistêmicas causadas pela hipertensão. É preciso reconhecer o papel do cérebro no controle simpático e parassimpático da atividade cardíaca, assim como entender o quanto a atividade cardíaca afeta o cérebro no contexto patológico na hipertensão (39).

A hipertensão arterial é o principal fator de risco para o acidente vascular cerebral (AVC), injúria cerebral e remodelamento vascular cerebral. Estudos longitudinais apontam que adultos com risco cardiovascular apresentam déficit cognitivo (40), que a longo prazo acompanha com o aparecimento de demência (41).

A prevalência de demência em indivíduos ≥ 60 anos varia entre 5-7% ao redor do mundo. Na América Latina a prevalência pode chegar a 8,5%. Em 2010, aproximadamente 35,6 milhões de pessoas viviam com demência ao redor do mundo e estima-se que em 2030 o número chegará a 65,7 milhões de pessoas (42).

A demência é definida por transtorno neuropsiquiátrico causado por comprometimento da função cognitiva global, em que há distúrbios múltiplos nas regiões do córtex superior, incluindo memória, localização visoespacial, compreensão, raciocínio, julgamento, concentração e aprendizagem, além da deterioração do controle emocional, sem que a consciência seja prejudicada (43). Os fatores de risco estão relacionados com HAS, diabetes mellitus, dislipidemia, hipercolesterolemia, fibrilação atrial, tabagismo, trombose, etilismo e fatores genéticos (44).

A associação entre risco cardiovascular e piora do desempenho cognitivo foi demonstrada na literatura e explicada pela ocorrência de pequenos sangramentos

cerebrais ou pequenas isquemias, perda de capilares, neovasculogênese tortuosa de arteríolas, deposição de colágeno em veias e vênulas, além de desmielinização neuronal (45).

No remodelamento vascular cerebral em condição de sobrecarga pressórica também ocorre o acúmulo de colágeno, fibronectina e fragmentação de elastina na parede dos vasos cerebrais, gerando rigidez e possíveis rompimentos da barreira hematoencefálica. A perda de pequenos vasos e o remodelamento vascular contribuem para a redução do fluxo sanguíneo cerebral, que está diretamente associado à redução da capacidade cognitiva (46).

A estrutura e a função dos neurônios cerebrais em pacientes hipertensos são alteradas e descritas por emaranhados neurofibrilares, que são alterações intracelulares citoplasmáticas das células que estão localizadas na região do córtex cerebral. Estas alterações resultam em anomalias neuropatológicas, atrofia cerebral e déficit cognitivo (47).

Além disso, pacientes hipertensos em idade avançada apresentam maior risco para o desenvolvimento de doença de Alzheimer (DA). A DA é caracterizada pelo acúmulo de placas da proteína β -amilóide no citoplasma das células nervosas, que estão relacionadas com comprometimento cognitivo, tais como: função executiva, memória, localização espacial e motora. O surgimento de placas β -amilóide aumenta a inflamação, causando disfunção endotelial e estresse oxidativo. O estresse oxidativo vascular pode suprimir a produção e a ação de fatores tróficos, resultando em atrofia vascular e perda de óxido nítrico endotelial (48).

Estudos demonstram que a HAS está associada ao aumento do risco de desenvolver DA (49), assim como a sua presença está associada com pior

desempenho cognitivo em pacientes. Todavia, o tratamento para a HAS é associado a diminuição deste risco (50). Ademais, existe ainda uma lacuna no conhecimento, por serem poucos os estudos que demonstraram efeito protetor dos anti-hipertensivos em pacientes hipertensos com disfunção cognitiva ou demência (13).

1.4. Modelo murino de hipertensão cerebral e cardíaca por meio de estenose aórtica

Os modelos animais para estudo das repercussões cardiovasculares são abundantes, sendo a maioria em ratos e camundongos, principalmente pela similaridade do sistema cardiovascular ao de humanos. Embora os mecanismos de polarização e repolarização do cardiomiócito em modelo murino sejam diferentes, a função, a fisiologia e a anatomia são comumente comparadas (51).

Há modelos experimentais em roedores reconhecidos e amplamente utilizados, incluindo modelos genéticos (ex: animais *knockout* para *ApoE* para o estudo da doença cardiovascular aterosclerótica), dietas especiais (ex: administração de dieta rica em sódio para ratos Dahl sal-sensíveis para o estudo da IC com fração de ejeção preservada), modelos com medicamentos (ex: estímulo crônico com isoproterenol para estudo da IC avançada) e técnicas cirúrgicas, como a constrição transversa da aorta (TAC) para estudo da hipertrofia e IC (51).

Outro exemplo de modelo com uso de medicamentos é o tratamento com angiotensina II para indução de hipertrofia cardíaca. A angiotensina II leva à hipertrofia diretamente e indiretamente, de forma parácrina, pelo aumento da expressão de TGF β 1 (*transforming growth factor- β 1*), também envolvido na resposta cardíaca hipertrófica (52).

O modelo de TAC em camundongos é comumente utilizado para refletir a progressão da hipertrofia cardíaca para a insuficiência cardíaca em resposta à sobrecarga pressórica. Neste modelo, validado inicialmente por Rockman et al. (1991), a TAC, realizada por meio de oclusão parcial do arco aórtico, geralmente entre as artérias carótidas, leva primeiro a uma hipertrofia compensada, que costuma estar associada com uma melhora temporária da contratilidade cardíaca (53). Com o tempo, esta resposta se torna mal adaptativa, resultando em dilatação cardíaca e IC, sendo considerado um modelo que reproduz melhor o desenvolvimento gradual da IC em comparação a outras técnicas, como a oclusão completa da artéria coronária descendente anterior esquerda (54, 55).

A progressão gradual para IC no modelo de TAC também o torna útil para a avaliação da eficácia de potenciais intervenções terapêuticas (55).

Para o estudo das doenças cerebrovasculares, sobretudo AVC isquêmico e hemorragia cerebral, o modelo primata é utilizado com frequência, assim como outros animais grandes, como ovelhas, porcos e cães, pela similaridade da anatomia e fisiologia em relação ao cérebro humano (56).

Já para modelos de estudo com demência, a pesquisa experimental tem focado quase que exclusivamente em modelos de roedores para estudo da doença de Alzheimer, com escassa literatura sobre outras formas de demência. A maioria dos modelos de hipoperfusão cerebral envolve intervenções cirúrgicas e são realizados em ratos, com poucos estudos em primatas. O modelo murino é preferido para estudar a relação entre a disfunção cardiovascular e a perfusão cerebral e cognição em virtude da ampla gama de modelos genéticos disponíveis, que permitem a

investigação da interação entre diferentes fatores de risco e comorbidades e a averiguação dos mecanismos moleculares envolvidos (57).

1.5. Justificativa

Um ponto que permanece pouco explorado pela literatura refere-se às consequências celulares e moleculares nos pacientes com hipertensão controlada. Quais seriam as alterações remanescentes provenientes de um quadro de reversão da hipertensão arterial? Com o estudo de reversão do remodelamento cardíaco em camundongos, buscamos a identificação de metabólitos, genes ativos e parâmetros de função remanescentes ao insulto causado pela hipertensão. Desta forma, investigar a presença de alvos na busca de melhor compreensão da lesão cardíaca reversível relacionada à fibrose e redução da sobrevida em pacientes (58).

Para buscar estas respostas, foi proposto modelo de constrição da aorta em camundongos e posterior remoção da estenose para a avaliação por meio de ECO do grau de lesão cardíaca. Os animais foram aleatorizados e divididos em três grupos: Sham (CTR), REM e TAC. Os animais CTR foram submetidos à cirurgia sem a constrição da aorta; os animais do grupo REM foram submetidos a cirurgia para constrição da aorta até a quinta-semana, quando foram operados novamente para a remoção da estenose e acompanhados por mais 5 semanas. Os animais TAC permaneceram com a estenose até a 10^a semana do protocolo.

2. Objetivo

Testar a hipótese de que animais submetidos a estenose aórtica por cinco semanas conseguem restaurar a estrutura, função cardíaca e cerebral após a retirada da constrição aórtica.

2.1. Objetivos específicos:

1. Determinar o grau de lesão cardíaca ao qual os animais foram submetidos;
2. Determinar as repercussões cardíacas e cerebrais causadas pela retirada e colocação da constrição aórtica após cinco e dez semanas;
3. Determinar metabólitos séricos que possam identificar alterações sistêmicas para os diferentes grupos estudados.

3. Método

3.1. Modelo animal

Camundongos machos, C57/*black6*, de 8-10 semanas de idade foram randomizados em 3 grupos e mantidos em estante isolada e ventilada com água *ad libitum*. Os animais foram anestesiados com Ketamina/Xilazina (100mg/kg; 5mg/kg) por injeção intraperitoneal (IP). Com o auxílio de uma lupa, os camundongos foram colocados em posição supina e intubados. Uma pequena incisão foi feita no segundo espaço intercostal para realização da cirurgia de TAC (*transverse aortic constriction*), que consiste em constrição no topo do arco aórtico por clipe de titânio (Figura 1). Para os animais do grupo controle (CTR) a cirurgia foi realizada sem a constrição do vaso. Para os demais grupos o diâmetro da constrição foi determinado por alicate ajustado para uma estenose média de 0,4mm (53, 59). Na quinta semana de seguimento os animais do grupo REM foram submetidos a nova cirurgia para retirada da constrição de acordo com os mesmos procedimentos experimentais citados acima. Para os animais do grupo TAC, o clipe permaneceu por 10 semanas até o término do protocolo. Doze horas antes e após realização de todos os procedimentos cirúrgicos os animais foram analgésicos com Cloridrato de Tramadol 20mg/kg por 5 dias a cada 12hs (60). Ao término dos seguimentos experimentais os animais foram eutanasiados com overdose de Tiopental 30mg/kg para coleta de material biológico.

Ética

Este trabalho foi aprovado em comitê de ética sob número de parecer: **033/16 CEUA**

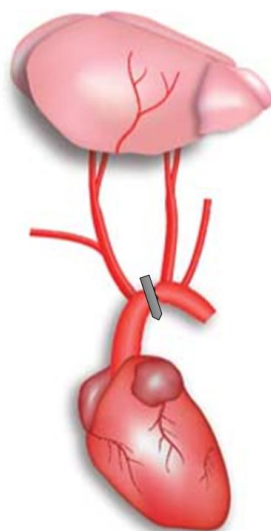


Figura 1. Imagem ilustrativa do método de TAC.

3.2. Avaliação histopatológica do coração

As câmaras cardíacas foram separadas e pesadas em balança analítica. O peso úmido foi corrigido pelo comprimento da tíbia para estimar a hipertrofia cardíaca. Os ventrículos direito e esquerdo foram fixados em formalina tamponada (10%), embebidos em parafina e seccionados em cortes com cinco micrômetros de espessura, que foram montados em lâminas e corados com *picrossirius red* para avaliação da fibrose. Um sistema computadorizado de aquisição de imagem (Leica Imaging Systems, Bannockburn, IL, EUA) foi utilizado para quantificar as marcações. A fibrose intersticial do coração foi avaliada como a área intersticial ocupada por fibras colágenas coradas em vermelho vivo pela reação com o picrossirius, com exclusão de fibras perivasculares. Após a digitalização, as áreas vermelhas foram quantificadas como a percentagem média da área total de cada 5 campos aleatórios com aumento de 200X de ampliação.

3.3. PCR em tempo real

Os ventrículos foram utilizados para a extração do RNA total por kit de acordo com as instruções do fabricante (Gigbo, Gaithersburg, MD, USA). O RNA foi quantificado por espectrofotômetro Nanodrop® e 3µg de RNA foram transcritos reversamente em cDNA utilizando SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, USA). A PCR em tempo real foi realizada de acordo com o método descrito por Kubista (61). Os genes de interesse foram medidos usando SYBR Green Master Mix (Applied Biosystem, Foster City, CA) seguido pelo protocolo de *melting curve* para verificar a especificidade da geração do amplicon. O gene 36B4 foi utilizado como normalizador para controle interno. O método comparativo de delta delta ($\Delta\Delta Ct$) foi utilizado para a análise dos dados para os genes ANP (peptídeo natriurético atrial) e TIMP 1 (*tissue inhibitor of metalloproteinase-1*) de acordo com o Gen Bank para a definição dos primers forward e reverse: TIMP 1: 5'-3' forward CTGCTCAGCAAAGAGCTTTC, 5' - 3' reverse CTCCAGTTTGCAAGGGATAG; ANP: 5' - 3' forward ATGGGCTCCTTCTCCATCAC, 5' - 3' reverse TCTACCGGCATCTTCTCCTC (62).

3.4. Avaliação de congestão pulmonar e de congestão hepática

Após a eutanásia dos animais, o pulmão e o fígado foram pesados em balança analítica e este valor corresponde ao peso úmido do órgão. Em seguida, estes órgãos foram colocados em estufa a 60°C por 72h. Posteriormente, foram novamente pesados para obtenção do peso seco. De posse destes valores, pode-se calcular as relações peso úmido do pulmão-peso seco/peso úmido *100 para o pulmão e para o fígado, os quais representam um índice de congestão pulmonar e hepática, respectivamente.

3.5. Avaliação da função cardíaca

Um sistema de ultrassom comercialmente disponível (VEVO 2100–Visual Sonics - Canadá) foi utilizado para a aquisição das imagens com sonda de 35 MHz. As medidas ecocardiográficas seguiram as recomendações do Comitê de Padronização da Sociedade Americana de Ecocardiografia e adaptadas para roedores **(63, 64)**. Os animais foram sedados com mistura de Isoflurano 2% por via inalatória. A partir de imagens bi-dimensionais obtidas na janela paraesternal, no plano de corte longitudinal, ao nível dos músculos papilares, foram realizadas medidas lineares de espessura de parede posterior na diástole (PPD), septo interventricular na diástole (SIVD), diâmetro diastólico final (DDF) e diâmetro sistólico final (DSF), além dos diâmetros da aorta (Ao), do átrio esquerdo (AE) e o comprimento longitudinal (L) do ventrículo esquerdo em diástole e sístole (VE). A fração de encurtamento do ventrículo esquerdo (FEncVE%) foi derivada das medidas de DDF e DSF aplicadas a fórmula: $FEncVE = (DDF-DSF)/DDF*100$. A massa do ventrículo esquerdo foi estimada por meio de medidas lineares do ventrículo esquerdo (VE) e calculada pela equação de Penn **(65)**. As medidas de área foram obtidas por Imagens ecocardiográficas da janela paraesternal, no plano de corte transversal, ao nível dos músculos papilares, a partir de medidas planimétricas das áreas diastólica final (ADF) e sistólica final (ASF) do VE. A fração de ejeção do ventrículo esquerdo foi calculada pela fórmula $(FEVE = (VDF-VSF)/VDF)*100$, representada como porcentagem e derivada a partir das medidas de volume diastólico final (VDF) e volume sistólico final (VSF), os quais foram obtidos a partir da regra II de Simpson, com os valores de ADF, ASF e L (diástole e sístole) **(66)**. A velocidade de fluxo na válvula mitral e aórtica foi obtida a partir de imagens bidimensionais obtidas na janela paraesternal, no plano de corte apical. Foram realizadas imagens Doppler de fluxo sanguíneo logo acima da

válvula mitral e na válvula aórtica. A velocidade de fluxo mitral foi estimada através da medida das ondas E e A, tempo de desaceleração (TD) e o tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), além do tempo de ejeção e do tempo de contração isovolumétrico. Para as medidas de fluxo tecidual, a amostra foi posicionada sobre o músculo papilar anterior e a partir das curvas obtidas foram realizadas medidas das ondas s', e' e a'. Os diâmetros para a aorta ascendente e arco aórtico também foram medidos. Todas as medidas foram realizadas em três ciclos cardíacos representativos de cada animal. A medida final de cada parâmetro foi dada pela média dos resultados obtidos a cada ciclo. Todas as medidas foram realizadas de maneira cega para os grupos experimentais propostos.

3.6. Avaliação do consumo de glicose por imagem (PET scan)

Animais dos grupos experimentais foram anestesiados com isoflurano 5% em oxigênio e mantidos em isoflurano 2-3% em O₂ para injeção do radiofármaco. Com o animal anestesiado, uma gota de sangue foi coletada da cauda para medida da glicemia, colocando a gota no glicosímetro Accu-check Active (Roche Diagnostics GmbH). O radiofármaco [¹⁸F]FDG (0,5-1 mCi em até 0,2 mL) foi então administrado via endovenosa na veia peniana. Após 45 min da injeção, os animais foram novamente anestesiados e então posicionados com o cérebro no centro do campo de visão do equipamento PET para pequenos animais (Triumph Trimodality, Gamma Medica Ideias, Califórnia USA) e imagens foram adquiridas por 30 minutos. Após finalização da imagem cerebral, o animal foi reposicionado para o coração ficar no centro do equipamento por mais 15 minutos. Durante todo o tempo de aquisição das imagens os animais foram mantidos em maca aquecida e permaneceram com os batimentos cardíacos monitorados (67).

Após finalização das imagens PET (tomografia por emissão de pósitrons), os animais foram reposicionados para aquisição da imagem por tomografia computadorizada (TC), no mesmo equipamento, com aquisição de 2-4 min utilizando 45 kVp e 400 μ A. Imagens PET foram reconstruídas utilizando algoritmo OSEM (Ordered Subsets Expectation Maximization) 3D e as imagens de CT foram reconstruídas utilizando algoritmo FBP (Filtered Back Projection). As imagens foram analisadas no software PMOD® e/ou AMIDE.

3.7. Análise dos metabólitos séricos

Amostras de soro dos animais foram colocadas à 40°C durante 30-60min para descongelamento. A cada alíquota de soro (70 μ L) foram adicionados 310 μ L de solução de Acetonitrila:Isopropanol:Água MilliQ (3:3:2 v/v) para desproteinização e 5 μ L de padrão interno. Após agitação durante 15 segundos, a mistura foi centrifugada por 15min a 15,800xg a 40°C. O sobrenadante (320 μ L) foi transferido para um novo tubo e liofilizado em speed vac por 18 horas.

Para análise dos metabólitos por GC-MS (*gas chromatography–mass spectrometry*), o resíduo foi ressuspendido em 50 μ L da solução de metoxiamina diluído em piridina (Sigma-Aldrich) (40mg/mL) e agitado durante 3 minutos. A reação de metoximação ocorreu à temperatura ambiente durante 16 horas, seguido por trimetilsililação durante 1 hora com a adição de 100 μ L de MSTFA (N-methyl-N trimetilsililtrifluoroacetamina) com 1% de TMCS (trimethylclorosilano) (Sigma-Aldrich). Após derivação, 1 μ L do derivado foi utilizado para análise em GC-MS. O uso do derivado para análise foi utilizado em no máximo 24h após. Para os padrões Internos: Bloqueio do Tempo de Retenção - Retention Time Locking (RTL) e o padrão de

quantificação (PI). A utilização do RTL reduz a variação do tempo de retenção em cada amostra, sendo empregado também para a identificação de biblioteca de metabólitos Agilent Fiehn GC/MS Metabolomics RTL Library (version A.01.00).

Amostras Derivadas: Para conseguir maior especificidade na identificação dos metabólitos derivados, utilizamos, além do perfil de fragmentação do espectro de PI, o padrão cromatográfico (tempo de retenção - RTL) dos metabólitos em relação a um padrão interno exógeno. O padrão RTL é necessário quando se utiliza o software Agilent GC-MS ChemStation para determinar metabólitos em amostras biológicas provenientes de derivação. O RTL foi fixado no padrão interno D27-ácido mirístico (Produto # 366889; Sigma- Aldrich) cujo tempo de retenção é 16,752 minutos. Além de importante na identificação da amostra, o padrão interno também é utilizado para quantificação relativa dos metabólitos identificados. Preparação do RTL e padrão interno (PI): Solução estoque RTL (3mg/mL) de ácido mirístico foi preparada com uma mistura de água, metanol e isopropanol (2:5:2 v/v/v). Padrão interno não derivado (PI): Uma solução estoque (3mg/mL) de cafeína com água. Amostras para controle de qualidade (QC): Para cada dia de preparo de amostra, foi também preparada, paralelamente uma amostra padrão como controle de qualidade (QC). A amostra QC consiste de um *pool* de amostras de soro, e é a mesma (uma alíquota por dia) para todos os dias de aquisição de dados. Amostras QC foram utilizadas para checar a sensibilidade, bem como a tendência do sistema de injeção, estabilidade, reprodutibilidade e calibração do equipamento.

Espectrômetro de Massa

As análises foram realizadas no equipamento GC-MS Agilent (7890BGC; 5977A MS). Um microlitro da amostra foi injetado no sistema GC Agilent 7890B operando no modo *splitless*. Um coluna DB5-MS com 10mm de pré coluna Duragard capillary (Agilent 122-5532G) com fluxo de gás hélio a $1,1\text{ mL min}^{-1}$ para a separação dos metabólitos foi utilizada. A temperatura do injetor foi fixada em 2500°C e a temperatura da coluna mantida a 600°C durante o primeiro minuto, seguida de uma curva de aquecimento até atingir 3100°C , a uma taxa de $100^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Após separação cromatográfica, os metabólitos foram automaticamente injetados no MS (Agilent 5977A). A ionização ocorre por impacto de elétrons (70eV) e o espectro de massa foi registrado após solvente delay de 6,5min. A temperatura do MS quadrupolo foi fixada em 1800°C e a fonte de íons em 2800°C . Cada amostra foi injetada em triplicata no equipamento.

Análise de dados metabolômicos

A identificação dos compostos foi determinada por meio da comparação do espectro de massas de fragmentação e o RTL, utilizando as bibliotecas de metabólitos Agilent Fiehn GC/MS Metabolomics RTL (versão A.01.00) e National Institute of Standards and Technology (NIST) (2011) por meio do software Unknowns - Agilent MassHunter Work-station Quantitative Analysis (version B.06.00). A quantificação dos metabólitos foi baseada na comparação da área sobre a curva de cada metabólito pela área do pico do RTL, que possui concentração conhecida.

3.8 Análise Estatística

As análises dos dados foram feitas utilizando o software Prisma (GraphPad Softwares Inc., San Diego, USA). Para a análise dos metabólicos séricos foi utilizado o programa Metaboanalyst. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão. A taxa de mortalidade cumulativa nos animais foi calculada pela curva de sobrevivência de Kaplan-Meier e comparada pelo teste log-rank. Diferenças entre grupos foram comparadas por teste ANOVA - 1 via, seguido do teste post-hoc de Bonferroni. Quando o valor de p foi de $p \leq 0,05$ o resultado comparativo entre os grupos foi considerado estatisticamente significativo.

3.9 Desenho Experimental

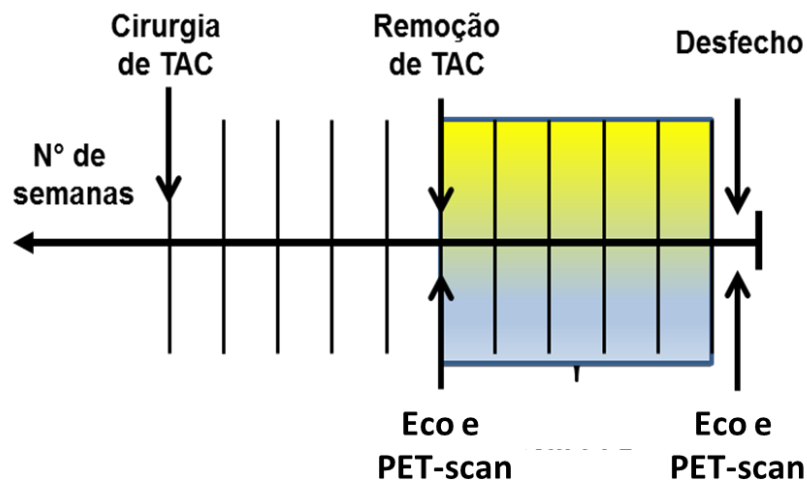


Figura 2. Desenho experimental

4. Resultados

Para avaliar o grau de estenose causado pela colocação cirúrgica do clipe de titânio no arco aórtico, os animais foram submetidos a exame ecocardiográfico após 72 horas da cirurgia. Os animais do grupo TAC apresentaram aumento significativo da espessura do septo na diástole do ventrículo esquerdo (Ctr±DP vs TAC±DP) $0,620\pm 0,0320\text{mm}$ vs $0,835\pm 0,0459\text{mm}$; $p=0,018$ (Fig 3A), um dos parâmetros de caracterização da hipertrofia cardíaca. O diâmetro da aorta ascendente também foi significativamente diferente nos animais do grupo TAC quando comparado com o controle: $1,35\pm 0,23\text{mm}$ vs $1,58\pm 0,05$; $p=0,018$ (Fig 3B). Parâmetros hemodinâmicos também foram alterados com aumento do fluxo doppler no ramo braquiocefálico dos animais do grupo TAC quando comparado com o controle; $321\pm 48\text{mm/s}$ vs $708\pm 27\text{mm/s}$; $p=0,0001$ (Fig 3C). Ademais, o fluxo doppler na artéria aorta apresentou redução da velocidade para os animais do grupo TAC em comparação ao controle; $2385\pm 98\text{mm/s}$ vs $1746\pm 83\text{mm/s}$; $p=0,002$ (Fig 3D).

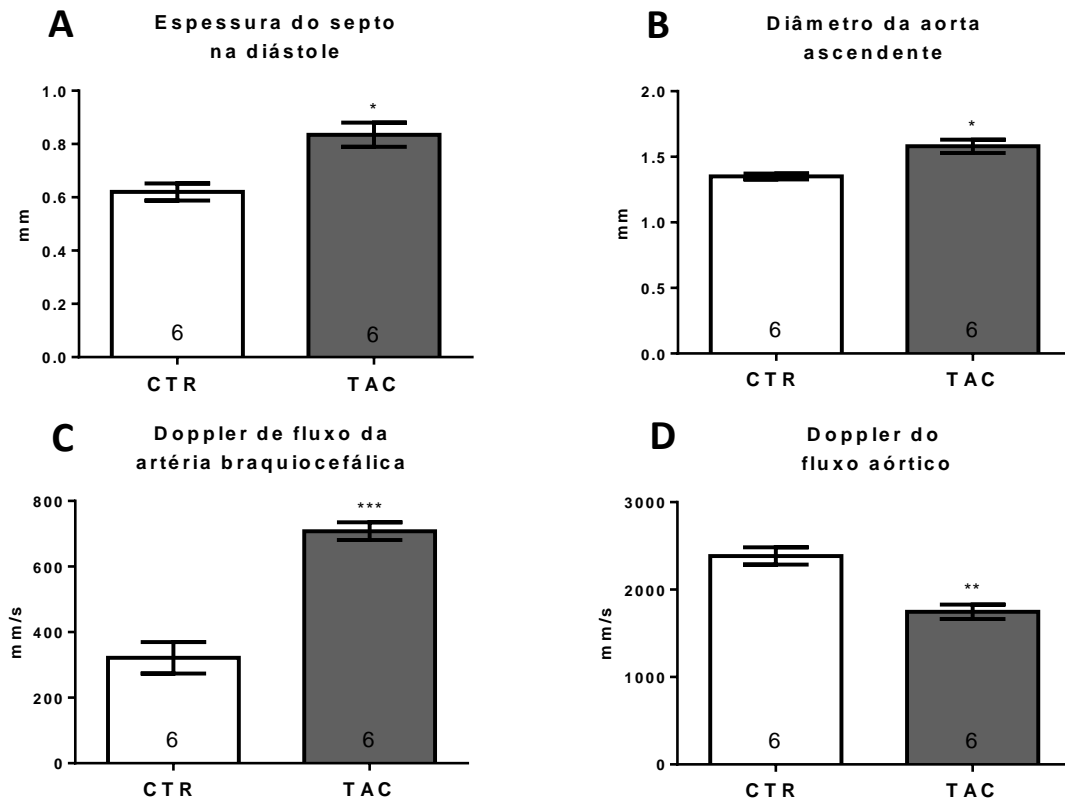


Figura 3. Animais submetidos a colocação do clipe de titânio apresentaram alterações ecocardiográficas após 72 horas da cirurgia de colocação do clipe.

A) Espessura do septo do ventrículo esquerdo na diástole. B) Diâmetro ascendente da aorta na sístole do ventrículo esquerdo. C) Medida de fluxo doppler sistólico na artéria braquiocefálica. D) Medida de doppler sistólico do fluxo aórtico. Comparação dos animais controle (CTR) vs Constrição Transversa da Aorta (TAC).

Após verificar a hipertrofia do ventrículo esquerdo e as alterações vasculares causadas pelo modelo de constrição da aorta em 72 horas de estenose, os animais do grupo TAC foram separados de forma aleatória em dois subgrupos: REM; grupo que removeu o clipe depois de cinco semanas da primeira cirurgia e o grupo TAC; grupo que permaneceu com o clipe até o término do protocolo (dez semanas). A eficácia do método foi verificada por exame de tomografia computadorizada (TC) para checar a posição e o diâmetro do clipe fechado (área efetiva de estenose) em 5

semanas. A estenose foi verificada novamente ao término do protocolo em dez semanas, desta vez com outro método, por meio de medição do clipe com paquímetro.

Na busca de respostas para as repercussões cardiovasculares na reversão do remodelamento cardíaco para o grupo REM e para avaliar o nível de lesão dos animais que permaneceram com o clipe, grupo TAC, análises biométricas cardíacas foram realizadas. Os animais do grupo REM apresentaram reversão da hipertrofia cardíaca em 10 semanas por meio de diferentes técnicas. Exames ecocardiográficos demonstraram não haver diferença entre o grupo CTR vs o grupo REM, todavia o grupo TAC apresentou maior espessura de parede septal na diástole em 5 e 10 semanas quando comparada com o grupo controle: CTR vs TAC 5 vs TAC 10 ($0,765 \pm 0,07\text{mm}$ vs $0,932 \pm 0,16\text{mm}$ vs $0,928 \pm 0,11\text{mm}$; $p \leq 0,04$; Fig 4A), sem apresentar diferença na análise de variância com o grupo REM.

A partir de medidas ecocardiográficas e por meio da equação de Pen, determinou-se a massa do ventrículo esquerdo e as diferenças não passaram de tendências na comparação entre os grupos: CTR vs 5 TAC ($p=0,051$; Fig 4B). Entretanto, quando avaliado o peso absoluto dos ventrículos e normalizado com o comprimento da tíbia, os animais do grupo TAC apresentaram aumento significativo da massa ventricular em 10 semanas quando comparado com o grupo controle ($0,0081 \pm 0,0008\text{mg/mm}$ vs $0,0092 \pm 0,0011\text{mg/mm}$; $p=0,026$; Fig 4C), sem apresentar diferenças entre os demais grupos. Dados de espessura do septo do ventrículo esquerdo na sístole não demonstraram diferenças significativas (Fig 4D).

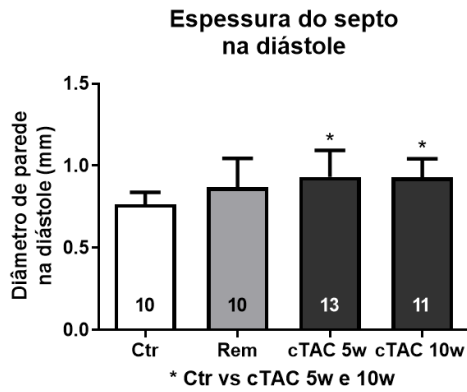
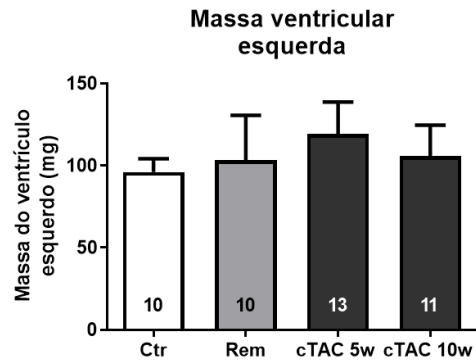
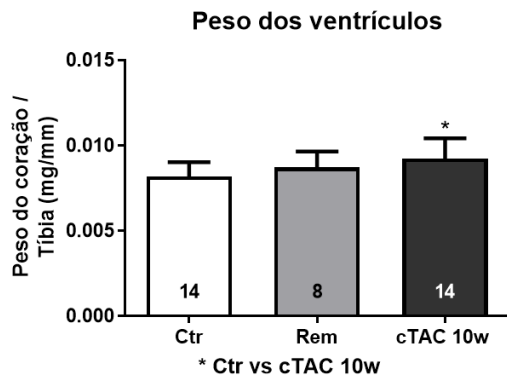
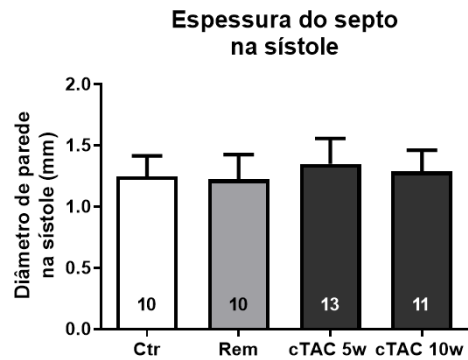
A**B****C****D**

Figura 4. Análise biométrica cardíaca após reversão da hipertrofia do ventrículo esquerdo. A) Espessura do septo na diástole do ventrículo esquerdo. B) Massa do ventrículo esquerdo calculada pela equação de Pen. C) Peso dos ventrículos cardíacos dividido pelo comprimento da tíbia. D) Espessura do septo na sístole do ventrículo esquerdo.

A fibrose ventricular refletiu em modulação da expressão gênica. Animais do grupo TAC 10 apresentaram aumento significativo da fibrose intersticial por coloração de picrosírius quando comparado ao grupo controle; CTR vs TAC 10: ($1,26 \pm 0,40\%$ vs $2,60 \pm 0,53\%$; $p=0,0003$; Fig 5A) e de mesma magnitude na comparação entre REM vs TAC 10 ($1,15 \pm 0,43\%$ vs $2,60 \pm 0,53\%$; $p=0,0003$; Fig 5A), sem diferença entre os grupos CTR vs REM. As imagens representativas das lâminas coradas com picrosírius estão na figura 5B.

Resultados de expressão de genes associados com o remodelamento cardíaco resultaram em alteração da expressão gênica de TIMP 1, que mais do que dobrou para os animais do grupo REM quando comparado com o CTR: CTR vs REM ($1,00 \pm 1,03$ RNAm vs $2,85 \pm 1,08$ RNAm; $p \leq 0,004$; Fig 5C). Notadamente o grupo REM para o gene TIMP 1 foi diferente na comparação com TAC 10: REM vs TAC10 ($2,85 \pm 1,08$ RNAm vs $1,22 \pm 1,22$ RNAm; $p \leq 0,004$; Fig 5C). Para a expressão de ANP, os grupos REM e TAC 5 apresentaram aumento significativo quando comparados aos grupos CTR e TAC 10: CTR vs REM vs TAC 5 vs TAC 10 ($1,00 \pm 1,98$ RNAm vs $4,04 \pm 1,27$ RNAm vs $5,09 \pm 0,51$ RNAm vs $1,61 \pm 0,86$ RNAm; $p \leq 0,0001$; Fig 5D).

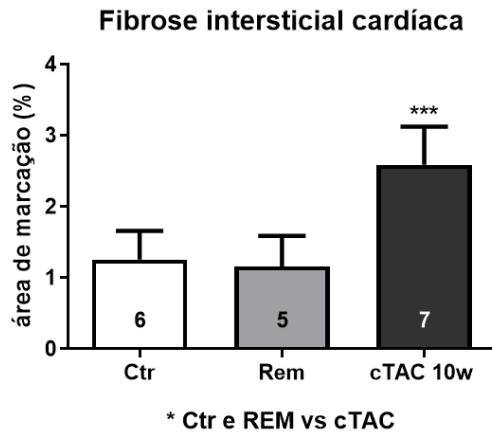
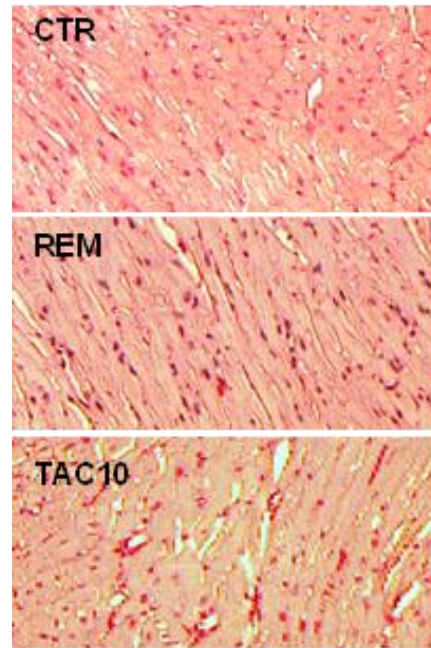
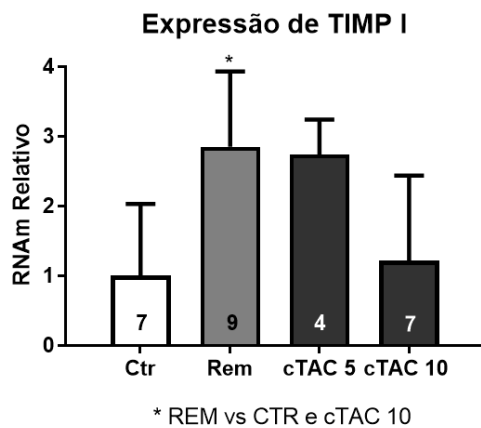
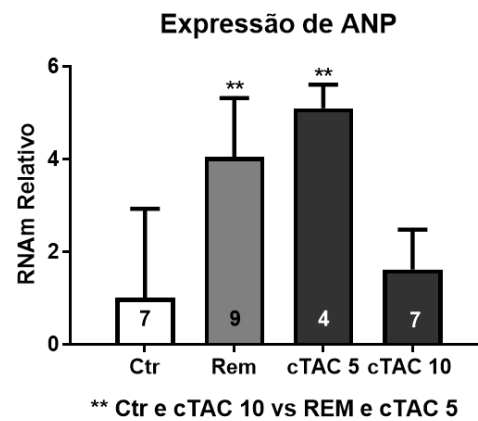
A**B****C****D**

Figura 5. Análise estrutural e de expressão gênica relacionadas ao remodelamento ventricular cardíaco. A) Quantificação histológica da coloração de picrosírius. B) Imagem representativa de fibrose para a coloração de picrosírius adquirida com aumento de 200 vezes. C) Expressão gênica relativa de TIMP 1. D) Expressão gênica relativa de ANP.

Alterações estruturais cardíacas refletem em mudanças funcionais do ventrículo esquerdo. Por meio de exames ecocardiográficos, a função diastólica foi avaliada por diferentes parâmetros. A perfusão tecidual do ventrículo esquerdo apresentou aumento significativo da onda a' (linha) para todos os grupos em relação ao controle: CTR vs REM vs TAC 5 vs TAC 10 ($15,90 \pm 3,24$ mm/s vs $24,10 \pm 6,15$ mm/s vs $24,25 \pm 5,85$ mm/s vs $25,29 \pm 9,95$ mm/s; $p \leq 0,04$; Fig 6A) e alterações de perfusão da onda e' (linha), com aumento significativo para os animais do grupo TAC 10 vs CTR: CTR vs TAC 10 ($18,52 \pm 3,38$ mm/s vs $29,97 \pm 11,29$ mm/s; $p = 0,0043$; Fig 6B). O padrão hemodinâmico de fluxo doppler na artéria braquiocefálica permaneceu maior do que o controle para os grupos TAC 5 e TAC 10: CTR vs TAC 5 vs TAC 10 (696 ± 119 mm/s vs 1233 ± 409 mm/s vs 1251 ± 483 mm/s; $p < 0,025$; Fig 6C). Além disso, os marcadores de função sistólica apresentaram-se preservados na comparação entre os grupos, inclusive a fração de ejeção (Fig 6D).

Com respeito às avaliações da função cardíaca, o modelo sugere alterações funcionais diastólicas discretas com preservação da função sistólica. Ademais, no presente estudo foi testado se o modelo de TAC aqui descrito está relacionado com piores desfechos cardiovasculares e portanto um estado de IC com fração de ejeção preservada. Na busca de sinais de insuficiência cardíaca foram medidos os índices de congestão pulmonar (Fig 7A) e hepática (Fig 7B) e nenhuma diferença estatística foi encontrada. Além disso, o consumo de glicose marcada para o coração foi medido para a busca de pequenas alterações do metabolismo glicolítico cardíaco global e novamente nenhuma diferença estatística foi encontrada (Fig 7C).

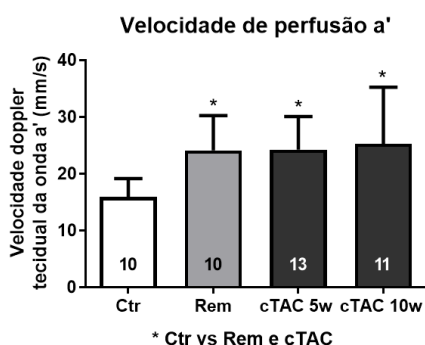
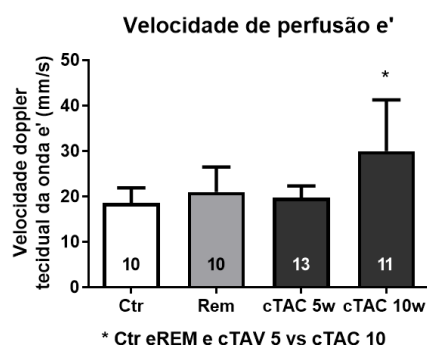
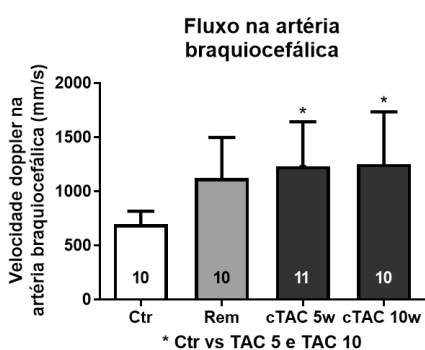
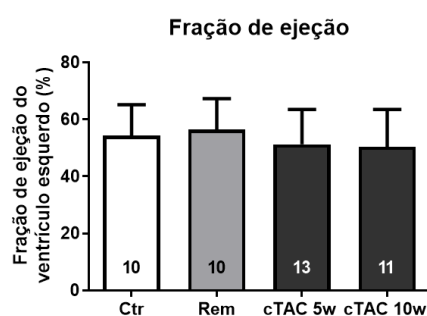
A**B****C****D**

Figura 6. Função cardíaca e hemodinâmica medidas por ecocardiografia. A) Velocidade doppler de perfusão tecidual da onda a'. B) Velocidade doppler de perfusão tecidual da onda e'. C) Fluxo doppler da artéria braquiocefálica na sístole. D) Fração de ejeção do ventrículo esquerdo.

A colocação do clipe de titânio parece adaptar o sistema cardiovascular para uma condição de estresse crônico e, portanto, um estado hipertensivo compensado sem IC. Como contraprova, realizamos um estudo piloto de análise de sobrevivência com um ano de seguimento em animais que permaneceram com a estenose durante 12 meses. Após um ano da data da cirurgia de estenose, apenas um animal permaneceu vivo do grupo TAC, sem haver morte entre os animais do grupo controle (CTR: n=8

TAC: n=6; p=0,02; Fig 7D). O animal sobrevivente apresentou hipertrofia cardíaca significativa e disfunção diastólica importante com fração de ejeção preservada.

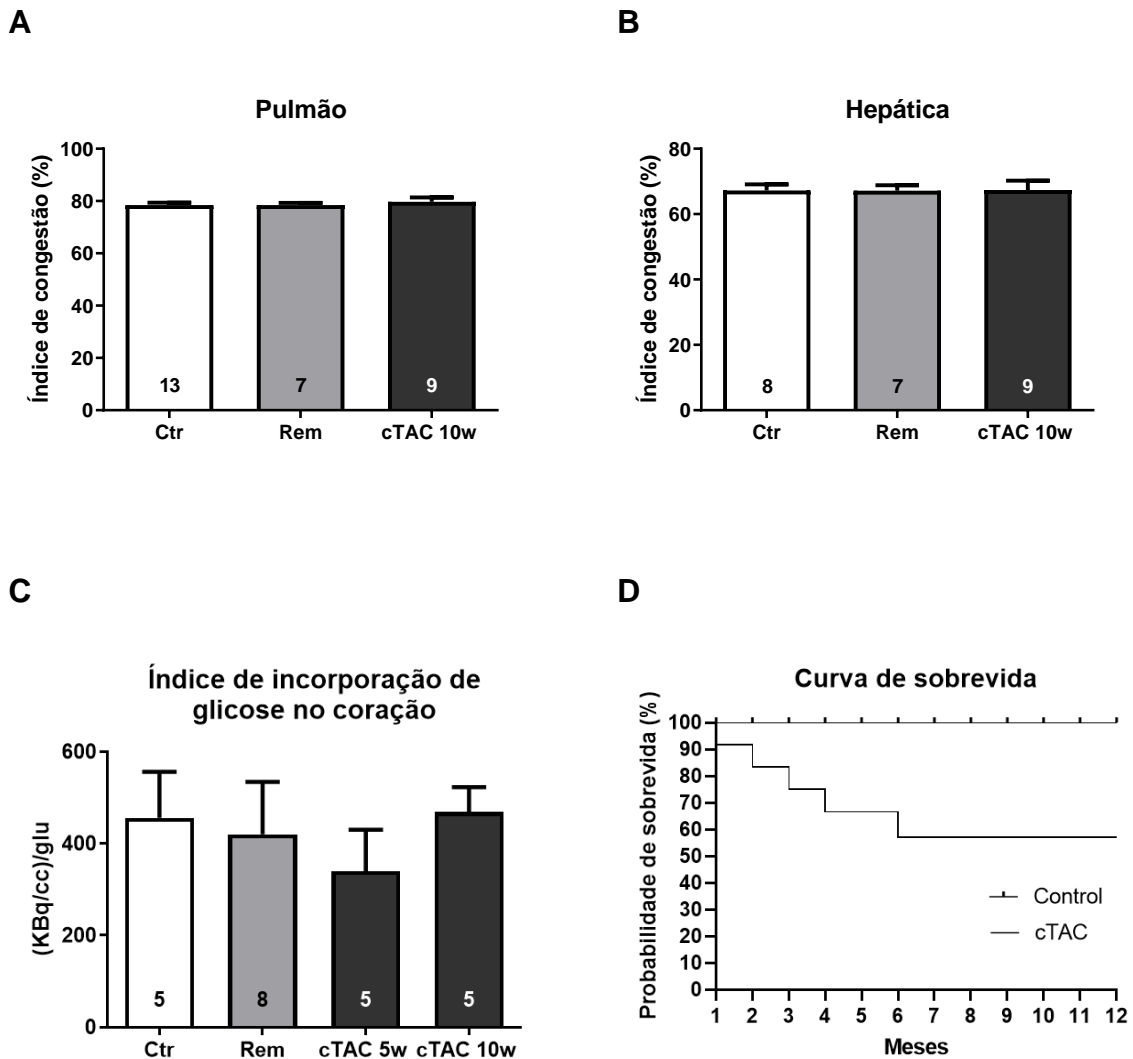


Figura 7. Parâmetros indicativos de insuficiência cardíaca do ventrículo esquerdo.

A) Índice de congestão pulmonar. B) Índice de congestão hepática. C) Análise de incorporação de glicose marcada no coração. D) Curva de Kaplan-Meier para mortalidade de animais submetidos a TAC acompanhados por 12 meses; n=8 (CTR); n=6 (TAC).

O aumento do fluxo doppler no tronco braquicefálico afeta o fluxo nas artérias carótida direita e subclávia direita, que por sua vez aumentam a sobrecarga hemodinâmica para diferentes regiões cerebrais. Desta forma, os animais foram avaliados por exame não invasivo em aparelho de Pet-scan com a utilização de sonda de glicose marcada radioativamente (FDG-18F) para medir a incorporação de glicose em diferentes regiões cerebrais.

A incorporação de glicose marcada para o hipotálamo, região de intensa atividade metabólica e centro autonômico do corpo, evidenciou aumento significativo da incorporação de glicose para o grupo TAC 10 quando comparado ao CTR: CTR vs TAC 10 ($0,74 \pm 0,09$ SUV vs $0,95 \pm 0,09$ SUV; $p < 0,0004$; Fig 8A). Tanto para o mesencéfalo como para o córtex, o grupo REM apresentou incorporação de glicose menor do que o grupo CTR, respectivamente: CTR vs REM; mesencéfalo ($0,96 \pm 0,15$ SUV vs $0,74 \pm 0,09$ SUV; $p = 0,02$; Fig 8B); córtex ($0,84 \pm 0,11$ SUV vs $0,24 \pm 0,11$ SUV; $p = 0,003$; Fig 8C), enquanto que para o cerebelo esta comparação apresentou-se como uma tendência de redução ($p = 0,076$; Fig 8D), em que a diferença foi presente na comparação entre o grupo REM vs TAC 10 ($0,80 \pm 0,13$ SUV vs $1,03 \pm 0,10$ SUV; $p = 0,015$; Fig 8D).

As regiões periféricas cerebrais também foram analisadas quanto à incorporação de glicose e a redução de consumo para o grupo REM quando comparado ao CTR se manteve para as regiões do tálamo ($1,00 \pm 0,15$ SUV vs $0,75 \pm 0,11$ SUV; $p = 0,03$; Fig 9A) e para o estriado ($1,12 \pm 0,13$ SUV vs $0,87 \pm 0,09$ SUV; $p = 0,015$; Fig 9B). Para as regiões do hipocampo foram encontradas diferenças estatísticas entre o grupo CTR vs TAC 10 ($0,73 \pm 0,09$ SUV vs $0,95 \pm 0,09$ SUV;

$p=0,0004$; Fig 9C) e na comparação de REM vs TAC 10 ($0,68\pm0,06$ SUV vs $0,95\pm0,09$ SUV; $p=0,0001$; Fig 9C).

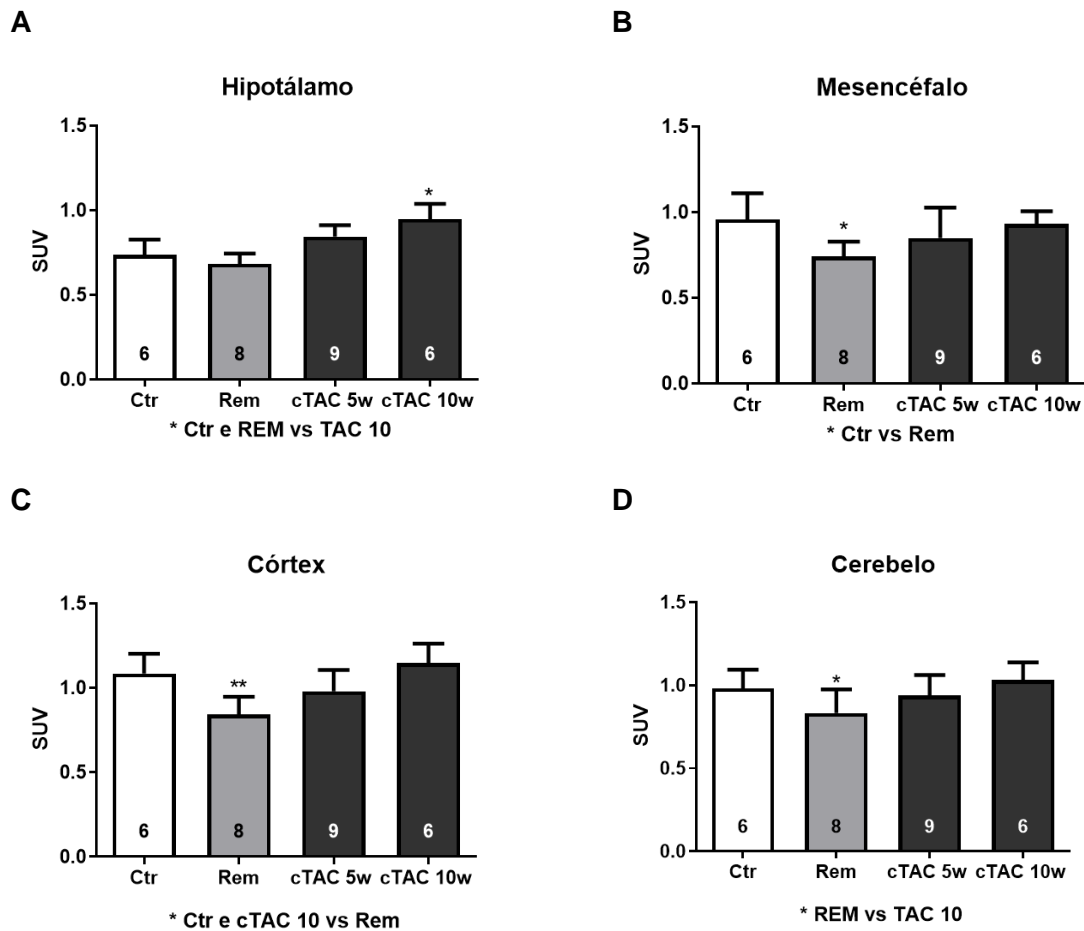


Figura 8. Incorporação e consumo de glicose marcada para diferentes regiões cerebrais. A) Incorporação de glicose para a região hipotalâmica do cérebro. B) Incorporação de glicose para a região do mesencéfalo cerebral. C) Incorporação de glicose para o córtex. D) Incorporação de glicose para o cerebelo. SUV= *Standardized uptake value*

Se aventada a possibilidade de menor massa cerebral para o grupo REM e, portanto, menor incorporação de glicose para diferentes regiões cerebrais quando comparada ao grupo controle, o cérebro foi pesado e normalizado pelo comprimento da tíbia de cada animal e desta forma não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos ($p=0,327$; Fig 9D).

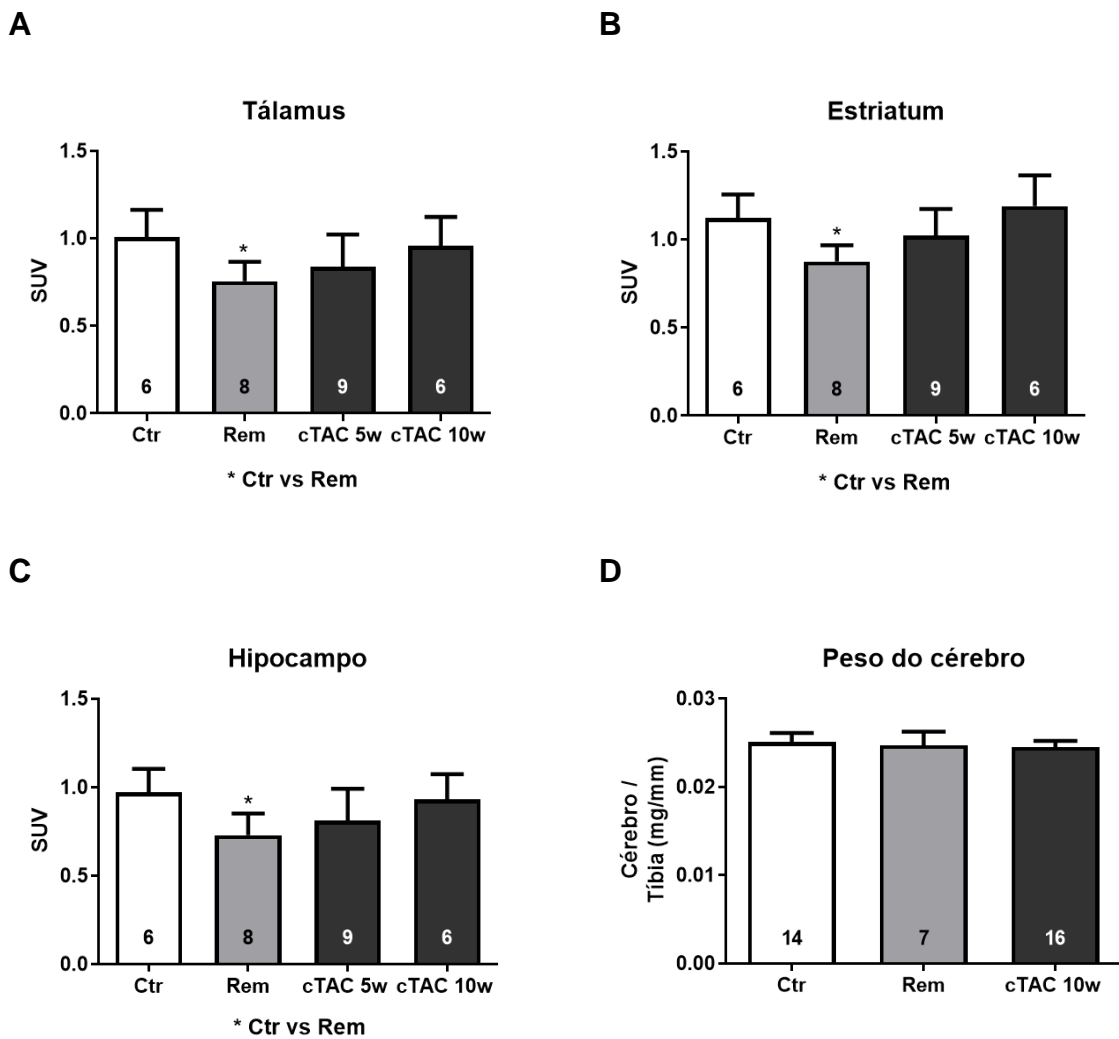


Figura 9. Consumo de glicose marcada para diferentes regiões cerebrais. A) Incorporação de glicose para o tálamo do cérebro. B) Incorporação de glicose para a região do estriatum cerebral. C) Incorporação de glicose para o tálamo. D) Peso da massa cerebral normalizada pelo comprimento da tíbia. SUV=*Standardized uptake value*

Partindo das evidências apresentadas até o momento e buscando marcadores séricos para caracterização das primeiras sinalizações de lesão de órgão alvo na hipertensão, buscamos por meio de metabolômica explorar mudanças moleculares envolvidas na fisiopatologia da hipertrofia cardíaca, disfunção diastólica discreta e alterações cerebrais relacionadas com o metabolismo. Desta forma, foram dosados diferentes metabólitos séricos envolvidos no metabolismo glicolítico. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão, seguindo a nomenclatura: CTR vs REM vs TAC 5 vs TAC 10. A glicose apresentou-se aumentada no grupo TAC 10 quando comparada com os demais grupos ($300718 \pm 124638 \text{ ng/mL}$ vs $257517 \pm 75598 \text{ ng/mL}$ vs $232562 \pm 12282 \text{ ng/mL}$ vs $443299 \pm 60976 \text{ ng/mL}$; $p=0,0001$; Figura 10A). Todavia, na fase final da glicólise caracterizada pela dosagem do piruvato (Figura 10B) o grupo TAC 10 foi diferente apenas comparando o mesmo grupo em 5 semanas (TAC 5 vs TAC 10): $3326 \pm 707.6 \text{ ng/mL}$ vs $7124 \pm 1269 \text{ ng/mL}$; $p=0.0022$. Na caracterização do metabolismo anaeróbico da glicose, o lactato para o grupo TAC 5 apresentou menor valor quando comparado aos demais grupos ($327341 \pm 102760 \text{ ng/mL}$ vs $329137 \pm 40244 \text{ ng/mL}$ vs $220759 \pm 23818 \text{ ng/mL}$ vs $347421 \pm 24486 \text{ ng/mL}$; $p=0,0023$; Figura 10C). Na caracterização das vias das pentoses, representada pela dosagem da ribose 5-fosfato (fase oxidativa da glicose 6-fosfato), nenhuma diferença significativa foi encontrada (Figura 10D).

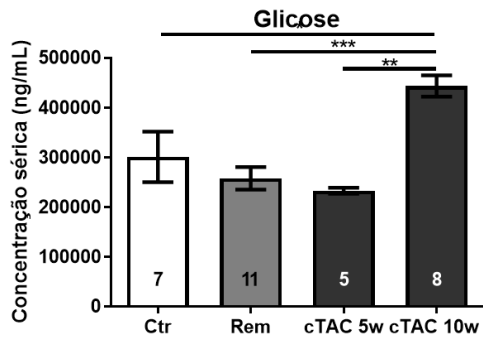
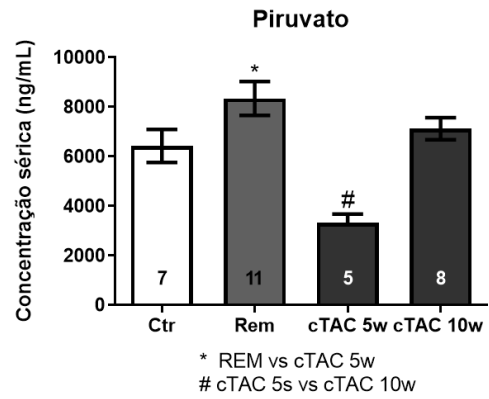
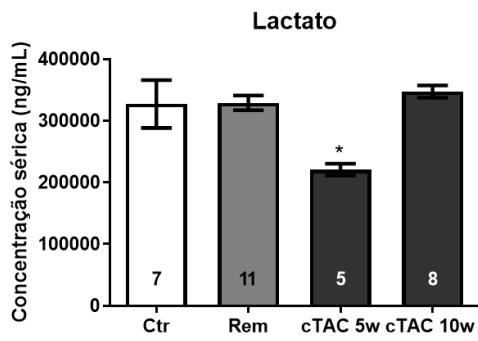
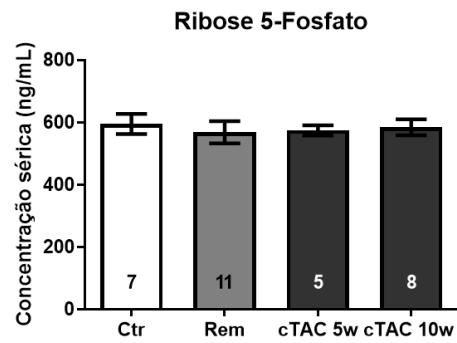
A**B****C****D**

Figura 10. Análise sérica de moléculas envolvidas em diferentes vias metabólicas. A) Concentração de glicose. **B)** Concentração de piruvato. **C)** Concentração de lactato. **D)** Concentração de ribose 5-fosfato.

Moléculas intermediárias do ciclo do ácido cítrico também foram quantificadas e identificadas para os diferentes grupos testados. Os níveis de citrato estavam menores nos animais TAC 5 quando comparados ao CTR e ao grupo REM ($78513 \pm 18966 \text{ ng/mL}$ vs $82488 \pm 13302 \text{ ng/mL}$ vs $50118 \pm 8558 \text{ ng/mL}$; $p=0,0031$; Fig 11A). Não foram encontradas diferenças significativas para o aconitato (Figura 11B) e para o succinato (Figura 11C), e a partir destes intermediários o fumarato mostrou-se menor para os grupos TAC 5 e TAC 10 quando comparado aos grupos CTR e REM ($6952 \pm 3343 \text{ ng/mL}$ vs $6390 \pm 2060 \text{ ng/mL}$ vs $2699 \pm 736.8 \text{ ng/mL}$ vs $3663 \pm 1705 \text{ ng/mL}$; $p=0,0053$; Fig 11D). Resultado semelhante também foi evidenciado na concentração do malato, com níveis menores para os grupos TAC 5 e TAC 10 quando comparados com os grupos CTR e REM ($17310 \pm 6929 \text{ ng/mL}$ vs $16392 \pm 4653 \text{ ng/mL}$ vs $7724 \pm 2170 \text{ ng/mL}$ vs $9749 \pm 3942 \text{ ng/mL}$; $p=0,0029$; Fig 11E). Para os níveis de oxalacetato, o grupo TAC 5 demonstrou-se menor quando comparado ao grupo REM ($232.8 \pm 73.16 \text{ ng/mL}$ vs $121.2 \pm 6.148 \text{ ng/mL}$; $p=0,0131$; Figura 11F).

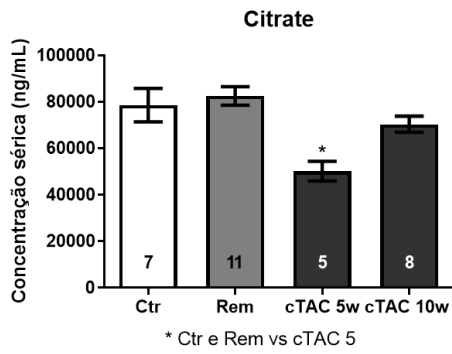
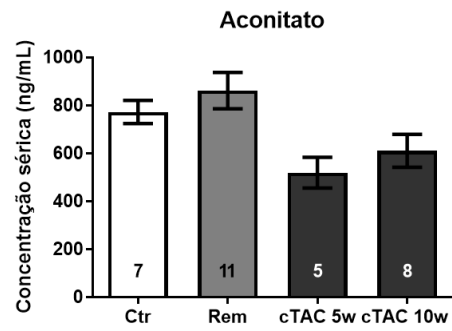
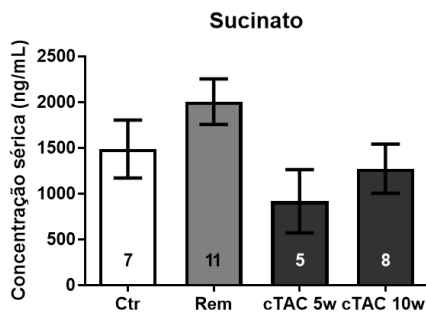
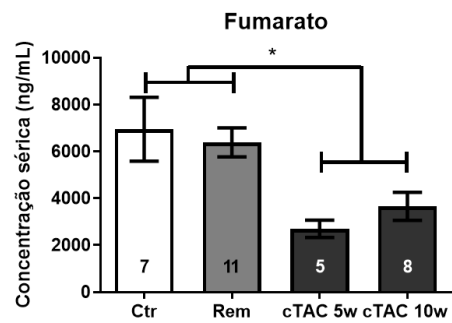
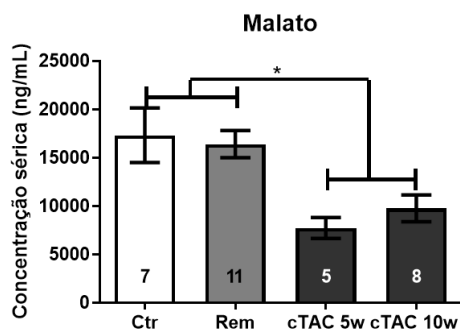
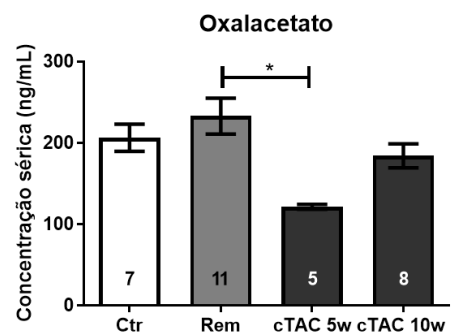
A**B****C****D****E****F**

Figura 11. Análise de metabólitos séricos intermediários do ciclo do ácido cítrico para os diferentes grupos experimentais. A) Concentração de citrato. B) Concentração de aconitato. C) Concentração de succinato. D) Concentração de fumarato. E) Concentração de malato. F) Concentração de oxalacetato.

5. Discussão

Modelos com estenose do arco aórtico em roedores têm sido utilizado por diversos grupos na literatura para pesquisa com hipertensão. Os estudos têm como foco o entendimento da hipertrofia cardíaca e suas consequências (54, 68-70). Outros estudos também abordam os danos vasculares na hipertensão (71), assim como as repercussões cerebrovasculares na hipertensão (48, 72). Ainda que se utilizem drogas que detenham os danos causados pela estenose, o curso da doença avança sem a reversão do dano progressivo causado pela estenose definitiva por fio de nylon (70, 73).

Entre as pesquisas na área de hipertensão e hipertrofia cardíaca, poucos são os estudos que abordam a reversão do remodelamento cardíaco no curso do tempo. Do ponto de vista clínico, a reversão do remodelamento cardíaco acontece quando a estratégia terapêutica ou cirúrgica restabelece o fluxo cardíaco normal, ocorrendo mudanças na massa, no volume e na geometria das cavidades cardíacas para valores de referência normais (74).

A partir de uma metanálise que buscou ensaios clínicos duplo-cegos, randomizados, com diferentes classes de medicamentos anti-hipertensivos para o tratamento da HAS, estabeleceu-se que os inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) seriam a classe farmacológica mais apropriada para a reversão da hipertrofia cardíaca, quando comparados aos bloqueadores de canal de cálcio, diuréticos e β -bloqueadores (75, 76)

Todavia, a reversão do remodelamento cardíaco está relacionada com outros fatores importantes que acontecem no tecido cardíaco, tais como: fibrose intersticial,

regulação metabólica interna do órgão, expressão gênica tecidual e mecanismos oxidativos teciduais, que não são possíveis de serem avaliados em protocolos de pesquisa clínica.

Desta forma, a correlação destes marcadores teciduais em modelo animal com moléculas séricas diferentemente presentes no sangue de pacientes hipertensos pode identificar marcadores de lesão precoce de órgão-alvo na hipertensão. Para o nosso modelo de hipertensão cardíaca e cerebrovascular, foi possível quantificar alterações moleculares sistêmicas relacionadas com o metabolismo. As maiores diferenças foram de metabólitos da via do ciclo do ácido cítrico encontradas no sangue.

O ciclo do ácido cítrico aproveita intermediários do metabolismo para a produção de ATP (por meio de fosforilação oxidativa ou fosforilação ao nível do substrato sem um aceptor final de elétrons, como na hipóxia) e fornece precursores para vias de biossíntese (77). Além disso, os metabólitos do ciclo exercem uma série de ações de sinalização com efeitos importantes em condições fisiológicas ou patológicas (78).

O fumarato, além de ser precursor de malato no ciclo do ácido cítrico, é um sinalizador anti-inflamatório e exerce ação cardioprotetora por meio da ativação da via do Nrf2, fator de transcrição que coordena a defesa contra o estresse oxidativo por meio da ativação de genes de resposta antioxidante (77). Ainda, um estudo com modelo de síndrome metabólica em porcos descreveu uma correlação entre a diminuição de fumarato no coração e menor expressão do fator indutor de hipóxia HIF1A e alteração na angiogênese cardíaca (79).

Em um estudo com ratos e camundongos, a administração de fumarato de dimetila resultou em ativação da via Nrf2 e proteção do cérebro contra o dano causado pela hemorragia intracerebral induzida, com melhora na resolução do hematoma, diminuição do edema cerebral e melhora na recuperação neurológica (Zhao et al., 2015). Em modelo murino, o tratamento com fumarato de dimetila protegeu os neurônios contra a toxicidade induzida pela ativação da microglia e de astrócitos associada à neuroinflamação, presente em condições como a doença de Alzheimer (80).

O malato também parece participar de outras vias metabólicas, com efeito protetor contra lesão cardíaca isquêmica. Em modelo de isquemia-reperfusão em ratos, a administração de L-malato preservou parcialmente a função cardíaca e aumentou a atividade antioxidante por meio da ativação da via Nrf2/Keap 1 (81).

No presente estudo, foi observada reduções significativas nos níveis globais de fumarato e de malato, fato que sugere um marcador precoce de desbalanço metabólico associado às repercussões causadas pela permanência do clipe, mas que são revertidas com a remoção da estenose em cinco semanas para o grupo REM.

Sobre o estudo da reversão, Yang e colaboradores (2007) demonstraram que ratos, após duas semanas de constrição da aorta e um dia após a remoção da estenose por fio de nylon, apresentaram 6 genes estritamente expressos apenas na fase de reversão do remodelamento cardíaco, além disso foi encontrado o gene Eya 2 como sendo um importante cofator na regressão da hipertrofia cardíaca, sugerindo que a ativação deste gene pode ser cardioprotetora no processo de hipertrofia cardíaca (82).

Outro estudo em camundongos com constrição da aorta por 3, 4 e 6 semanas seguida pela remoção do fio e acompanhamento por mais uma semana, demonstrou que os animais que permaneceram com a estenose por 6 semanas não foram capazes de reverter a estrutura e a função cardíaca, sendo um momento avançado da hipertrofia cardíaca descompensada, com perfil de expressão gênica diferente dos demais grupos, sugerindo que a mudança da fase de hipertrofia cardíaca compensada para a descompensada ocorre entre a 4^o e a 6^o semana (83).

Estudos crônicos também foram avaliados com o mesmo método de reversão do remodelamento por constrição da aorta e demonstraram que a estenose por 8 semanas, seguida por retirada do fio de nylon e acompanhamento por mais 6 semanas reverteu parcialmente o acúmulo de fibrose intersticial cardíaca e a hipertrofia cardíaca, demonstrando que estes animais apresentam grande eficiência no processo de remodelamento reverso do ventrículo esquerdo (84).

Os três trabalhos mencionados anteriormente explicam que o ganho significativo de massa do ventrículo esquerdo para o modelo de TAC ocorre após duas semanas de estenose com manutenção no decorrer das semanas. Com relação ao presente estudo, de fato os animais com estenose em cinco semanas apresentaram aumento significativo da espessura da parede septal na diástole, com reversão deste parâmetro em dez semanas para o grupo REM. Os animais que permaneceram com o clipe por 10 semanas apresentaram fibrose intersticial com perda de cardiomiócitos e, portanto, em fase de transição para uma fase descompensada da estrutura cardíaca.

Entretanto, a função cardíaca sistólica em nenhum momento foi modulada, cursando apenas com alterações diastólicas discretas para os animais REM e TAC

em dez semanas. A manutenção de problemas diastólicos, mesmo após controle da hipertensão sem alterações sistólicas, não é um fato novo. Estudos em pacientes demonstram que a disfunção diastólica apresenta componentes distintos dos mecanismos sistólicos do ventrículo esquerdo (85, 86).

Com relação ao modelo proposto, a mortalidade e o grau de estenose pelo método de colocação do clipe de titânio em camundongos são similares quando comparados à cirurgia clássica de estenose aórtica por fio de nylon. Segundo Nakamura et. al. (2001), a mortalidade chegou a 39% após a cirurgia de estenose, bem como alcançou uma constrição entre 65-70% da aorta (87). Os benefícios relacionados com o uso do clipe incluem a baixa aderência do titânio, facilitando a sua retirada. Além disso, o titânio apresenta boa memória que impede variações significativas no diâmetro da estenose. É importante ressaltar que a magnitude da estenose proposta no presente estudo, revelou aumento significativo da mortalidade dos animais TAC em fases mais crônicas, fato que certifica tratar-se de um modelo de estudo da hipertensão em fases patológicas iniciais.

Conforme observado em diversos trabalhos, as velocidades doppler na carótida direita aumentam de forma aguda, porém com o passar do tempo os vasos se adaptam e as velocidades tendem a diminuir (71). Com base nos resultados apresentados neste estudo, foi possível observar que mesmo após remoção da estenose o fluxo na artéria braquiocefálica permaneceu significativamente maior que o controle em cinco e dez semanas. Fato que altera a perfusão de sangue para o hemisfério direito do cérebro tanto para o grupo REM como para o TAC. Neste sentido, às custas de manter perfusão o sistema cardiovascular, que perde complacência com aumento da pressão sustentada, mantém os gradientes elevados para garantir a perfusão necessária aos órgãos e tecidos (88)

A fibrose intersticial significativamente presente no grupo TAC 10 e ausente no grupo REM pode ser explicada pelas modulações de expressão gênica representadas pelo ANP e por TIMP 1. O peptídeo natriurético atrial (ANP) é um biomarcador bem estabelecido de insuficiência cardíaca, sendo produzido e liberado no coração em resposta à tensão de parede, além de estar associado ao risco de fibrilação atrial, síndromes coronarianas agudas, miocardite, sepse e rejeição pós-transplante. Estudos experimentais investigam ainda o envolvimento de ANP e BNP (peptídeo atriurético cerebral) na fisiopatologia na fibrose (89). Ainda, novos biomarcadores podem indicar o processo de fibrose, como Galectina-3 (Gal-3) e sST2 (*soluble suppression of tumorigenicity-2*) (90).

A expressão de ANP no presente estudo foi curiosamente intensa para os animais do grupo REM e TAC 5 e atribui-se a causa de elevação de respostas de reparo frente a injúria hipertensiva, que para os vasos aumenta o volume e a permeabilidade capilar e conseqüentemente permite a saída de água e sódio dos vasos. Além disso, o hormônio ativa a inibição de outros hormônios, como aldosterona, angiotensina II, endotelina, renina e vasopressina, reduzindo assim qualquer ação inotrópica sistêmica (91). Para os animais TAC 10, entende-se que houve uma adaptação vascular com redução do estresse hemodinâmico e portanto níveis não significativos deste hormônio e/ou esgotamento da sinalização com pronunciada fibrose cardíaca.

Ademais, o marcador de fibrose TIMP-1 (*tissue inhibitor of metalloproteinase-1*) tem sido investigado. Evidências em humanos obtidas no estudo PARADIGM-HF indicaram que a concentração de TIMP-1 no *baseline* apresentou o maior valor prognóstico para o desfecho primário (morte por doenças cardiovasculares e hospitalizações). O aumento da concentração de TIMP-1 implica na redução da

atividade de metaloproteinases de matriz extracelular que degradam colágeno, levando a um desbalanço entre a síntese, o processamento e a degradação de colágeno (92).

Em um estudo com modelo de sobrecarga pressórica induzida por TAC em camundongos, a expressão gênica cardíaca de ANP, TIMP-1, Gal-3 e GDF-15 (*growth differentiation factor-15*) aumentou após 4 e 8 semanas. A concentração plasmática de Nt-proANP aumentou significativamente após 4 e 8 semanas, enquanto a concentração plasmática de TIMP-1 aumentou somente no grupo TAC 8 semanas, assim como a de GDF-15, e não houve aumento de Gal-3 no plasma. No pulmão, também houve aumento dos níveis de TIMP-1 e GDF-15, correlacionado com congestão pulmonar, indicando que o aumento dos níveis de TIMP-1 no plasma após TAC parece envolver a contribuição do estresse hemodinâmico em outros órgãos afetados (93).

No presente estudo, a expressão de TIMP 1 no ventrículo esteve aumentada para os animais REM e demonstrou atividade de remodelamento da matriz extracelular. Neste sentido, TIMP 1 atua como componente importante no reparo intersticial e degradação da matriz extracelular, em que as MMP (metaloproteinases) são inibidas na proporção 1:1 por TIMPs (94).

Especificamente, TIMP 1 tem maior afinidade por MMP9 e, portanto, embora não se tenha fibrose importante, os mecanismos de reparo parecem estar ativos e funcionantes para este grupo. Algo que não foi observado nos animais TAC 10, ou por terem se esgotados os mecanismos de remodelamento da matriz extracelular ou por adaptações vasculares que reduziram o estresse hemodinâmico e, portanto, mitigação da injúria tissular.

Diversas evidências demonstram a relação entre hipertensão cerebral e disfunção cognitiva; entre elas, as lesões de substância branca estão diretamente relacionadas à hipertrofia do ventrículo esquerdo e piores desempenhos cognitivos em pacientes (95). As lesões que ocorrem na substância branca são causadas pelo extravasamento de pequenos vasos através da barreira hematoencefálica e são quantificadas por meio de ressonância magnética, sendo caracterizadas pela hiperintensidade destas regiões (57).

Apesar de não dispormos de ressonância magnética para animais de pequeno porte, foi possível observar que o metabolismo de glicose também é modulado tanto na reversão do remodelamento cardíaco como nos quadros de hipertensão cardíaca e cerebral.

A redução da perfusão cerebral em pacientes idosos hipertensos atinge tanto a substância branca como a cinzenta, gerando síndrome hemisférica e lesões bilaterais na região cortical, também chamados de infartos lacunares (96).

Curiosamente, para a maior parte das regiões cerebrais estudadas foi observada a redução da incorporação de glicose para o grupo REM após dez semanas em comparação ao grupo controle no mesmo período. Trabalhos prévios demonstraram que a hipertensão cerebrovascular causa enrijecimento e hipertrofia das arteríolas em pacientes hipertensos e em modelos experimentais, ocorrendo, portanto, adaptação ao fluxo hipertensivo para garantir a perfusão ideal (97), ao passo que, ao se retirar a estenose em cinco semanas e reestabelecer a pressão normal para o cérebro, ocorre hiperventilação (hipocapnia) e acidose. Como contrarregulação deste sistema ocorreria ativação do sistema de autorregulação vascular por meio de vasoconstrição - este fato poderia explicar a redução na

incorporação de glicose no grupo REM para diferentes regiões cerebrais (98, 99). De qualquer maneira, um deslocamento da curva de autorregulação de volta ao normal seria esperado após cinco semanas de reestabelecimento do fluxo cerebral normal. Todavia, avaliações da função cognitiva e estrutural para o cérebro deverão ser mais bem exploradas no futuro para o presente modelo.

Embora poucos estudos tenham explorado as repercussões cerebrovasculares no modelo proposto, alterações do metabolismo cerebral por sete dias de estenose definitiva por fio de nylon foram relacionadas com a redução da expressão de receptores GLUT 1 para as regiões de hipocampo e córtex, aumento do extravasamento de albumina através da barreira hematoencefálica e deposição de placas β -amilóide (72).

Ademais, Carnavale e colaboradores (2012), também demonstraram, por meio do modelo de TAC definitiva por seis dias, que as alterações não apenas aumentaram a deposição de placa β -amilóide para o córtex e hipocampo, mas afetaram a memória espacial e cognitiva, além de também demonstrarem o extravasamento de albumina através da barreira hematoencefálica (48).

Desta forma, mecanismos de identificação destes danos cerebrais e cardíacos menos invasivos que marquem estes achados são de extrema importância e, neste sentido, alterações metabólicas sistêmicas nos permitem o reconhecimento de alvos ainda não descritos pela literatura e identificados no sangue. Embora nossos achados precisem ser validados em situações patológicas reais em pacientes hipertensos e/ou com estenose aórtica severa, o modelo de TAC aqui proposto cumpre uma estratégia exploratória e demonstra indiretamente que o tratamento da hipertensão precocemente consegue reverter os danos cardíacos e cerebrais parcialmente.

Os dados em conjunto para o presente trabalho apontam a possível transição entre a hipertrofia cardíaca compensada para a descompensada com preservação da função sistólica. Além disso, com alterações metabólicas cerebrais importantes, ressaltando-se que nenhum trabalho da literatura explorou a reversão da hipertensão no contexto cerebral e estes achados abrem caminho para novos objetivos com relação ao impacto reverso do tratamento da hipertensão cerebral. Este modelo permitirá validações futuras em pacientes hipertensos, assim como modelos celulares que possam elucidar melhor os mecanismos aqui envolvidos (100).

6. Bibliografia

1. Butler D. UN targets top killers. *Nature*. 2011;477(7364):260-1.
2. Chang AY, Skirbekk VF, Tyrovolas S, Kassebaum NJ, Dieleman JL. Measuring population ageing: an analysis of the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Public Health*. 2019;4(3):e159-e67.
3. Mensah GA, Roth GA, Fuster V. The Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors: 2020 and Beyond. *J Am Coll Cardiol*. 2019;74(20):2529-32.
4. Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, Addolorato G, Ammirati E, Baddour LM, et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. *J Am Coll Cardiol*. 2020;76(25):2982-3021.
5. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, et al. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2014;129(3):e28-e292.
6. Schmidt MI, Duncan BB, Azevedo e Silva G, Menezes AM, Monteiro CA, Barreto SM, et al. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. *Lancet*. 2011;377(9781):1949-61.
7. Hajar R. Risk Factors for Coronary Artery Disease: Historical Perspectives. *Heart Views*. 2017;18(3):109-14.
8. Barretto ACPR, J. A. F. Insuficiência Cardíaca. *Arq Bras Cardiol*. 1998;71(4).
9. 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 supra-aortic stenosis. *Arq Bras Cardiol*. 2007;88(2):225-33.
10. Thulani UB, Mettananda KCD, Warnakulasuriya DTD, Peiris TSG, Kasturiratne K, Ranawaka UK, et al. Validation of the World Health Organization/ International Society of Hypertension (WHO/ISH) cardiovascular risk predictions in Sri Lankans based on findings from a prospective cohort study. *PLoS One*. 2021;16(6):e0252267.
11. Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2020 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2020;141(9):e139-e596.
12. Mills KT, Bundy JD, Kelly TN, Reed JE, Kearney PM, Reynolds K, et al. Global Disparities of Hypertension Prevalence and Control: A Systematic Analysis of Population-Based Studies From 90 Countries. *Circulation*. 2016;134(6):441-50.
13. Williams B, Mancia G, Spiering W, Agabiti Rosei E, Azizi M, Burnier M, et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension. *J Hypertens*. 2018;36(10):1953-2041.
14. Ku E, Lee BJ, Wei J, Weir MR. Hypertension in CKD: Core Curriculum 2019. *Am J Kidney Dis*. 2019;74(1):120-31.
15. Tomasek R, Horky K, Ort J, Lachmanova J, Strakova M, Benes R. [Chronic renal failure and arterial hypertension with "favourable" and "unfavourable" response to haemodialysis--haemodynamic changes in patients (author's transl)]. *Cas Lek Cesk*. 1980;119(33-34):897-902.
16. Tadic M, Cuspidi C, Bombelli M, Grassi G. Right heart remodeling induced by arterial hypertension: Could strain assessment be helpful? *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2018;20(2):400-7.
17. Danielsen R, Aspelund T, Harris TB, Gudnason V. The prevalence of aortic stenosis in the elderly in Iceland and predictions for the coming decades: the AGES-Reykjavik study. *Int J Cardiol*. 2014;176(3):916-22.

18. Yan AT, Koh M, Chan KK, Guo H, Alter DA, Austin PC, et al. Association Between Cardiovascular Risk Factors and Aortic Stenosis: The CANHEART Aortic Stenosis Study. *J Am Coll Cardiol.* 2017;69(12):1523-32.
19. Vahanian A, Beyersdorf F, Praz F, Milojevic M, Baldus S, Bauersachs J, et al. 2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *Eur Heart J.* 2021.
20. Annabi MS, Touboul E, Dahou A, Burwash IG, Bergler-Klein J, Enriquez-Sarano M, et al. Dobutamine Stress Echocardiography for Management of Low-Flow, Low-Gradient Aortic Stenosis. *J Am Coll Cardiol.* 2018;71(5):475-85.
21. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *The New England journal of medicine.* 1990;322(22):1561-6.
22. Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol.* 2003;65:45-79.
23. Gupta S, Das B, Sen S. Cardiac hypertrophy: mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal.* 2007;9(6):623-52.
24. Tham YK, Bernardo BC, Ooi JY, Weeks KL, McMullen JR. Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets. *Arch Toxicol.* 2015;89(9):1401-38.
25. Allard MF. Energy substrate metabolism in cardiac hypertrophy. *Curr Hypertens Rep.* 2004;6(6):430-5.
26. Ritchie RH, Delbridge LM. Cardiac hypertrophy, substrate utilization and metabolic remodelling: cause or effect? *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006;33(1-2):159-66.
27. Rai V, Sharma P, Agrawal S, Agrawal DK. Relevance of mouse models of cardiac fibrosis and hypertrophy in cardiac research. *Mol Cell Biochem.* 2017;424(1-2):123-45.
28. Kong P, Christia P, Frangogiannis NG. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(4):549-74.
29. McMurray JJ, Pfeffer MA. Heart failure. *Lancet.* 2005;365(9474):1877-89.
30. Woodiwiss AJ, Tsotetsi OJ, Sprott S, Lancaster EJ, Mela T, Chung ES, et al. Reduction in myocardial collagen cross-linking parallels left ventricular dilatation in rat models of systolic chamber dysfunction. *Circulation.* 2001;103(1):155-60.
31. Camelliti P, Borg TK, Kohl P. Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res.* 2005;65(1):40-51.
32. Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol.* 2007;127(3):526-37.
33. Lopez B, Querejeta R, Gonzalez A, Larman M, Diez J. Collagen cross-linking but not collagen amount associates with elevated filling pressures in hypertensive patients with stage C heart failure: potential role of lysyl oxidase. *Hypertension.* 2012;60(3):677-83.
34. Katz AM, Zile MR. New molecular mechanism in diastolic heart failure. *Circulation.* 2006;113(16):1922-5.
35. Brouwers FP, de Boer RA, van der Harst P, Voors AA, Gansevoort RT, Bakker SJ, et al. Incidence and epidemiology of new onset heart failure with preserved vs. reduced ejection fraction in a community-based cohort: 11-year follow-up of PREVEND. *European heart journal.* 2013;34(19):1424-31.
36. Vasan RS, Benjamin EJ. Diastolic heart failure--no time to relax. *The New England journal of medicine.* 2001;344(1):56-9.
37. Paulus WJ, Tschope C, Sanderson JE, Rusconi C, Flachskampf FA, Rademakers FE, et al. How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology. *European heart journal.* 2007;28(20):2539-50.
38. Wu CK, Su MY, Lee JK, Chiang FT, Hwang JJ, Lin JL, et al. Galectin-3 level and the severity of cardiac diastolic dysfunction using cellular and animal models and clinical indices. *Sci Rep.* 2015;5:17007.

39. Iadecola C, Yaffe K, Biller J, Bratzke LC, Faraci FM, Gorelick PB, et al. Impact of Hypertension on Cognitive Function: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Hypertension*. 2016;68(6):e67-e94.
40. Elias MF, Elias PK, Sullivan LM, Wolf PA, D'Agostino RB. Lower cognitive function in the presence of obesity and hypertension: the Framingham heart study. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2003;27(2):260-8.
41. Kivipelto M, Helkala EL, Hanninen T, Laakso MP, Hallikainen M, Alhainen K, et al. Midlife vascular risk factors and late-life mild cognitive impairment: A population-based study. *Neurology*. 2001;56(12):1683-9.
42. Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP. The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimers Dement*. 2013;9(1):63-75 e2.
43. Dementia: A NICE-SCIE Guideline on Supporting People With Dementia and Their Carers in Health and Social Care. National Institute for Health and Clinical Excellence: Guidance. Leicester (UK)2007.
44. Gasecki D, Kwarciany M, Nyka W, Narkiewicz K. Hypertension, brain damage and cognitive decline. *Current hypertension reports*. 2013;15(6):547-58.
45. Raz N, Yang Y, Dahle CL, Land S. Volume of white matter hyperintensities in healthy adults: contribution of age, vascular risk factors, and inflammation-related genetic variants. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1822(3):361-9.
46. Laurent S, Boutouyrie P. The structural factor of hypertension: large and small artery alterations. *Circ Res*. 2015;116(6):1007-21.
47. Toledo JB, Arnold SE, Raible K, Brettschneider J, Xie SX, Grossman M, et al. Contribution of cerebrovascular disease in autopsy confirmed neurodegenerative disease cases in the National Alzheimer's Coordinating Centre. *Brain : a journal of neurology*. 2013;136(Pt 9):2697-706.
48. Carnevale D, Mascio G, D'Andrea I, Fardella V, Bell RD, Branchi I, et al. Hypertension induces brain beta-amyloid accumulation, cognitive impairment, and memory deterioration through activation of receptor for advanced glycation end products in brain vasculature. *Hypertension*. 2012;60(1):188-97.
49. Shih YH, Wu SY, Yu M, Huang SH, Lee CW, Jiang MJ, et al. Hypertension Accelerates Alzheimer's Disease-Related Pathologies in Pigs and 3xTg Mice. *Front Aging Neurosci*. 2018;10:73.
50. Ligthart SA, Moll van Charante EP, Van Gool WA, Richard E. Treatment of cardiovascular risk factors to prevent cognitive decline and dementia: a systematic review. *Vasc Health Risk Manag*. 2010;6:775-85.
51. Jia T, Wang C, Han Z, Wang X, Ding M, Wang Q. Experimental Rodent Models of Cardiovascular Diseases. *Front Cardiovasc Med*. 2020;7:588075.
52. Watkins SJ, Borthwick GM, Oakenfull R, Robson A, Arthur HM. Angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy in vitro is TAK1-dependent and Smad2/3-independent. *Hypertens Res*. 2012;35(4):393-8.
53. Rockman HA, Ross RS, Harris AN, Knowlton KU, Steinhilber ME, Field LJ, et al. Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(18):8277-81.
54. deAlmeida AC, van Oort RJ, Wehrens XH. Transverse aortic constriction in mice. *J Vis Exp*. 2010(38).
55. Yoo J, Chepurko V, Hajjar RJ, Jeong D. Conventional Method of Transverse Aortic Constriction in Mice. *Methods Mol Biol*. 2018;1816:183-93.
56. Hainsworth AH, Allan SM, Boltze J, Cunningham C, Farris C, Head E, et al. Translational models for vascular cognitive impairment: a review including larger species. *BMC Med*. 2017;15(1):16.
57. Bink DI, Ritz K, Aronica E, van der Weerd L, Daemen MJ. Mouse models to study the effect of cardiovascular risk factors on brain structure and cognition. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013;33(11):1666-84.

58. van Veldhuisen DJ, Linssen GC, Jaarsma T, van Gilst WH, Hoes AW, Tijssen JG, et al. B-type natriuretic peptide and prognosis in heart failure patients with preserved and reduced ejection fraction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;61(14):1498-506.
59. Zhang X, Javan H, Li L, Szucsik A, Zhang R, Deng Y, et al. A modified murine model for the study of reverse cardiac remodelling. *Exp Clin Cardiol*. 2013;18(2):e115-7.
60. Fish RE, Brown, M. J., Danneman, P. J., Karas, A. Z.. *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals*. Edition t, editor. Academic Press1997.
61. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*. 2006;27(2-3):95-125.
62. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
63. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr*. 2005;18(12):1440-63.
64. Gao S, Ho D, Vatner DE, Vatner SF. Echocardiography in Mice. *Curr Protoc Mouse Biol*. 2011;1:71-83.
65. Devereux RB, Alonso DR, Lutas EM, Gottlieb GJ, Campo E, Sachs I, et al. Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: comparison to necropsy findings. *The American journal of cardiology*. 1986;57(6):450-8.
66. Mercier JC, DiSessa TG, Jarmakani JM, Nakanishi T, Hiraishi S, Isabel-Jones J, et al. Two-dimensional echocardiographic assessment of left ventricular volumes and ejection fraction in children. *Circulation*. 1982;65(5):962-9.
67. Fueger BJ, Czernin J, Hildebrandt I, Tran C, Halpern BS, Stout D, et al. Impact of animal handling on the results of 18F-FDG PET studies in mice. *J Nucl Med*. 2006;47(6):999-1006.
68. Zhao M, Chow A, Powers J, Fajardo G, Bernstein D. Microarray analysis of gene expression after transverse aortic constriction in mice. *Physiological genomics*. 2004;19(1):93-105.
69. Choi DJ, Koch WJ, Hunter JJ, Rockman HA. Mechanism of beta-adrenergic receptor desensitization in cardiac hypertrophy is increased beta-adrenergic receptor kinase. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(27):17223-9.
70. Qu J, Volpicelli FM, Garcia LI, Sandeep N, Zhang J, Marquez-Rosado L, et al. Gap junction remodeling and spironolactone-dependent reverse remodeling in the hypertrophied heart. *Circ Res*. 2009;104(3):365-71.
71. Li YH, Reddy AK, Taffet GE, Michael LH, Entman ML, Hartley CJ. Doppler evaluation of peripheral vascular adaptations to transverse aortic banding in mice. *Ultrasound in medicine & biology*. 2003;29(9):1281-9.
72. Poulet R, Gentile MT, Vecchione C, Distaso M, Aretini A, Fratta L, et al. Acute hypertension induces oxidative stress in brain tissues. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2006;26(2):253-62.
73. Wang Y, Wu Y, Chen J, Zhao S, Li H. Pirfenidone attenuates cardiac fibrosis in a mouse model of TAC-induced left ventricular remodeling by suppressing NLRP3 inflammasome formation. *Cardiology*. 2013;126(1):1-11.
74. Jaiswal A, Nguyen VQ, Carry BJ, le Jemtel TH. Pharmacologic and Endovascular Reversal of Left Ventricular Remodeling. *Journal of cardiac failure*. 2016;22(10):829-39.
75. Schmierer RE, Martus P, Klingbeil A. Reversal of left ventricular hypertrophy in essential hypertension. A meta-analysis of randomized double-blind studies. *Jama*. 1996;275(19):1507-13.
76. Schmierer RE, Schlaich MP, Klingbeil AU, Martus P. Update on reversal of left ventricular hypertrophy in essential hypertension (a meta-analysis of all randomized double-

- blind studies until December 1996). *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 1998;13(3):564-9.
77. Czibik G, Steeples V, Yavari A, Ashrafian H. Citric acid cycle intermediates in cardioprotection. *Circ Cardiovasc Genet*. 2014;7(5):711-9.
 78. Martinez-Reyes I, Chandel NS. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat Commun*. 2020;11(1):102.
 79. Karimi M, Petkova V, Asara JM, Griffin MJ, Sellke FW, Bishop AR, et al. Metabolomics and the pig model reveal aberrant cardiac energy metabolism in metabolic syndrome. *Sci Rep*. 2020;10(1):3483.
 80. Paraiso HC, Kuo PC, Curfman ET, Moon HJ, Sweazey RD, Yen JH, et al. Dimethyl fumarate attenuates reactive microglia and long-term memory deficits following systemic immune challenge. *J Neuroinflammation*. 2018;15(1):100.
 81. Ding S, Yang Y, Mei J. Protective Effects of L-Malate against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2016;2016:3803657.
 82. Yang DK, Choi BY, Lee YH, Kim YG, Cho MC, Hong SE, et al. Gene profiling during regression of pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Physiological genomics*. 2007;30(1):1-7.
 83. Andersen NM, Stansfield WE, Tang RH, Rojas M, Patterson C, Selzman CH. Recovery from decompensated heart failure is associated with a distinct, phase-dependent gene expression profile. *The Journal of surgical research*. 2012;178(1):72-80.
 84. Gao XM, Kiriazis H, Moore XL, Feng XH, Sheppard K, Dart A, et al. Regression of pressure overload-induced left ventricular hypertrophy in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(6):H2702-7.
 85. Su MY, Lin LY, Tseng YH, Chang CC, Wu CK, Lin JL, et al. CMR-verified diffuse myocardial fibrosis is associated with diastolic dysfunction in HFpEF. *JACC Cardiovascular imaging*. 2014;7(10):991-7.
 86. Jeong EM, Dudley SC, Jr. Diastolic dysfunction. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 2015;79(3):470-7.
 87. Nakamura A, Rokosh DG, Paccanaro M, Yee RR, Simpson PC, Grossman W, et al. LV systolic performance improves with development of hypertrophy after transverse aortic constriction in mice. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2001;281(3):H1104-12.
 88. Guyton AC. The relationship of cardiac output and arterial pressure control. *Circulation*. 1981;64(6):1079-88.
 89. Goetze JP, Bruneau BG, Ramos HR, Ogawa T, de Bold MK, de Bold AJ. Cardiac natriuretic peptides. *Nat Rev Cardiol*. 2020;17(11):698-717.
 90. de Boer RA, Daniels LB, Maisel AS, Januzzi JL, Jr. State of the Art: Newer biomarkers in heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2015;17(6):559-69.
 91. Misono KS, Philo JS, Arakawa T, Ogata CM, Qiu Y, Ogawa H, et al. Structure, signaling mechanism and regulation of the natriuretic peptide receptor guanylate cyclase. *FEBS J*. 2011;278(11):1818-29.
 92. Zile MR, O'Meara E, Claggett B, Prescott MF, Solomon SD, Swedberg K, et al. Effects of Sacubitril/Valsartan on Biomarkers of Extracellular Matrix Regulation in Patients With HFpEF. *J Am Coll Cardiol*. 2019;73(7):795-806.
 93. Du W, Piek A, Schouten EM, van de Kolk CWA, Mueller C, Mebazaa A, et al. Plasma levels of heart failure biomarkers are primarily a reflection of extracardiac production. *Theranostics*. 2018;8(15):4155-69.
 94. Hansson J, Lind L, Hulthe J, Sundstrom J. Relations of serum MMP-9 and TIMP-1 levels to left ventricular measures and cardiovascular risk factors: a population-based study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2009;16(3):297-303.
 95. Restrepo C, Patel SK, Rethnam V, Werden E, Ramchand J, Churilov L, et al. Left ventricular hypertrophy and cognitive function: a systematic review. *Journal of human hypertension*. 2018;32(3):171-9.

96. Chui H. Vascular dementia, a new beginning: shifting focus from clinical phenotype to ischemic brain injury. *Neurologic clinics*. 2000;18(4):951-78.
97. Folkow B, Gurevich M, Hallback M, Lundgren Y, Weiss L. The hemodynamic consequences of regional hypotension in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Acta physiologica Scandinavica*. 1971;83(4):532-41.
98. Harper AM. Physiology of Cerebral Bloodflow. *British journal of anaesthesia*. 1965;37:225-35.
99. Harper AM, Glass HI. Effect of alterations in the arterial carbon dioxide tension on the blood flow through the cerebral cortex at normal and low arterial blood pressures. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1965;28(5):449-52.
100. Topkara VK, Chambers KT, Yang KC, Tzeng HP, Evans S, Weinheimer C, et al. Functional significance of the discordance between transcriptional profile and left ventricular structure/function during reverse remodeling. *JCI insight*. 2016;1(4):e86038.