

**Alterações Ponderais, Hemodinâmicas e da Função Vascular
do Leito Arterial Caudal em Ratas Sete Dias Após o Infarto do
Miocárdio**

Thaís de Oliveira Faria

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

(Fisiologia Cardiovascular)

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, Dezembro de 2009

Faria, Thaís de Oliveira, 1986

Alterações Ponderais, Hemodinâmicas e da Função Vascular do Leito Arterial Caudal em Ratas Sete Dias Após o Infarto do Miocárdio. [Vitória] 2009

106 p., 29,7cm (UFES, M. Sc., Ciências Fisiológicas, 2009)

Dissertação, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF.

Orientação: Prof. Dra. Ivanita Stefanon, UFES

1. Infarto do Miocárdio 2. Insuficiência Cardíaca 3. Reatividade vascular 4.

Ratas

**Alterações Ponderais, Hemodinâmicas e da Função Vascular
do Leito Arterial Caudal em Ratas Sete Dias Após o Infarto do
Miocárdio**

Thaís de Oliveira Faria

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas- Fisiologia Cardiovascular.

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Prof. Dr. Ivanita Stefanon - Orientadora, UFES

Dr. Raquel Binda Pereira

Prof. Dr. Dalton Valentin Vassallo- UFES

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira - UFES

Coordenador do PPGCF: Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, Dezembro de 2009

Este trabalho é dedicado ao meu
pai Racine e a minha mãe Neli.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter concedido a vida e os alicerces que a sustentam, minha família. Pai e Mãe, obrigada por deixar o caminho certo a ser seguido mais tranquilo e prazeroso com a espontaneidade nos sorrisos e abraços amorosos sempre concedidos. Irmão e Cunhada, agradeço pelo carinho pela força oferecida e por compreenderem tão bem minha ausência. Família, amo todos vocês!

Empurrões são necessários na reta final, mas uma pessoa muito especial soube caminhar ao meu lado. Obrigada Marcelo, pelas longas discussões sobre os resultados deste trabalho, idéias maravilhosas e amor sem igual.

À Prof. Dra. Ivanita Stefanon, querida Chefa, obrigada pela orientação concedida desde a minha graduação com ensinamentos preciosos e infalíveis, que foram imprescindíveis para a realização deste sonho.

Ao Prof. Dr. Danton Valentin Vassallo, Chefe, obrigada pelo carinho, pela alegria contagiante, pelos ensinamentos e dicas valiosas. Agradeço por ter aceitado o convite para participar da banca examinadora.

A Dr. Raquel Binda Pereira, pelo auxílio na realização deste trabalho, além de ter dado o ponta pé inicial, valeu Chefita!

Ao Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira, por aceitar fazer parte da banca examinadora.

À Prof. Dra. Juliana e a Maylla pelo tempo concedido para a realização das hemodinâmicas, muito obrigada meninas.

Agradeço à Jhuli Keli pelas longas horas de experimentos e experiências compartilhadas. Obrigada amiga por deixar a vida de pesquisadora/ professora mais feliz!

Aos amigos do LEMC, desde os tempos da iniciação científica até os dias de hoje, muito obrigada. Não tem como ficar parada com vocês por perto!

Aos funcionários, professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da UFES, pelo acolhimento e conhecimentos divididos.

“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

RESUMO

A área do infarto (AI) é um importante determinante para o desenvolvimento da insuficiência cardíaca (IC). Entretanto, estudos do nosso laboratório vêm mostrando que nem sempre a IC se correlaciona com a AI. O objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento da IC sete dias após o infarto do miocárdio (IM), e suas repercussões sobre a reatividade vascular no leito caudal de ratas. Ratas Wistar foram divididas em grupo controle (CT); cirurgia fictícia (SHAM); e o grupo submetido ao infarto do miocárdio (INF). Posteriormente, o grupo INF foi subdividido entre animais que desenvolveram (INF-IC) ou não (INF) IC. Após sete dias, os animais foram anestesiados e cateterizados para avaliações da pressão arterial e função ventricular esquerda. Em seguida, o leito arterial caudal foi removido e perfundido sob fluxo constante de 2,5 mL/min. Alterações na pressão de perfusão média (PPM) foram obtidas após doses crescentes de fenilefrina (FE 0,0001-300µg), antes e depois da lesão endotelial induzida pelo CHAPS. Para avaliação da liberação basal de óxido nítrico (NO) foi utilizado L-NAME na presença de FE. Concentrações crescentes de acetilcolina (ACh) e nitroprussiato de sódio (NPS), foram perfundidas após pré-contracção com KCl (65mM) para avaliação do relaxamento dependente e independente do endotélio vascular, respectivamente. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média, e a significância estatística fixada em $P < 0,05$. Sete dias após o início do experimento, os animais do grupo INF-IC apresentaram redução do peso corporal (PC) (CT: $14,5 \pm 2,73$; SHAM: $8,14 \pm 2,24$; INF: $-4,06 \pm 2,65$; INF-IC: $-23,3 \pm 4,96$ g; $P < 0,05$), aumento da razão pulmão/PC (CT: $5,5 \pm 0,64$; SHAM: $5,5 \pm 0,22$; INF: $8,44 \pm 0,62$; INF-IC: $9,90 \pm 0,91$ mg/g; $P < 0,05$) e do ventrículo direito/PC (CT: $0,45 \pm 0,03$; SHAM: $0,57 \pm 0,06$; INF: $0,68 \pm 0,04$; INF-IC: $0,78 \pm 0,06$ mg/g; $P < 0,05$) comparado aos demais grupos. Além disso, aumento na pressão diastólica final do ventrículo esquerdo foi evidenciado no grupo INF-IC em relação aos demais grupos (CT: $1,72 \pm 0,8$; SHAM: $1,6 \pm 0,5$; INF: $4,48 \pm 0,5$; INF-IC: $14,5 \pm 1,3$ mmHg; $P < 0,05$). A AI não diferiu entre os grupos (INF: $35,8 \pm 1,2$; INF-IC: $38,8 \pm 2,3$ %; $P > 0,05$). A variação do PC durante os sete dias correlacionou-se com a PDFVE ($r = -0,592$; $P < 0,05$). No leito arterial caudal o grupo INF-IC apresentou redução da resposta máxima ($R_{\text{máx}}$) à FE

(330,4±13,4 mmHg) quando comparado aos demais grupos (CT: 423,2±25,4; SHAM: 403,6±28; IM: 425,5±30,4; P<0,05). A liberação basal de NO obtida pelo grupo INF-IC (13,35 ± 2,31) foi significativamente maior quando comparado aos demais grupos (CT 7,40 ± 1,36; SHAM 7,23 ± 0,8; INF 3,77 ± 0,7; P< 0,05). O relaxamento a ACh mostrou-se prejudicado nos grupos SHAM e IM (SHAM: 50,0±2,8; INF: 48,4±2,7 %), quando comparados ao grupo CT e INF-IC (CT: 69,1±4,0; INF-IC: 66,9±3,4%; P<0.05). Conclui-se que aos sete dias após o IM já é possível identificar animais que, com a mesma área de lesão, desenvolvem ou não IC precocemente. Além disso, esses animais apresentam diferentes respostas vasculares devido, em parte, a maior biodisponibilidade endotelial de NO.

ABSTRACT

Infarct area (AI) is an important determinant to heart failure (IC) development. However, studies from our laboratory have been shown that IC nor always correlates with AI. The aim of this study was to evaluate the IC development at 7 days after myocardial infarction (IM), and its consequence on vascular reactivity in the rat tail bed. Female Wistar rats were divided in Control group (CT); fictitious surgery (SHAM); and a group that was submitted to myocardial infarction (INF). Later, the INF group was subdivided in those developed (INF-IC) or not (INF) IC. Seven days later, animals were anesthetized and catheterized to assess blood pressure and left ventricular function. After that, the vascular tail bed was removed and perfused under constant flow (2.5 mL/min). Alterations in the mean perfusion pressure (PPM) were acquire after concentration-response curve to phenilephrine (FE, 0.0001-300 μ g), before and after CHAPS-induced endothelial damage. To evaluate basal nitric oxide (NO) release, L-NAME was used in the presence of FE. To evaluate the dependent or independent relaxation, crescent concentration of acetilcholine (ACh) and sodium nitroprusside (NPS) were perfused after contraction with KCl (65mM). Data are shown as mean \pm the standard error of mean, and statistical significance set at $P < 0.05$. Seven days after, animals from INF-IC group showed decreased body weight (PC) (CT: 14.5 \pm 2.73; SHAM: 8.14 \pm 2.24; INF: -4.06 \pm 2.65; INF-IC: -23.3 \pm 4.96g; $P < 0.05$), increased lung/PC ratio (CT: 5.5 \pm 0.64; SHAM: 5.5 \pm 0.22; INF: 8.44 \pm 0.62; INF-IC: 9.90 \pm 0.91mg/g; $P < 0.05$) and right ventricle/PC ratio (CT: 0.45 \pm 0.03; SHAM: 0.57 \pm 0.06; INF: 0.68 \pm 0.04; INF-IC: 0.78 \pm 0.06mg/g; $P < 0.05$) when compared to other groups. Moreover, increased values for left ventricular end-diastolic pressure (PDFVE) were evidenced in INF-IC group as compared to the others (CT: 1.72 \pm 0.8; SHAM: 1.6 \pm 0.5; INF: 4.48 \pm 0.5; INF-IC: 14.5 \pm 1.3mmHg; $P < 0.05$). AI was similar between infarcted groups (INF: 35.8 \pm 1.2; INF-IC: 38.8 \pm 2.3%; $P > 0.05$). Furthermore, variation in the PC during the seven days correlates with PDFVE ($r = -0.592$; $P < 0.05$).

In the vascular tail bed, INF-IC group showed reduced maximal response ($R_{\text{máx}}$) to FE (330.4 ± 13.4 mmHg) as compared to other groups (CT: 423.2 ± 25.4 ; SHAM: 403.6 ± 28 ; IM: 425.5 ± 30.4 ; $P < 0.05$). Basal NO release acquire in the INF-IC group (13.35 ± 2.31) was significantly better as compared to other groups (CT 7.40 ± 1.36 ; SHAM 7.23 ± 0.8 ; INF 3.77 ± 0.7 ; $P < 0.05$). The relaxation mediated by Ach was reduced in SHAM and INF groups (SHAM: 50.0 ± 2.8 ; INF: 48.4 ± 2.7 %) as compared to CT and INF-IC groups (CT: 69.1 ± 4.0 ; INF-IC: 66.9 ± 3.4 %; $P < 0.05$).

We conclude that seven days after IM is possible to identify animals that, with the same AI, develop or not the IC. Moreover, these animals depict different patterns of vascular response due, at least in part, to a better endothelial NO bioavailability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Análise de correlação de Pearson entre parâmetros ponderais e a AI (A, C, E e G) ou a PDFVE (B, D, F, H). r: coeficiente de correlação de Pearson; n: 33-45.

Figura 2. Análise de correlação linear entre a PDFVE e a AI. O coeficiente de correlação de Pearson foi $r = 0,389$ ($P = 0,013$), e o coeficiente de determinação foi $r^2 = 0,151$. A linha contínua indica a reta de regressão, e as linhas descontínuas indicam os limites inferior e superior do intervalo de confiança 95%. (n=40).

Figura 3. Gráfico de dispersão da PDFVE no grupo INF. A linha contínua representa a média e as linhas descontínuas delimitam o intervalo de confiança de 95% (4,4 – 9,2).

Figura 4. Curva ROC expressando os resultados de sensibilidade e especificidade em função do ponto de corte escolhido para determinação da IC em ratas sete dias após o IM.

Figura 5. Curva dose - resposta à FE em leito arterial caudal de ratas sete dias após o início dos experimentos. Δ PPM em relação a doses crescentes de FE nos grupos CT (n= 9), SHAM (n= 9), INF (n=10) e INF-IC (n=10). * $P < 0,05$ vs CONT; # $P < 0,05$ vs SHAM; † $P < 0,05$ vs INF.

Figura 6. Curvas dose - resposta à FE antes e após remoção endotelial em leito arterial caudal de ratas sete dias após o início dos experimentos. Δ PPM à doses crescentes de FE em ratos CT (A, n= 9), SHAM (B, n= 6), INF (C, n=8) e INF-IC (D, n=7) nas condições com endotélio (E+) e após 40 min a remoção endotelial (E-), induzida por CHAPS. Figura E indica a diferença percentual das áreas abaixo das curvas nos grupos CT (n=9), SHAM (n=6), INF (n=8) e INF-IC (n=7). * $P < 0,05$ vs CONT; # $P < 0,05$ vs SHAM; † $P < 0,05$ vs INF.

Figura 7. Liberação basal de NO em leito arterial caudal de ratas sete dias após o início dos experimentos nos grupos CT (n= 5), SHAM (n= 6), INF (n=8) e INF-IC (n=6). * $P < 0,05$ vs CONT; # $P < 0,05$ vs SHAM; † $P < 0,05$ vs INF.

Figura 8. Curva concentração - resposta a ACh em leito arterial caudal de ratas sete dias após o início dos experimentos. Δ PPM à concentrações crescentes de ACh nos grupos CT (n= 6), SHAM (n= 6), INF (n=5) e INF-IC (n=5). * $P < 0,05$ vs CONT; # $P < 0,05$ vs SHAM; † $P < 0,05$ vs INF.

Figura 9. Curva concentração - resposta ao NPS em leito arterial caudal de ratas sete dias após o início dos experimentos. Δ PPM à concentrações crescentes de NPS nos grupos CT (n= 6), SHAM (n= 6), INF (n=5) e INF-IC (n=5), sete dias após o início dos experimentos.

Figura 10. Análise de correlação de Pearson entre a PDFVE (A) e a AI (B) com a $R_{\text{máx}}$ à FE. A linha vertical tracejada indica a divisão em animais que desenvolveram ou não a IC.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros ponderais mensurados sete dias após o início dos experimentos.

Tabela 2. Parâmetros hemodinâmicos mensurados sete dias após o início dos experimentos.

Tabela 3. Parâmetros ponderais mensurados com a redistribuição do grupo INF sete dias após o início dos experimentos.

Tabela 4. Parâmetros hemodinâmicos após divisão do grupo INF.

Tabela 5. $R_{\text{máx}}$ e $-\text{Log EC}_{50}$ obtidos de curvas dose-resposta à FE em leito arterial caudal de ratas sete dias após o início dos experimentos.

Tabela 6. $R_{\text{máx}}$ e $-\text{Log EC}_{50}$ obtidos de curvas concentração-resposta a ACh em leito arterial caudal de ratas sete dias após o início dos experimentos.

Tabela 7. $R_{\text{máx}}$ e $-\text{Log EC}_{50}$ obtidos de curvas concentração-resposta ao NPS em leito arterial caudal de ratas sete dias após o início dos experimentos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO	16
1.2. REMODELAMENTO VENTRICULAR APÓS O INFARTO DO MIOCÁRDIO EXPERIMENTAL	19
1.3. ALTERAÇÕES VASCULARES APÓS O INFARTO DO MIOCÁRDIO	27
1.3.1. Fator Relaxante Derivado do Endotélio Vascular: Óxido Nítrico	27
1.3.2. Fatores que Interferem na Biodisponibilidade do Óxido Nítrico	29
1.4. A TRANSIÇÃO PARA A INSUFICIÊNCIA CARDÍACA	32
2. OBJETIVOS	35
2.1. OBJETIVO GERAL	35
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	36
3.1.1. Grupos Experimentais	37
3.1.2. Técnica para Produção do Infarto do Miocárdio	37
3.2. PARÂMETROS HEMODINÂMICOS	38
3.3. PERFUSÃO DO LEITO VASCULAR CAUDAL	39
3.3.1. Protocolos Experimentais	41

3.3.1.1. Reatividade Vascular à Fenilefrina	41
3.3.1.2. Vasodilatação Dependente do Endotélio	43
3.3.1.3. Vasodilatação Independente do Endotélio	43
3.4. DETERMINAÇÃO DA HIPERTROFIA CARDÍACA E DA EXTENSÃO DO INFARTO	43
3.5. DETERMINAÇÃO DA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA	44
3.6. EXPRESSÃO DOS DADOS	45
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
3.8. REAGENTES E FÁRMACOS	46
4. RESULTADOS	48
4.1. PARÂMETROS PONDERAIS E EXTENSÃO DO INFARTO	48
4.1.1. Análise Global dos Grupos	48
4.1.2. Análise com Subdivisão do Grupo Infartado	54
4.2. REATIVIDADE VASCULAR DO LEITO VASCULAR CAUDAL	59
4.2.1. Resposta Vasoconstrictora à Fenilefrina	59
4.2.2. Resposta Vasodilatadora Dependente do Endotélio Vascular	64
4.2.3. Resposta Vasodilatadora Independente do Endotélio Vascular	66
5. DISCUSSÃO	69
5.1. ASPECTOS GERAIS	69

5.2. CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO MODELO UTILIZADO	71
5.3. AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO VASCULAR NO LEITO ARTERIAL CAUDAL	76
6. CONCLUSÕES	81
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO

As doenças cardiovasculares, desde a década de vinte, figuram como a principal causa de morte e incapacidade funcional no Brasil e no mundo. Atualmente, os índices atingem valores próximos de 33% dos óbitos registrados, superando os encontrados para doenças neoplásicas (16,47%), doenças do sistema respiratório (10,87%) e as doenças infecciosas e parasitárias (4,92%) (DATASUS, 2007). Dentre as doenças que afetam o sistema cardiovascular, a doença arterial coronariana, que tem no infarto do miocárdio (IM) o seu principal efetor, é responsável por aproximadamente metade dos óbitos (American Heart Association, 2009). Nos Estados Unidos, por exemplo, aproximadamente 865 mil IM são registrados anualmente (Rosamond et al., 2007). Com isto, a previsão de custos diretos e indiretos para 2009 com IM nos Estados Unidos estão na ordem de 165,4 bilhões de dólares (American Heart Association, 2009). No Reino Unido, a incidência de IM é de aproximadamente 2 casos para cada 1000 indivíduos (Cleland et al., 2005). Segundo dados do DATASUS, no ano de 2006 no Brasil foram notificados aproximadamente 90 mil óbitos tendo como causa a doença isquêmica do coração (DATASUS, 2007).

Apesar dos números explicitarem uma trágica realidade, e de campanhas evidenciarem a importância dos cuidados primários com a saúde, a incidência do IM não reduz da forma como seria desejada. Dentre os diversos fatores de risco associados ao desenvolvimento do IM, encontram-se a hipertensão arterial, as dislipidemias, a obesidade abdominal, o diabetes, a inatividade física, o hábito de fumar e o consumo excessivo de álcool (Lanas et al., 2007; Anand et al., 2008). Com os grandes avanços na terapêutica farmacológica e com o desenvolvimento de novas técnicas de manejo do paciente, a mortalidade por IM tem sido reduzida ao longo dos últimos anos (Kesteloot et al., 2002; Bax et al., 2003). Isto pode ser evidenciado também pela redução nas admissões e do tempo de internação hospitalar após o IM (Spencer et al., 2004).

As conseqüências de IM são catastróficas, como o desenvolvimento progressivo de uma síndrome clínica resultante de distúrbio cardíaco funcional e/ou estrutural, que caracteriza a insuficiência cardíaca (IC). Na IC, o coração se torna incapaz de ejetar ou se encher de sangue em taxas suficientes para manter o débito cardíaco adequado às demandas metabólicas teciduais (Bauersachs e Widder 2008). Aproximadamente 40% dos pacientes que sofrem um IM apresentam disfunção sistólica já nos primeiros dias após o infarto (Cleland et al., 2005). Além disto, aproximadamente 80% dos óbitos após IM foram precedidos por um evento de IC (Velazquez et al., 2004). Esses números evidenciam a intrínseca ligação temporal entre o IM, a progressão para a IC e a mortalidade.

A IC apresenta comprometimentos extra-cardíacos, como exemplo os comprometimentos da função vascular. A disfunção endotelial é um parâmetro que tem sido recentemente associada à IC. Em pacientes com IC após IM, a resposta dilatadora mediada pelo endotélio encontra-se comprometida (Katz et al., 2005; Shechter et al., 2009). Essa resposta dilatadora reduzida é mais evidente na IC causada por isquemia quando comparada àqueles que desenvolvem IC por causas não-isquêmicas (Klosinska et al., 2009).

Todas essas complicações descritas acima apresentam conseqüências econômicas. Nos estados Unidos, os gastos estimados com a IC para o ano de 2009 foram estimados em aproximadamente 37,2 bilhões de dólares (American Heart Association, 2009). No Brasil, aproximadamente 27% dos óbitos decorrentes de doenças cardiovasculares são ocasionados pela IC, que também responde por 26 % das internações geradas por causas cardiovasculares (DATASUS, 2007).

Apesar de controversos, estudos mostram que aproximadamente 24% dos pacientes admitidos com IM desenvolvem IC em 30 dias (Hellermann et al., 2005; Velagaleti et al., 2008). Além disto, por volta de 9% dos pacientes irão desenvolver IC em algum período após o IM (Spencer et al., 2002). Ao longo dos anos, vem sendo observado um aumento na incidência de IC (Najaf et al., 2009; Velagalet et al., 2008). Esse aumento paradoxal, diante da evolução terapêutica para o paciente infartado, pode ser explicado pela redução na mortalidade causada por essas estratégias.

Todos esses números explicitam a necessidade de intervenções e terapias efetivas. E para que se possa ter efetividade ao prevenir o IM e tratar suas

complicações, estudos experimentais são necessários. Com isso, podem ser entendidos os mecanismos que levam à instalação e ao desenvolvimento das disfunções cardíacas e vasculares, ajudando no desenvolvimento de novas estratégias para impedir a progressão da IC.

1.2 REMODELAMENTO VENTRICULAR APÓS O INFARTO DO MIOCÁRDIO EXPERIMENTAL

O modelo experimental mais utilizado para estudar os efeitos da IC é o da ligadura permanente da artéria coronária descendente anterior esquerda em ratos (Johns e Olson, 1954, Pfeffer et al., 1985; Mill et al., 1990). Este modelo consegue simular os principais eventos observados na cardiopatia isquêmica humana, como por exemplo, a perda celular aguda, a reação inflamatória associada, o remodelamento de matriz extracelular, assim como todas as disfunções cardíacas e vasculares observadas em humanos. Nos próximos tópicos, serão sucintamente apresentados os eventos cardíacos e vasculares que se seguem ao IM em ratos de forma temporal.

A medida que o processo de isquemia vai se estendendo no coração, tem início o processo de morte celular. Essa perda de tecido contrátil contribui de forma bastante significativa para as alterações funcionais e estruturais observadas no miocárdio. Participam disso dois tipos de eventos, a necrose e a apoptose, sendo que a apoptose tem uma participação mais significativa neste processo (Takemura e Fujiwara, 2004). De acordo com Kajstura et al. (1996), a apoptose é a forma predominante de morte celular observada no miocárdio

dentro das primeiras 24 horas após a oclusão permanente da artéria coronária em ratos, acometendo tanto áreas isquêmicas quanto não-isquêmicas (Schwartz et al., 2006).

Como conceito, apoptose é um conjunto de alterações bioquímicas, moleculares e morfológicas. Funcionalmente, alterações intracelulares levam a comprometimentos da função mitocondrial, contribuindo para um colapso energético e conseqüente degradação das funções celulares (Buja, 2005). A apoptose pode ser ativada por vários fatores como por exemplo, radicais livres, citocinas inflamatórias, além das conseqüências metabólicas da isquemia (Tquemura e Fuginara, 2004; Crow et al., 2004).

A apoptose exerce grande repercussão no curso do remodelamento ventricular após o IM (Baldi et al., 2002). Isto foi bem descrito em trabalho realizado por Palojoki et al. (2001), onde observaram alta incidência de miócitos em apoptose na área isquêmica já no primeiro dia após o IM em ratos. Além disto, na área não infartada, a apoptose aumentou progressivamente até a décima segunda semana após o IM, se correlacionando significativamente com o desenvolvimento da dilatação ventricular esquerda (Palojoki et al., 2001). Outro trabalho que evidenciou a importância da apoptose no desenvolvimento da IC mostrou uma associação bastante significativa entre a expressão do ligante Fas, uma citocina pró-inflamatória e pró-apoptótica, com a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE) em ovelhas com IC (Jiang et al., 2003).

Da mesma forma que em animais de experimentação, a apoptose em humanos contribui de forma importante para a perda celular nas primeiras horas do IM, sendo que a partir do segundo dia a necrose adquire papel fundamental (Veinot

et al., 1997). Semelhante, outros trabalhos evidenciaram altos níveis de células em apoptose em coração de pacientes com IC, podendo contribuir para a perda progressiva da função cardíaca (Narula et al., 1996; Olivetti et al., 1997).

Evoluindo temporalmente no curso do remodelamento ventricular após o IM, pode-se observar que a morte celular decorrente da injúria tecidual ativa substâncias que são responsáveis por iniciar uma resposta inflamatória, na tentativa de reparar os danos causados pela isquemia tecidual (Ertl e Frantz, 2005). Essa resposta inflamatória auxilia no processo de cicatrização tecidual ao realizar a degradação dos componentes da matriz extracelular e substituir o tecido necrosado por tecido fibroso, processo fundamental para modular a função e estrutura do coração infartado (Fishbein et al., 1978; Yang et al., 2002; Ertl e Frantz 2005; Frantz et al., 2009).

O extravasamento do conteúdo das células mortas são quimioatraentes e iniciam a migração das células inflamatórias para o miocárdio isquêmico. No infiltrado inflamatório, é possível observar precocemente a presença de neutrófilos já no primeiro dia após a oclusão, mantendo-se com valores elevados até o quarto dia. No segundo dia, níveis elevados de macrófagos e linfócitos aparecem no miocárdio lesado, permanecendo elevado além dos primeiros vinte e oito dias (Fishbein et al., 1978; Yang et al., 2002).

Um dos sinalizadores da migração de células inflamatórias são as citocinas pró-inflamatórias. Elas não são constitutivamente expressas no miocárdio, sendo que várias delas são intensamente expressas precocemente a oclusão coronariana, como por exemplo as interleucinas (IL) 1 β e 6 e fator de necrose tumoral (TNF, do inglês "*tumor necrosis factor*")- α (Ono et al., 1998; Deten et

al., 2002). Três horas após a oclusão da artéria coronária já é possível observar um pico de expressão do RNAm da IL-1 β e IL-6 na área infartada, sendo que na área não infartada, esse pico de expressão torna-se evidente após seis horas (Ono et al., 1998).

O TNF- α é capaz de modular a função cardiovascular, por induzir alterações estruturais como a hipertrofia cardíaca (Yokoyama et al., 1997), dilatação das câmaras cardíacas (Kubota et al., 1997; Bryant et al., 1998) e fibrose intersticial (Sivasubramanian et al., 2001) resultando em redução na contratilidade cardíaca (Chung et al., 1990). Ele também é responsável pela ativação das metaloproteinases de matriz (MMP, do inglês “*matrix metalloproteinase*”) (Sivasubramanian et al., 2001). Em modelos animais, a infusão de TNF- α mostrou-se capaz de induzir dilatação ventricular, culminando com disfunção cardíaca progressiva (Bozkurt et al., 1998). Berthonneche et al. (2004) observaram que o TNF- α apresenta um pico de atividade no sétimo dia após o IM em ratos, fato que coincide com a disfunção miocárdica e a dilatação ventricular encontrada nesses animais. Porém, camundongos *knockout* para receptor tipo 2 para o TNF- α apresentaram aumento de apoptose na área infartada quando comparados aos animais controles, indicando um importante papel do TNF- α na proteção miocárdica, ao participar de processos de reparo cardíaco após o IM (Moden et al., 2007). Esse aparente conflito descrito nos estudos utilizando TNF- α foi elucidado com o trabalho recente de Hamid et al. (2009), ao mostrar em modelo animal, diferença no padrão de respostas dos receptores para essa citocina. Neste estudo, diferentes modelos *knockout* para o receptor TNF-R1 ou para o receptor TNF-R2 foram avaliados após o IM,

sendo que os receptores TNF-R1 foram relacionados aos efeitos deletérios do remodelamento, como a hipertrofia cardíaca e apoptose, enquanto os efeitos observados para o receptor TNF-R2 foram inversos, evidenciando o efeito antiapoptótico (Hamid et al., 2009).

Além disso, as IL também têm sido relacionadas ao remodelamento ventricular esquerdo após o IM em ratos. Foi observada forte correlação positiva entre a expressão de IL-1 β e IL-6 e o diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (Ono et al., 1998) indicando progressão da dilatação ventricular em animais com inflamação. O uso de antagonista dos receptores para IL-1 reduziu a apoptose após o IM do miocárdio experimental (Abbate et al., 2008). De forma interessante, foi descrito por Moro et al. (2007) que a disfunção ventricular observada após o IM em ratos coincide com a expressão de citocinas inflamatórias, principalmente as IL-1 β e a IL-6.

Em humanos, diversos estudos apresentam elevados níveis plasmáticos de TNF- α em pacientes com IC quando comparados a pacientes saudáveis (Amione GT, 2005; Chen et al., 2008), evidenciando que os níveis plasmáticos de TNF- α são preditores independentes de pior prognóstico e mortalidade em pacientes com IC avançada. Da mesma forma, Tan et al. (2009) recentemente observaram que a IL-6 é preditor independente de mortalidade em pacientes após o IM. Porém, desastrosos resultados em estudos clínicos foram obtidos ao reduzir os níveis de TNF- α em pacientes com IC, já que a utilização de anti-TNF- α não melhorava a condição inicial desses pacientes (Mann 2002). Fato este que corrobora a idéia de que a resposta obtida pelo TNF- α dependerá do receptor que ele vai atuar, seja via TNF-R1 ou TNF-R2 (Hamid et al. 2009).

Esses estudos mostram que apesar dos efeitos deletérios das citocinas sobre a função cardíaca, efeitos benéficos também estão associados a elas. Isso torna claro que a inflamação é uma resposta intrínseca do organismo que deve ser minuciosamente modulada.

Com a infiltração de células inflamatórias no miocárdio isquêmico e a reação inflamatória local gerada, tem início o processo de substituição do tecido necrosado por tecido fibroso. Esses processos ocorrem separadamente, e quanto menos tempo decorrer entre os dois eventos, menor serão as consequências funcionais e estruturais (Eaton e Bulkley, 1981; Hochman e Bulkley, 1982; Weisman et al., 1988).

O interstício cardíaco é composto principalmente por colágeno, compreendendo aproximadamente 3% do miocárdio. Dentre os vários tipos de colágeno descritos, no coração os mais predominantes são os tipos I, III e V (Ertl e Frantz, 2005). Precocemente à oclusão, o colágeno é intensamente degradado. Essa degradação ocorre devido a ativação maciça de MMPs provenientes de neutrófilos infiltrados e do próprio miocárdio (Ertl e Frantz, 2005; Dobaczewski et al., 2006). A expressão dessas colagenases ocorre na fase inicial do IM em ratos. Inicialmente, é observado um aumento bastante significativo da expressão de MMP-8 e a MMP-13 (Tao et al., 2004; Nagase et al., 2006).

A homeostase da matriz extracelular é um importante mecanismo para manter a função e estrutura cardíaca. Foi descrito que a degradação progressiva do colágeno intersticial reduz progressivamente a força de músculos papilares isolados, mostrando a fundamental participação dos componentes da matriz

extracelular para o funcionamento cardíaco (Baicu et al., 2003). A inibição farmacológicas das MMPs durante a fase inicial após o IM está associada a maior sobrevivência e melhor função cardíaca (Spinale et al., 2006). Eventos contrários são observados com o tratamento crônico, que apresenta pior resultado funcional em animais infartados (Spinale et al., 2006). Além disto, com a utilização de camundongos *knockout* para a MMP-9 (Ducharme et al., 2000) ou para MMP-2 (Hayashidani et al., 2003), foi observada redução na dilatação ventricular e menor incidência de ruptura ventricular após o IM. Esses resultados corroboram estudos realizados em humanos, em que a autópsia de pacientes infartados que morreram após ruptura ventricular revelaram aumento da atividade das MMP 8 e 9 (van den Borne et al., 2009).

Em paralelo a essa intensa degradação da matriz extracelular e a reabsorção do tecido necrosado pelas células inflamatórias, inicia-se o processo reparativo com o intuito de substituir o tecido degradado. Com a presença maciça de fibroblastos já a partir do terceiro dia, a síntese e deposição de colágeno são iniciadas, progredindo além do vigésimo oitavo dia (Cleutjens et al., 1995; Sun et al., 2000; Yang et al., 2002). A produção inicial de colágeno e sua deposição começam durante o processo inflamatório, com a ativação da cascata de citocinas inflamatórias, evento que coincide com a chegada de fibroblastos. É possível observar já no terceiro dia após o IM um aumento na expressão do RNAm do colágeno tipo I e III, com conseqüente aumento da sua deposição nas áreas infartadas e não-infartadas (Cleutjens et al., 1995; Sun et al., 2000). As fibras colágenas se tornam evidentes em ambas as regiões a partir do sétimo dia (Cleutjens et al., 1995; Sun et al., 2000). Outro fator importante no

desenvolvimento da fibrose é o fator de crescimento transformante (TGF, do inglês “*transforming growth factor*”) $-\beta$, que é uma citocina pró-fibrótica com capacidade de reduzir a adesão plaquetária, ativar fibroblastos e estimular a produção de matriz extracelular (Bujak e Frangogiannis, 2007). Rosenkranz et al. (2002) mostraram que camundongos com elevada expressão do TGF-1 β apresentavam hipertrofia cardíaca acompanhada de fibrose intersticial excessiva.

Com relação direta sobre o remodelamento cardíaco, o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) é ativado após o IM, sendo observado em ratos, aumento da atividade plasmática e tecidual da enzima conversora de angiotensina, com conseqüente aumento da concentração de angiotensina II no coração (Busatto et al., 1997; de Resende et al., 2006; Xu et al., 2008). Níveis elevados de angiotensina II no coração aumentam a produção local de aldosterona (Zhao et al. 2006). Além disto, os receptores AT1 e receptores mineralocorticóides encontram-se aumentados no coração após o IM (Gurantz et al., 2005; de Resende et al., 2006). Tanto a angiotensina II quanto a aldostorena causam hipertrofia cardíaca (Liu et al., 1998; Lijnen e Petron, 1999), deposição excessiva de colágeno no coração (Silvestre et al., 1999), apoptose (Cigola et al., 1997), eventos que contribuem significativamente para o comprometimento hemodinâmico e redução da sobrevivência.

Alguns estudos demonstram que ao acelerar o processo de reparo cardíaco, ou seja, minimizar o tempo entre a degradação e a deposição de matriz, induz efeitos benéficos ao remodelamento. Por exemplo, foi observado que a administração precoce da eplerenona, um antagonista seletivo de receptores

mineralocorticóides, acelerava a infiltração de macrófagos e fibroblastos na área infartada, garantindo melhora hemodinâmica e estrutural (Fraccarolo et al., 2008).

Essas alterações temporais descritas, conduzem progressivamente à falência cardíaca, levando a uma série de adaptações no sistema cardiovascular.

1.3 ALTERAÇÕES VASCULARES APÓS O INFARTO DO MIOCÁRDIO

Na IC, o bombeamento sanguíneo ineficiente realizado pelo coração acarreta aumento na resistência vascular periférica (RVP) com conseqüente aumento da pós-carga. Esse aumento da RVP é procedente da redução na vasodilatação periférica, principalmente pela redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO, do inglês "*nitric oxide*") (Bauersachs e Widder 2008). Diversos trabalhos correlacionaram a disfunção endotelial observada nos pacientes com IC, com a baixa biodisponibilidade de NO apresentada por eles, já que o prejuízo no relaxamento vascular é uma das características da disfunção endotelial (Drexler et al., 1992; Katz et al., 1992; Katz et al., 2005).

1.3.1 Fator Relaxante Derivado do Endotélio Vascular: Óxido Nítrico

O NO, inicialmente descrito como o fator relaxante derivado do endotélio (EDRF, do inglês "*endothelial-derived relaxing factor*") (Furchgott e Zawadzki,

1980; Palmer et al., 1987), atualmente é reconhecido como um dos principais fatores derivados do endotélio vascular. Dentre suas ações, é importante na manutenção da integridade endotelial ao regular o tônus vascular, por pronunciada ação vasodilatadora, além de inibir a agregação plaquetária (Radomski et al., 1991; Freedman et al., 1999), adesão leucocitária à parede vascular (Kubes et al., 1991; Lefer et al., 1999) e a proliferação das células musculares lisas (Garg e Hassid, 1989). O NO é sintetizado nas células endoteliais quando o aminoácido L-arginina é convertido a L-citrulina e NO, ao ter seu grupamento guanidino oxidado por ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS, do inglês “nitric oxide synthase”) (Palmer et al., 1987; Moncada et al., 1991). Essa reação envolve co-fatores como, a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida – NADPH), a tetrahidrobiopterina (BH₄), a flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e a flavina adenina mononucleotídeo (FMN) (Palmer et al., 1987; Angus e Cocks, 1989; Palmer e Moncada et al., 1991; Busse et al., 1994).

Atualmente, três isoformas da NOS estão bem descritas. A NOS endotelial (eNOS) e a neuronal (nNOS) são isoformas constitutivamente expressas e dependentes da formação do complexo cálcio-calmodulina para serem ativadas. A terceira isoforma é a induzível (iNOS) sendo expressa em condições adversas, como em processos inflamatórios, sendo independente do aumento das concentrações intracelulares de cálcio (Moncada et al., 1991; Xie et al., 1992; Forstmann et al., 1993, 1994).

Uma vez sintetizado e liberado pelas células endoteliais, o NO exerce sua função vasodilatadora ao se difundir facilmente para as células do músculo liso

vascular (MLV). O relaxamento é mediado pela ativação da enzima guanilato ciclase solúvel que hidrolisa a moléculas 5'- trifosfato de guanosina (GTP) em 3'5' – monofosfato cíclico de guanosina (GMP_c). O aumento da concentração do GMP_c ativa a proteína cinase G (PKG), sendo responsável pela fosforilação de diversas proteínas, levando ao relaxamento do MLV por redução da concentração intracelular de cálcio (Ignarro e Kadowitz, 1985; Rapoport e Murod, 1993).

1.3.2 Fatores que Interferem na Biodisponibilidade do Óxido Nítrico

O NO tem importante papel no desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Alterações na biodisponibilidade de NO estão associados com disfunção no endotélio vascular, presente em pacientes com IC (Katz et al., 1992; Katz et al., 2005). Durante a instalação e o desenvolvimento dessa disfunção endotelial, vários mecanismos compensatórios são ativados na tentativa de restabelecer a homeostase tecidual. Esses mecanismos, que incluem ações neuro-humorais e próprias do endotélio, têm importante participação na disfunção endotelial observada em pacientes com IC e em modelos experimentais de disfunção vascular (Bauersachs e Widder, 2008). Porém, a constante ativação desses mecanismos pode acarretar danos ainda maiores ao tecido. Portanto, à ativação adrenérgica, ativação do SRAA, e o concomitante aumento da produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) levam a redução da biodisponibilidade de NO (Bauersachs e Widder, 2008). No trabalho realizado por Huang et al. (1995), precursor na utilização do modelo de camundongos *knockout* para eNOS, foi observado prejuízo no relaxamento dependente do

endotélio, porém sem alterações no relaxamento do músculo liso vascular (MLV) na presença do doador direto de NO, em anéis isolados de aorta. De forma interessante, ratos tratados com inibidor seletivo da iNOS durante os três primeiros dias após o IM, apresentam resposta contrátil à fenilefrina (FE) restaurada, quando comparada a hiporreatividade observada nos animais sem o tratamento (Sartório et al., 2005). Além disto, camundongos *knockout* para as três isoformas da NOS desenvolveram IM espontaneamente aos dez meses de idade (Nakata et al., 2008). Esses trabalhos sustentam a idéia de que o NO tem participação fundamental na regulação da função vascular tendo assim repercussões cardíacas.

Outro importante fator responsável pela redução da biodisponibilidade do NO é o aumento das EROs no endotélio, músculo liso e adventícia vascular (Griendling e Alexander 1997; Rey e Pagano 2002). As ERO incluem radicais livres com ânions superóxido (O_2^-), o peroxinitrito ($ONOO^-$), o radical hidroxil (OH^\cdot). A mais importante ERO na vasculatura é o ânion superóxido, o qual é formado pela redução univalente do oxigênio (Droge, 2002). Sua rápida reação com o NO leva à produção de substâncias citotóxicas como peroxinitrito e radicais hidroxil, que reduzem a oferta de NO às células endoteliais, gerando importante vasoconstrição (Beckman et al., 1990; Beckman e Koppenol, 1996; Carr et al., 2000; Griendling et al., 2000). Quando a produção de substâncias pró-oxidantes supera a de antioxidantes, um estado de desequilíbrio é instalado, conhecido como estresse oxidativo. Enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) tem papel fundamental na remoção das ERO. As SODs são responsáveis pela dismutação do ânion superóxido em peróxido de

hidrogênio e oxigênio molecular (Darley-USmar et al., 1995; Beckman et al., 1996). Foi descrito que pacientes com IC apresentam redução na vasodilatação mediada pelo endotélio, pela redução da biodisponibilidade do NO (Katz et al., 1992; Katz et al., 2005). Essa redução da oferta de NO está atribuída ao aumento das ERO uma vez que pacientes em tratamento antioxidante com vitamina C melhoraram a vasodilatação mediada pelo endotélio (Hornig et al., 1998). Em trabalho experimental, a transferência do gene da superóxido dismutase (SOD) melhorou a função endotelial em ratos com IC ao reduzir os níveis de ânions superóxido e ao melhorar o relaxamento dependente do endotélio vascular e ao difosfatato de adenosina (ADP) em anéis de aorta e mesentérica (Iida et al., 2005).

Outra importante fonte de ânion superóxido pode ser a eNOS. Na ausência de substrato L-arginina ou de cofatores como BH₄, a eNOS pode sofrer desacoplamento, resultando na produção de ânion superóxido ao invés de NO (Förstermann et al., 2006). Foi observado, em modelo experimental de IC, que aumento na expressão da eNOS, reduz a biodisponibilidade do NO provavelmente pelo seu desacoplamento (Munzel et al., 1993).

Nas arteríolas periféricas e nas coronárias, a angiotensina II interage intensamente com o sistema do NO promovendo a formação de ROS, com conseqüente disfunção endotelial e vasoconstricção (Yan et al., 2003). Todos os componentes do SRAA como a renina (Okamura et al. 1992), angiotensinogênio (Campbell et al., 1986; Rakugi et al., 1993), angiotensina II (Kifor et al., 1987) e aldosterona (Taketa et al., 1995) estão presentes nos vasos sanguíneos. Evidenciando a importância desse sistema, ratos infartados

tratados por sete dias com eplerenona tiveram aumento da biodisponibilidade do NO derivado da eNOS, redução da produção vascular de ânions superóxido, e aumento das defesas oxidantes, quando comparado ao grupo tratado com placebo (Sartório et al., 2007). Além disso, quando animais *knockout* para as três isoformas da NOS foram tratados com olmesartan, inibidor seletivo para o receptor 1 para a angiotensina II (AT₁), apresentaram uma redução na incidência do IM além de redução na formação da lesão vascular coronariana quando comparado ao grupo controle e ao grupo tratado com hidralazina (vasodilatador) (Nakata et al., 2008).

1.4 A TRANSIÇÃO PARA A INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

Como descrito anteriormente, a evolução temporal dos eventos que seguem o IM conduz à distúrbios estruturais e a falência funcional. Já é sabido que a extensão do infarto é um fator primordial na progressão para a IC. Previamente, já foi descrita uma relação entre a extensão do infarto e a função cardíaca (Pfeffer et al., 1979; Fletcher et al., 1981; Pfeffer e Braunwald, 1990), parâmetros ponderais (Pfeffer et al., 1979; Fletcher et al., 1981) e mortalidade (Pfeffer et al., 1985). Pfeffer et al. (1979) descreveram diferentes respostas funcionais de acordo com subdivisões de extensão do infarto. Neste estudo ele observa que animais com infartos considerados pequenos (menores que 30% da área ventricular esquerda) não apresentavam comprometimento funcional (Pfeffer et al., 1979) nem estrutural (Fletcher et al., 1981) significativos. Inversamente, quando o grupo com infartos maiores que 45% da área ventricular era analisado, observava-se uma grave disfunção ventricular

avaliada pela PDFVE (Pfeffer et al., 1979) e pela fração de ejeção (Pfeffer e Braunwald, 1990), além de importante aumento da dilatação da câmara ventricular (Fletcher et al., 1981).

Essa relação descrita acima já está bem estabelecida na literatura, em que a extensão do infarto está inversamente correlacionada à função cardíaca (Pfeffer et al., 1979). Porém, analisando minuciosamente o trabalho original realizado por Pfeffer et al. (1979), observa-se que no grupo que apresenta extensão do infarto em valores intermediários (entre 30 e 45% da área ventricular esquerda), aproximadamente 25% dos animais ultrapassavam dois desvios padrão da média de PDFVE. Isso mostra que em infartos considerados intermediários (entre 30 e 45% da área ventricular esquerda), a função cardíaca pode variar independente de variações na extensão do infarto, evidenciando que outros fatores, além do IM podem agir no desenvolvimento da IC.

Pereira et al. (2005) foram precursores em descrever a subdivisão funcional entre animais que desenvolveram e aqueles que não desenvolveram a IC, apresentando a mesma AI. Neste estudo foi observado que os animais sem sinais de IC tinham alterações ponderais, hemodinâmicas além de prejuízo no relaxamento dependente do endotélio e aumento na reatividade vascular a fenilefrina (FE). Além disso, neste mesmo trabalho, nos animais com sinais de IC, não foi observado nenhum prejuízo no relaxamento dependente do endotélio e na reatividade vascular à FE, sua resposta estava reduzida (Pereira et al. (2005).

Trabalhos subseqüentes em nosso laboratório, observam o mesmo padrão de dicotomia do grupo de animais infartados, com a mesma AI. Fernandes (2006) mostrou que oito semanas após o IM, o subgrupo de animais com sinais de IC apresentava prejuízo de contratilidade das câmaras cardíacas. Em trabalho complementar a este, Moura (2007) mostrou que houve prejuízo mecânico da câmara ventricular direita *in vivo*, mas normalizada *in vitro*, após oito semanas do IM.

Além disto, sabe-se que o desenvolvimento da IC acontece já em uma fase inicial do infarto. Após sete dias do IM, baseado em alterações ponderais, hemodinâmicas e funcionais da câmara cardíaca os animais infartados já podem ser subdivididos nos que não apresentam IC dos que apresentam (Arêas 2009). Porém, permanece desconhecido se alterações de reatividade vascular estão presentes em um período precoce à oclusão da artéria coronária em ratas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os parâmetros ponderais, hemodinâmicos e da função vascular do leito arterial caudal de ratas Wistar, sete dias após o infarto do miocárdio.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Padronizar o modelo do infarto utilizado baseado nos parâmetros ponderais e hemodinâmicos;

Avaliar a reatividade vascular do leito arterial caudal à resposta pressora a fenilefrina na presença e ausência do endotélio vascular, a resposta vasodilatadora dependente e independente do endotélio, induzida pela acetilcolina e pelo nitroprussiato de sódio, respectivamente. E a liberação basal de óxido nítrico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Para este trabalho foram utilizadas ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com peso corporal variando entre 200-250 gramas, provenientes do Biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. Estes animais foram mantidos em gaiolas apropriadas e submetidos a um ciclo claro-escuro de 12 horas, sob condições controladas de temperatura, tendo livre acesso à água e ração padrão para roedores.

Todos os protocolos a serem descritos foram realizados seguindo procedimentos éticos e em conformidade com as normas da legislação vigente para a prática didático-científica da vivisseção de animais de acordo com a Lei nº 6.638, de 08 de maio de 1979. Os protocolos experimentais de estudo da reatividade vascular em órgãos isolados e procedimentos cirúrgicos (hemodinâmica e IM) foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais Experimentais (CEUA / EMESCAM) regulamentado pela portaria 059/2006 de 10 outubro de 2006.

3.1.1 Grupos Experimentais

Os animais foram aleatoriamente selecionados para um dos três grupos apresentados abaixo:

1. Grupo controle (CT): não submetidos a procedimentos cirúrgicos.
2. Cirúrgica fictícia (SHAM): submetidos a cirurgia fictícia.
3. Grupo infarto do miocárdio (INF): submetidos a oclusão permanente da artéria coronária.

3.1.2. Técnica para Produção do Infarto do Miocárdio

O procedimento de indução do IM foi realizado de acordo com a técnica padrão em nosso laboratório (Mill et al., 1990), seguindo a descrição original feita por Johns e Olson (1954), sucintamente descrita abaixo.

As ratas, após serem pesadas eram anestesiadas com uma mistura contendo xilazina (10 mg/Kg) e quetamina (50 mg/Kg), administrados por via intramuscular. Em seguida, foram posicionadas e fixadas em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica. A região torácica esquerda foi tricotomizada com corte cutâneo paraesternal e divulsão dos músculos peitorais, as costelas foram expostas. O coração foi rapidamente exteriorizado após toracotomia e aplicação de leve pressão de sentido póstero-anterior na caixa torácica. A aproximadamente 3mm de sua origem, o ramo interventricular da artéria coronária esquerda foi ocluída permanentemente por sutura simples, com fio

mononylon 6.0. (Medline, Brasil). O coração foi reintroduzido no tórax e a toracotomia foi rapidamente fechada por sutura em forma de bolsa. Quando os movimentos respiratórios não eram reassumidos espontaneamente, foi promovida hiperinsuflação pulmonar. As ratas que foram submetidas ao mesmo procedimento cirúrgico, com exceção da oclusão da artéria coronária, formaram o grupo da cirurgia fictícia (SHAM). Após a recuperação, os animais foram recolocados em caixas aleatoriamente.

3.2 PARÂMETROS HEMODINÂMICOS

Sete dias após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram pesados, anestesiados com uretana (1,2 g/ Kg, *i.p.*) e submetidos à cirurgia para cateterização da artéria carótida direita, pela qual se pode medir a pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD), e quando no ventrículo esquerdo, as pressões sistólica (PSVE) e PDFVE. O plano anestésico foi avaliado pela responsividade ao estímulo doloroso, e quando necessário, houve suplementação na dose utilizada. Para a cateterização, foi utilizado cateter de polietileno PE 50 (Clay-Adams), preenchido com solução de heparina (100 UI/ml). Os valores de pressão foram coletados após estabilização do registro, e representam a média de 10 ciclos cardíacos consecutivos. A pressão arterial média (PAM) foi calculada a partir do registro de pressão arterial sanguínea pulsátil.

A PAS e PAD e as PSVE e PDFVE foram mensuradas através de transdutor de pressão (TSD 104A- Biopac) conectado a um pré-amplificador (Funbec MP-100). Os registros foram adquiridos por um sistema de aquisição de dados (MP 30 Byopac Systems, Inc; CA), utilizando uma taxa de amostragem de 2000 amostras/ segundo, enviados a um computador e salvo para análise posterior. A frequência cardíaca (FC) foi calculada a partir do registro de pressão sanguínea pulsátil e as derivadas de (dP/dt) máxima positiva e máxima negativa foram obtidas dos registros de ondas de pressão intraventricular esquerda em função do tempo.

3.3 PERFUSÃO DO LEITO VASCULAR CAUDAL

Os estudos de reatividade vascular do leito arterial caudal foram realizados *in vitro*, de acordo com a técnica padrão em nosso laboratório, descrita por França *et al.* (1997).

Após análise hemodinâmica, os animais foram heparinizados (500 UI, *i.p.*). Decorridos dez minutos do tratamento com heparina, a artéria caudal ventral foi dissecada e canulada próxima a sua base, utilizando-se cateter (Safelet intracate 24G X $\frac{3}{4}$, NIPRO) preenchido com solução nutritora. A cauda foi rapidamente seccionada e colocada em uma cuba de vidro preenchida com solução nutritora em banho maria (Cientec) previamente aquecido, onde era conectada ao sistema de perfusão. A solução nutritora perfundida foi a de Krebs-Henseleit, de composição, em mM: NaCl-119, KCl-5, CaCl₂ . 2 H₂O-1.25,

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ -1.2, NaH_2PO_4 -1, NaHCO_3 -27,2, glicose-11 e EDTA-0.03. A solução foi mantida a temperatura constante de $36 \pm 0,5^\circ\text{C}$, gaseificada com mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2) com pH próximo a 7,4. Para que não houvesse retorno do fluxo pelo sistema venoso, a extremidade distal da cauda foi seccionada. O fluxo foi mantido constante durante todo o experimento (2,5 ml/min) por meio de uma bomba peristáltica (Milan, Colombo, PR, Brasil). Para a obtenção de registro contínuo da pressão de perfusão média (PPM) da artéria caudal, um transdutor de pressão (RX104A, Biopac Systems, Inc, CA), foi conectado ao pré-amplificador (TSD104A, Biopac Systems, Inc, CA), situado entre a bomba peristáltica e a cânula arterial. Este pré-amplificador foi interligado ao sistema de aquisição de dados (MP 100 Biopac Systems, Inc; CA), o qual estava conectado a um computador, para obtenção de registros contínuos dessa preparação.

Uma vez montadas, os registros da PPM eram iniciados e as preparações mantidas por um período de 40 minutos para estabilização. Considerando que $\text{Pressão} = \text{Fluxo} \times \text{Resistência}$, e sendo o fluxo constante, as variações de pressão registradas indicaram variações da resistência vascular.

Os protocolos com esta preparação foram realizados nos grupos CT, SHAM, INF, sendo divididos da seguinte forma:

3.3.1 Protocolos Experimentais

Após o período de estabilização, foi realizada administração de FE, agonista α_1 adrenérgico (1 μ g, *in bolus*, em um volume de 100 μ l), para verificar a viabilidade vascular da preparação. Após confirmação da viabilidade vascular, e quando o valor pressórico retornava ao nível basal, o leito vascular caudal foi submetido a pré-contracção com solução de Krebs-Henseleit com 0,7 μ M de FE. Alcançado o platô de contracção, foi administrada uma dose acetilcolina (ACh, 5 μ g/100 μ l, *in bolus*), e em seguida, foi administrada uma dose nitroprussiato de sódio (NPS, 0,1 μ g/100 μ l, *in bolus*). O relaxamento produzido pela ACh traduz a viabilidade do endotélio, enquanto que o relaxamento produzido pelo NPS reflete a integridade do MLV. O endotélio vascular foi considerado íntegro quando o relaxamento produzido pela ACh era superior a 40%, enquanto que a integridade do músculo liso foi considerada diante do relaxamento ao NPS acima de 50%, em relação ao valor máximo alcançado pela pré-contracção com a solução de Krebs-Henseleit com 0,7 μ M de FE.

3.3.1.1 Reatividade Vascular à Fenilefrina

Para avaliar a reatividade vascular nos grupos estudados, foi utilizado a FE.

No primeiro protocolo, as curvas dose-resposta à FE (0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1,0; 3,0; 10; 30; 100; 300 μ g, *in bolus*, em um volume de 100 μ l cada

dose) foram realizadas na presença de endotélio, cuja integridade foi avaliada conforme descrito no protocolo anterior.

O segundo protocolo objetivou avaliar a participação do endotélio na resposta constritora mediada pela FE. Para a realização deste protocolo experimental, após uma curva dose-reposta à FE na presença de endotélio íntegro, o mesmo era lesado através da administração de CHAPS {3-[(3-cloroamidopropil) dimetilamônio]-l-propanosulfonato}, 10 mg, *in bolus*, em volume de 100 µl. Após 40 minutos da administração de CHAPS, foi realizada a verificação da remoção do endotélio. A lesão endotelial foi confirmada através do relaxamento induzido pela ACh igual ou inferior a 10%, nas preparações pré-contraídas com solução de Krebs-Henseleit com 0,7 µM de FE. Para descartar uma possível lesão do músculo liso vascular pelo CHAPS, foi realizada a administração de uma dose de NPS (10 mg/100 µl, *in bolus*) nas preparações anteriormente pré-contraídas com solução de Krebs-Henseleit com 0,7 µM de FE. Após o restabelecimento de valores basais de PPM, as preparações foram novamente submetidas a outra curva dose-resposta à FE.

Com o objetivo de avaliar uma possível liberação basal de NO, o terceiro protocolo foi realizado. Depois da confirmação das integridades endotelial e MLV, as preparações foram pré-contraídas com solução de Krebs-Henseleit com 0,7 µM de FE durante 45 minutos e em seguida perfundidas com solução de Krebs-Henseleit com 0,7 µM de FE na presença de 0,4 mM de inibidor não seletivo para a síntese de NO, o N^G-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME), durante 45 minutos. A liberação basal de NO foi estimada mediante o cálculo da razão entre a diferença da resposta máxima de PPM obtida na presença de

solução de Krebs-Henseleit contendo FE e L-NAME e da resposta máxima de PPM obtida na pressão da solução Krebs-Henseleit contendo FE.

3.3.1.2 Vasodilatação Dependente do Endotélio

Para avaliar a vasodilatação dependente do endotélio, foi realizada uma curva concentração-resposta a acetilcolina (ACh, 0,1 η M a 1 mM). Cada concentração foi perfundida por período de quatro minutos, após pré-contração em solução de Krebs com 65 mM de KCl.

3.3.1.3 Vasodilatação Independente do Endotélio

Para avaliar a vasodilatação independente do endotélio, foi realizada uma curva concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio (NPS, 1 η M a 10 mM). Cada concentração foi perfundida pelo período de 3 minutos, após pré-contração em solução de Krebs com 65 mM de KCl.

3.4 DETERMINAÇÃO DA HIPERTROFIA CARDÍACA E EXTENÇÃO DO INFARTO

Durante o período de estabilização da preparação de reatividade do leito vascular caudal, os animais eram sacrificados tendo o coração rapidamente retirado e colocado em solução salina (NaCl 0,9%). Os átrios foram removidos dos ventrículos, e esses dissecados, separados e pesados. O septo interventricular foi considerado parte do ventrículo esquerdo (VE). A hipertrofia cardíaca foi avaliada utilizando pesos úmidos dos ventrículos direito (VD) e VE corrigidos pelo peso corporal (PC) do respectivo animal. Os contornos do VE e área de infarto (AI) do coração foram cuidadosamente separados e delineados sobre papel milimetrado, sendo as áreas medidas por contagem de pontos, para obtenção da área correspondente em mm^2 (Mill et. al, 1990). O resultado da medida do infarto é descrito aqui como a área percentual infartada do VE em relação a área total do VE.

3.5 DETERMINAÇÃO DA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

Após sete dias da indução do IM, os animais foram separados em dois subgrupos: aqueles que apresentavam os sinais de insuficiência cardíaca (INF-IC) e aqueles que não apresentavam os sinais de insuficiência cardíaca (INF). Essa separação foi realizada utilizando o limite superior do intervalo de confiança de 95% da média da PDFVE dos animais infartados. Os animais que ultrapassavam o ponto de corte foram considerados como tendo a IC (INF-IC),

Os animais abaixo deste limite foram considerados infartados com a função preservada (INF)

3.6 EXPRESSÃO DOS DADOS

Os resultados foram expressos com média \pm erro padrão da média (EPM).

As respostas vasopressoras induzidas pela FE foram expressas como Δ PPM, subtraindo-se o pico da resposta pressora pela pressão de perfusão basal. As respostas de relaxamento induzido pela ACh e pelo NPS foram expressas como a percentagem de contração residual ao cloreto de potássio (65 mM). O platô da pré-contração foi considerado como 100% de contração.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para cada curva dose-resposta, a dose do agonista que produziu metade (EC50) da resposta máxima obtida ($R_{m\acute{a}x}$) foi estimada usando análise de regressão não-linear. Análise de correlação de Pearson foram utilizadas para verificar associações entre duas variáveis. O intervalo de confiança 95% foi utilizado para obter o ponto de corte entre os animais que desenvolveram ou não IC. Teste t de Student foi utilizado para comparar as AI entre os grupos INF e INF-IC. Análise de variância (ANOVA) uma via foi utilizada para comparação

de mais de dois grupos e quando positiva, o teste de Fischer foi utilizado para identificar as diferenças. A curva da característica operativa do receptor (ROC) (do inglês “*receiver operating characteristic*”) foi utilizada para obter a sensibilidade e especificidade da variável em prever determinado evento. O $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism (Graph Pad, Inc., San Diego, CA).

3.8 REAGENTES E FÁRMACOS

Acetilcolina, cloridrato (Sigma)

Ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) (Sigma)

Álcool 70° (Protus)

Bicarbonato de sódio (Merck)

CHAPS {3-[(3-cloroamidopropil) dimetilamônio]-l-propanosulfonato} (Sigma)

Cloreto de cálcio, diidratado (Merck)

Cloreto de potássio (Merck)

Cloreto de sódio (Merck)

Cloreto de tetrazólio (Merck)

Cloridrato de Quetamina (Bayer)

Cloridrato de Xilazina (Vivac)

Fosfato de sódio (Merck)

Glicose (Reagem)

Heparina sódica (Roche)

L – Fenilefrina, hidrocloreto (Sigma)

N^G-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) (Sigma)

Nitroprussiato de sódio, diidrato (Sigma)

Sulfato de magnésio heptahidratado (Merck)

Uretana (Sigma)

4 RESULTADOS

4.1 PARÂMETROS PONDERAIS E EXTENSÃO DO INFARTO

4.1.1 Análise Global dos Grupos

A Tabela 1 sumariza os parâmetros ponderais obtidos sete dias após o início do estudo. Todos os parâmetros avaliados foram similares entre os grupos CT e SHAM (Tabela 1). Porém, alterações significativas foram encontradas no grupo INF quando comparado aos demais grupos, como por exemplo, redução do peso corporal (PC), aumento da razão entre o peso do pulmão (PP)/PC e entre o peso do ventrículo direito (VD)/PC (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros ponderais mensurados sete dias após o início dos experimentos.

	CT (n=6)	SHAM(n=7)	INF (n=45)
PC inicial (g)	218±4,5	225±5,5	228±1,6
PC final (g)	232±4,8	233±4,8	222±2,2
Varição de PC (g)	14,5±2,73	8,14±2,24	-6,73±2,62* #
PP (g)	1,28±0,08	1,29±0,05	1,94±0,10* #
PP/PC (mg/g)	5,6±0,34	5,6±0,24	8,85±0,52* #
VE (g)	0,473±0,009	0,472±0,01	0,473±0,010
VE/PC (mg/g)	2,09±0,05	2,06±0,05	2,04±0,073
VD (g)	0,117±0,006	0,130±0,01	0,164±0,005* #
VD/PC (mg/g)	0,52±0,03	0,57±0,04	0,71±0,03* #
AI (%)	--	--	36,6±1,1

PC, peso corporal; PP, peso do pulmão; VE, ventrículo esquerdo; VD, ventrículo direito, AI, área do infarto.

* $P < 0,05$ vs CONT; # $P < 0,05$ vs SHAM

As medidas hemodinâmicas obtidas através do cateterismo cardíaco estão apresentadas na Tabela 2. Sete dias após o início dos experimentos, o grupo INF apresentou um aumento bastante significativo da PDFVE em relação aos demais grupos (Tabela 2). Além disso, a PSVE, e a dP/dt + e dP/dt - foram reduzidas pelo IM (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros hemodinâmicos mensurados sete dias após o início dos experimentos.

	CT (n=6)	SHAM (n=7)	INF (n=45)
FC (BPM)	350±19	397±13	353±8
PAS (mmHg)	98,8±5,9	108,2±5,6	94,3±1,5#
PAD (mmHg)	63,5±5,6	73,1±5,8	68,3±1,9
PAM (mmHg)	80,1±5,8	88,1±5,9	81,7±1,7
PSVE (mmHg)	108,4±7,1	111±4,5	100,8±2,1#
PDFVE (mmHg)	2,4±0,7	2±0,3	7,82±1*#
dP/dt+ (mmHg/s)	5856±486	7247±910	4572±275#
dP/dt- (mmHg/s)	-5343±590	-5716±710	-4368±182#

FC, frequência cardíaca; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; PAM, pressão arterial média; PSVE, pressão sistólica de ventrículo esquerdo; PDFVE, pressão diastólica final de ventrículo esquerdo; dP/dt +, derivada de pressão sobre derivada de tempo máxima positiva; dP/dt -, derivada de pressão sobre derivada de tempo máxima negativa.

* P<0,05 vs CONT; # P<0,05 vs SHAM

Para examinar a associação entre a AI ou PDFVE com os parâmetros ponderais, análises de correlação linear foram realizadas e apresentadas na Figura 1. Observa-se que a variação do PC foi a variável que melhor se associou tanto com a AI quanto com a PDFVE (Figura 1A e 1B). Além disso, a razão PP/PC também se associou de forma significativa com essas duas variáveis (Figura 1C e 1D). Ao contrário, a razão VE/PC não se associou de forma significativa com a AI ou com a PDFVE (Figura 1G e 1H).

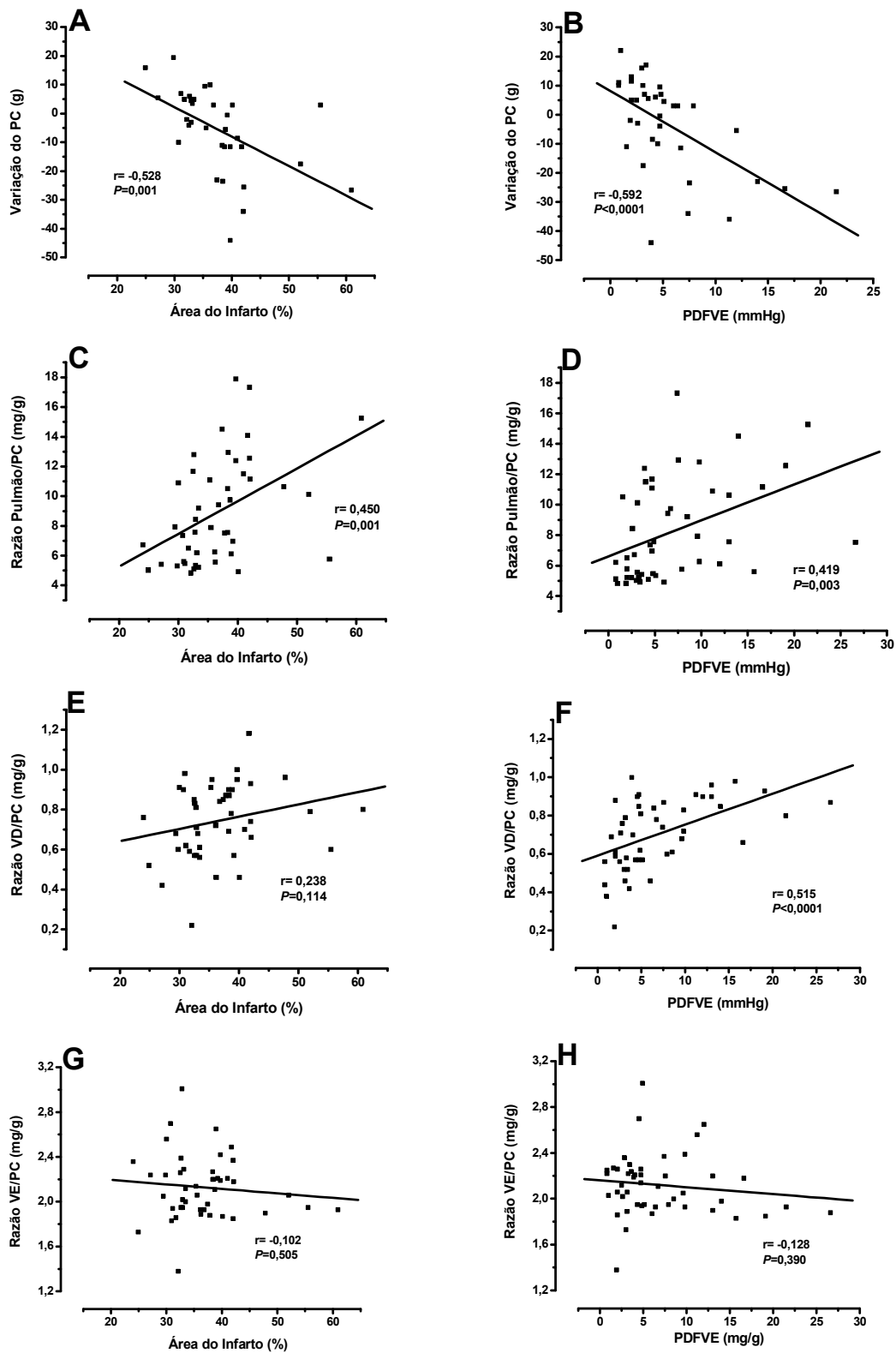


Figura 1. Análise de correlação de Pearson entre parâmetros ponderais e a AI (A, C, E e G) ou a PDFVE (B, D, F, H). r: coeficiente de correlação de Pearson; n: 33-45.

A análise de correlação linear entre a PDFVE e a AI mostrou associação significativa, porém, fraca entre essas duas variáveis ($r=0,389$, $r^2=0,151$; $P=0,013$) (Figura 2). Essa correlação pode ter sido fraca devido ao grande número de animais que ultrapassam o intervalo de confiança de 95% (4,4 – 9,2 mmHg) como evidenciado na Figura 2. Isso demonstra que outros fatores além da AI podem alterar a PDFVE.

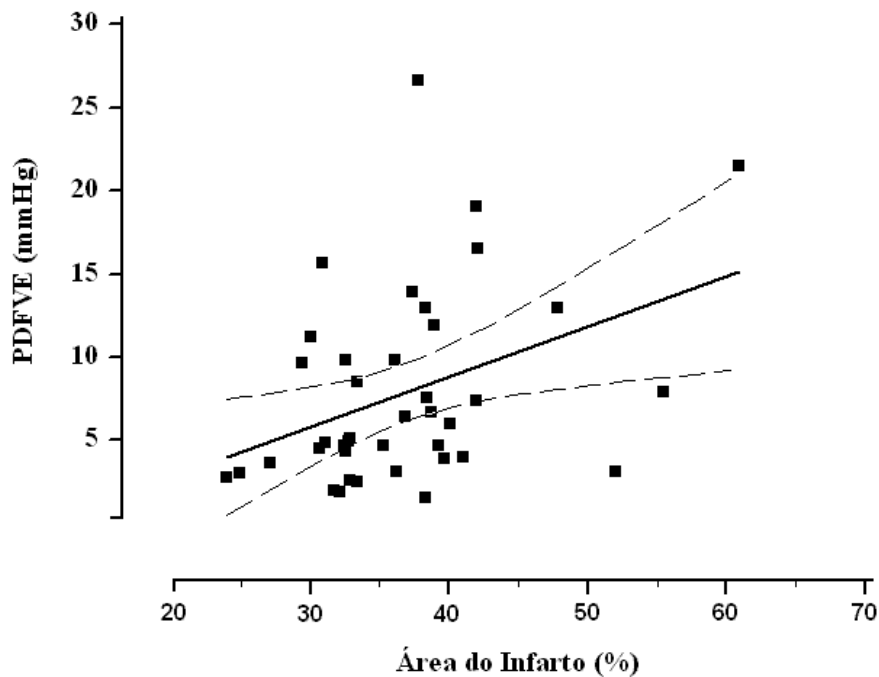


Figura 2. Análise de correlação linear entre a PDFVE e a AI. O coeficiente de correlação de Pearson foi $r = 0,389$ ($P = 0,013$), e o coeficiente de determinação foi $r^2 = 0,151$. A linha contínua indica a reta de regressão, e as linhas descontínuas indicam os limites inferior e superior do intervalo de confiança 95%. ($n = 40$).

4.1.2 Análise com Subdivisão no Grupo Infartado

Diante da grande dispersão da PDFVE dentro de uma faixa de extensão do infarto, foi realizada uma subdivisão no grupo INF. Utilizando a PDFVE como variável padrão para determinação da IC, animais que ultrapassavam o limite superior do intervalo de confiança 95% desta variável (média: 7,82 mmHg, intervalo de confiança 95%: 4,4 – 9,2 mmHg) foram considerados como tendo IC (Figura 3). Assim, reavaliamos os resultados utilizando agora as subdivisões após o INF, considerando como tendo IC aqueles animais que apresentassem valores de PDFVE maiores que 9,2 mmHg. Os animais que estivessem abaixo deste limite, eram considerados infartados mas sem apresentar IC.

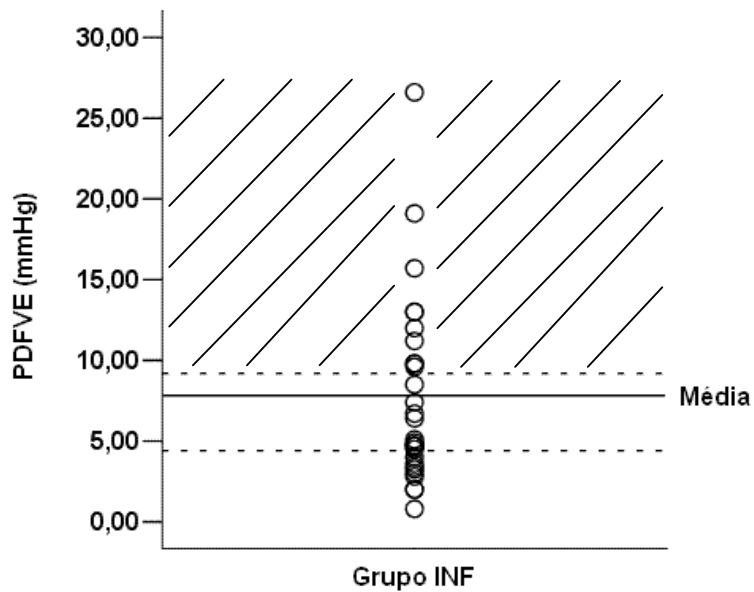


Figura 3. Gráfico de dispersão da PDFVE no grupo INF. A linha contínua representa a média e as linhas descontínuas delimitam o intervalo de confiança de 95% (4,4 – 9,2). A área hachurada indica os animais caracterizados como tendo IC.

Na Tabela 3 estão apresentados os parâmetros ponderais relativos a avaliação realizada sete dias após o início dos experimentos, subdividindo os animais INF que apresentam ou não IC. Os valores para os grupos CT e SHAM foram repetidos da Tabela 1. A variação do PC foi significativamente diferente no grupo INF-IC comparado aos demais grupos mostrando redução importante neste parâmetro. De forma semelhante, a razão PP/PC foi aumentada no grupo INF-IC comparado ao grupo CT e SHAM, com grande tendência ao aumento em relação ao grupo INF ($P= 0,08$).

Quando avaliada separadamente, a AI não foi diferente entre os grupos INF que possuíam ou não sinais de IC (INF=35,78±1,16, INF-IC=38,78±2,35; $P=0,27$).

Tabela 3. Parâmetros ponderais mensurados com a redistribuição do grupo INF sete dias após o início dos experimentos.

	CT (n=6)	SHAM (n=7)	INF (n=31)	INF-IC (n=14)
PC inicial (g)	217,6±4,48	224,7±5,55	227,3±1,75	235,4±2,33*
PC final (g)	232,1±4,8	232,8±4,8	223,2±2,73	212,1±1,29
Varição de PC (g)	14,5±2,73	8,14±2,24	-4,06±2,65*#	-23,3±4,96*#†
PP(g)	1,28±0,15	1,29±0,04	1,85±0,12#	2,17±0,18*#
PP/PC (mg/g)	5,5±0,64	5,5±0,22	8,44±0,62#	9,90±0,91*#
VE (g)	0,490±0,007	0,483±0,014	0,476±0,01	0,465±0,01
VE/PC (mg/g)	2,11±0,052	2,08±0,077	2,07±0,08	1,95±0,16
VD (g)	0,104±0,006	0,131±0,014	0,155±0,006*	0,187±0,008*#†
VD/PC (mg/g)	0,45±0,03	0,57±0,06	0,68±0,04	0,78±0,06*
AI (%)			35,78±1,2	38,78±2,3

PC, peso corporal; PP, peso do pulmão; VE, ventrículo esquerdo; VD, ventrículo direito, AI, área do infarto.

* $P < 0,05$ vs CONT; # $P < 0,05$ vs SHAM; † $P < 0,05$ vs INF

Com a divisão do grupo INF, foi observado que o grupo que desenvolveu IC (INF-IC) apresentou redução significativa da PSVE e da dP/dt + e dP/dt -. A PDFVE foi significativamente aumentada neste grupo (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros hemodinâmicos após divisão do grupo INF

	CT (n=6)	SHAM (n=7)	INF (n=31)	INF-IC (n=14)
FC (BPM)	350±19	397±13	338±9,9#	373±10
PAS (mmHg)	98,8±5,9	108,2±5,6	93,5±1,8#	96,2±2,9#
PAD (mmHg)	63,5±5,6	73,1±5,8	66,7±2,2	71,7±3,8
PAM (mmHg)	80,1±5,8	88,1±5,9	79,8±2	86±3
PSVE (mmHg)	108,4±7,1	111±4,5	99,3±2,5*#	103,2±3,8*
PDFVE (mmHg)	2,4±0,7	2±0,3	4,4±0,3	15,3±1,1*#†
dP/dt+ (mmHg/s)	5856±486	7247±910	4598±230#	3656±690*#
dP/dt- (mmHg/s)	-5343±590	-5716±710	-4697±153	-3577±308*#†

FC, frequência cardíaca; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; PAM, pressão arterial média; PSVE, pressão sistólica de ventrículo esquerdo; PDFVE, pressão diastólica final de ventrículo esquerdo; dP/dt +, derivada de pressão sobre derivada de tempo máxima positiva; dP/dt -, derivada de pressão sobre derivada de tempo máxima negativa.

* P<0,05 vs CONT; # P<0,05 vs SHAM; † P<0,05 vs INF

Utilizando a curva ROC para determinar a sensibilidade e a especificidade da variação do PC em determinar a IC em ratas sete dias após IM, observamos que o ponto de corte 9,2 mmHg de PDFVE tem 100% de sensibilidade e 83,8% de especificidade para detecção da IC (Figura 4).

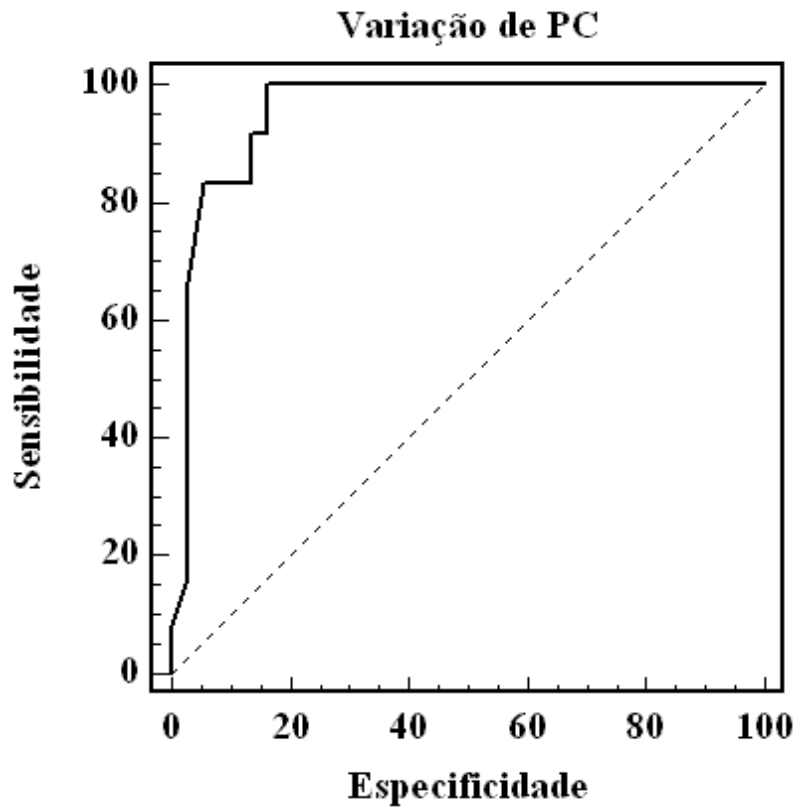


Figura 4. Curva ROC expressando os resultados de sensibilidade e especificidade em função do ponto de corte escolhido para determinação da IC em ratas sete dias após o IM.

4.2 REATIVIDADE VASCULAR DO LEITO ARTERIAL CAUDAL

4.4.1 Resposta Vasoconstrictora à Fenilefrina

Os dados referentes a EC50 e ao Rmax estão sumarizados na Tabela 5. A FE aumentou de maneira dose - dependente a Δ PPM nos quatro grupos estudados (CT, SHAM, INF, INF-IC), como apresentado na Figura 5 e na Tabela 5.

O grupo INF-IC teve sua resposta máxima reduzida quando comparado aos demais grupos. Além disso, o grupo INF-IC apresentou aumento na EC50 quando comparado ao grupo INF, mas semelhante aos grupos CT e SHAM.

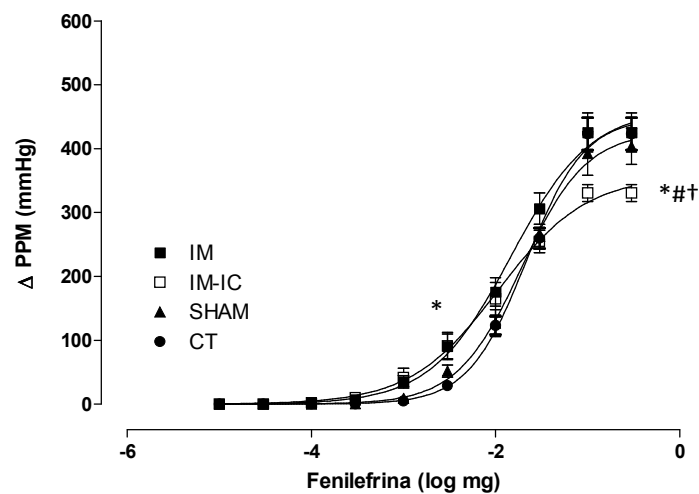


Figura 5. Curva dose - resposta à FE em leito arterial caudal de ratas sete dias após o início dos experimentos. Δ PPM em relação a doses crescentes de FE nos grupos CT (n= 9), SHAM (n= 9), INF (n=10) e INF-IC (n=10). * $P < 0,05$ vs CONT; # $P < 0,05$ vs SHAM; † $P < 0,05$ vs INF.

Tabela 5. R_{máx} e - Log EC₅₀ obtidos de curvas dose-resposta à FE em leito arterial caudal de ratas sete dias após o início dos experimentos.

Grupo	R_{máx}	- Log EC₅₀
CT (n= 9)	423,2±25,4	1,6±0,50
SHAM (n= 9)	403,6±28,3	1,7±0,07
INF (n=10)	425,5±30,4	1,9±0,11
INF-IC (n=10)	330,4±13,4*#†	2,0±0,16*

* P<0,05 vs CONT; # P<0,05 vs SHAM; † P<0,05 vs INF

Na Figura 6 estão representadas as curvas dose-resposta à FE antes (linhas contínuas) e após (linhas descontínuas) a remoção do endotélio vascular nos quatro grupos estudados. A comparação entre elas foi realizada através do valor percentual da diferença entre as áreas abaixo das curvas na presença e na ausência do endotélio vascular nos grupos estudados (Figura 6 E). A AUC no grupo INF-IC foi similar ao grupo INF, diferindo de forma significativa dos grupos CT e SHAM (CT: $68,4 \pm 2,4$; SHAM: $67,1 \pm 4,5$; INF: $48,4 \pm 5,3$; IC: $44,5 \pm 7,5$; $P < 0,05$) (Figura 6 E).

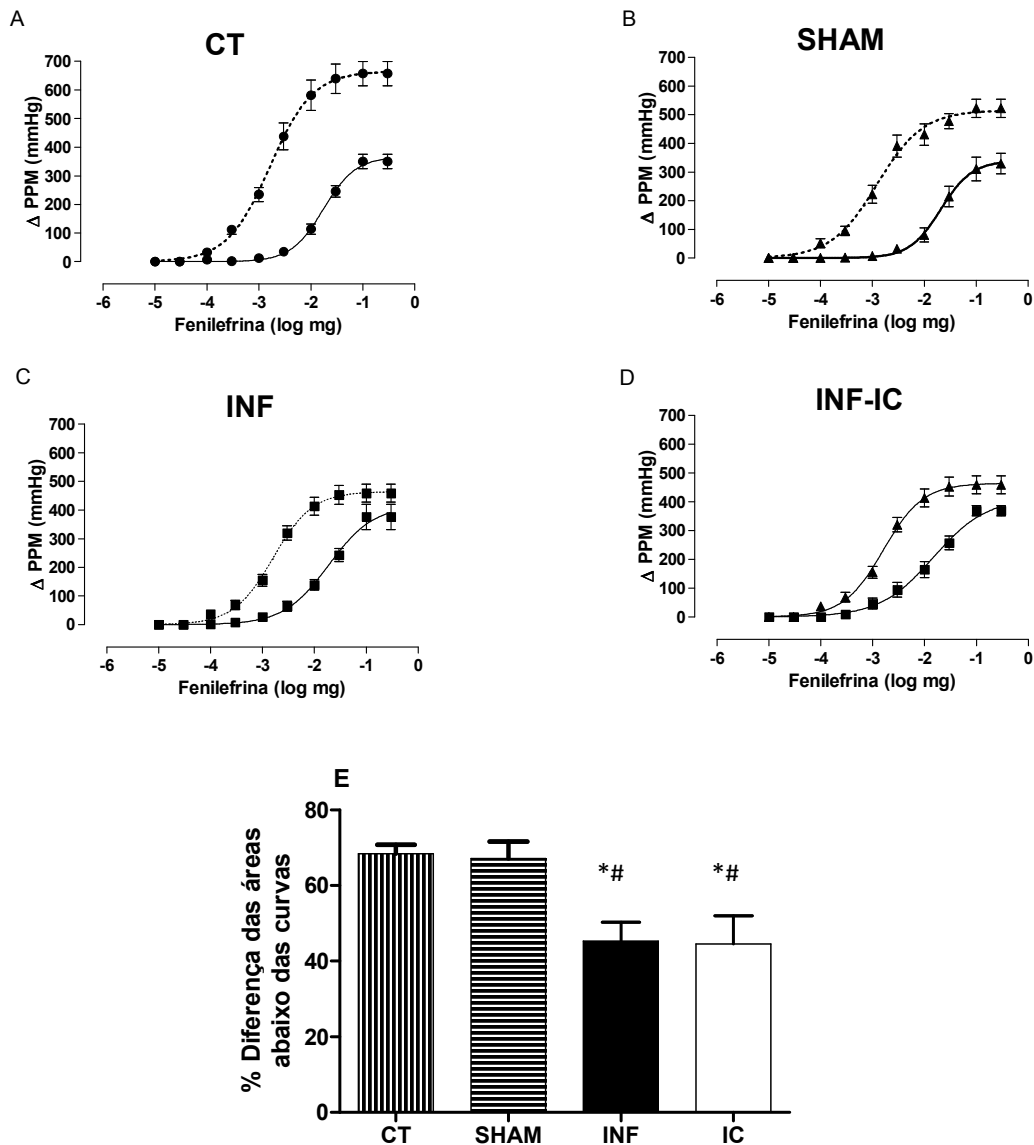


Figura 6. Curvas dose - resposta à FE antes e após remoção endotelial em leito arterial caudal de ratas sete dias após o início dos experimentos. Δ PPM à doses crescentes de FE em ratos CT (A, n= 9), SHAM (B, n= 6), INF (C, n=8) e INF-IC (D, n=7) nas condições com endotélio (E+) e após 40 min a remoção endotelial (E-), induzida por CHAPS. Figura E indica a diferença percentual das áreas abaixo das curvas nos grupos CT (n=9), SHAM (n=6), INF (n=8) e INF-IC (n=7). * $P < 0,05$ vs CONT; # $P < 0,05$ vs SHAM; † $P < 0,05$ vs INF.

A Figura 7 representa o incremento na liberação basal de NO. O grupo INF-IC apresentou uma maior liberação basal de NO que os demais grupos CT ($7,40 \pm 1,36$), SHAM ($7,23 \pm 0,80$), INF ($3,77 \pm 0,70$) e INF-IC ($13,35 \pm 2,31$).

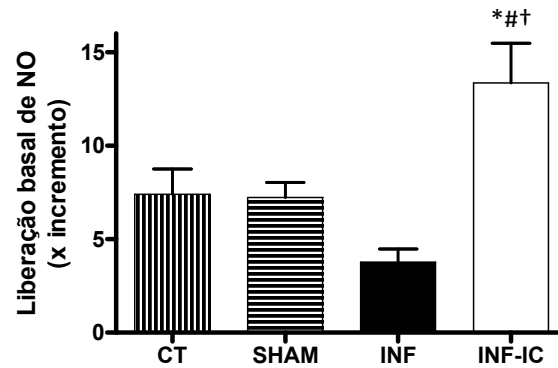


Figura 7. Liberação basal de NO em leito arterial caudal de ratas sete dias após o início dos experimentos nos grupos CT (n= 5), SHAM (n= 6), INF (n=8) e INF-IC (n=6).
* $P < 0,05$ vs CONT; # $P < 0,05$ vs SHAM; † $P < 0,05$ vs INF.

4.2.2 Resposta Vasodilatadora Dependente do Endotélio Vascular

Os dados referentes a EC₅₀ e ao R_{max} estão sumarizados na Tabela 6. A ACh reduziu, de maneira concentração - dependente, a contração induzida por KCl (65 mM) nos quatro grupos estudados, como ilustrado na Figura 8. A resposta vasodilatadora máxima a ACh apresentou-se significativamente reduzida nos grupos SHAM e INF quando comparadas aos grupos CT e INF-IC (Tabela 6).

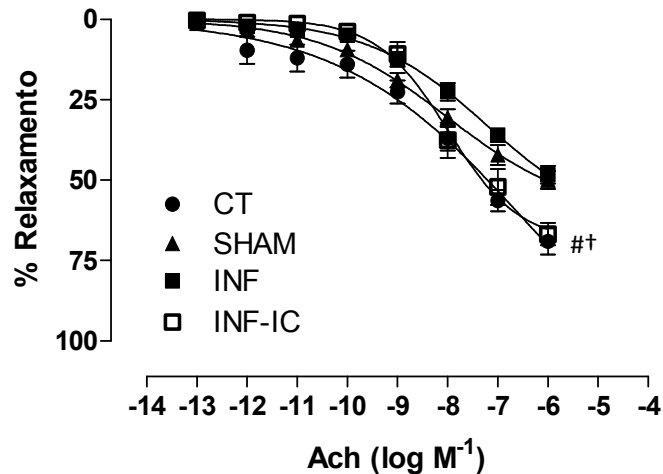


Figura 8. Curva concentração - resposta a ACh em leito arterial caudal de ratas sete dias após o início dos experimentos. Δ PPM à concentrações crescentes de ACh nos grupos CT (n= 6), SHAM (n= 6), INF (n=5) e INF-IC (n=5). * $P < 0,05$ vs CONT; # $P < 0,05$ vs SHAM; † $P < 0,05$ vs INF

Tabela 6. R_{máx} e -Log EC₅₀ obtidos de curvas concentração-resposta a ACh em leito arterial caudal de ratas sete dias após o início dos experimentos.

Grupo NPS	R_{máx}	-Log EC₅₀
CT (n= 6)	69,1±4,0	8,1±0,12
SHAM (n= 6)	50,0±2,8*	8,3±0,18
INF (n=5)	48,4±2,7*	7.9±0,27
INF-IC (n=5)	66,9±3,4#†	8,1±0,20

* P<0,05 vs CONT; # P<0,05 vs SHAM; † P<0,05 vs INF

4.2.3 Resposta Vasodilatadora Independente do Endotélio Vascular

Os dados referentes a EC₅₀ e ao R_{máx} estão sumarizados na Tabela 7. O NPS reduziu igualmente, de maneira concentração - dependente, a contração induzida por KCl (65 mM) nos quatro grupos estudados sem diferenças estatisticamente significantes, como ilustrado na Figura 9.

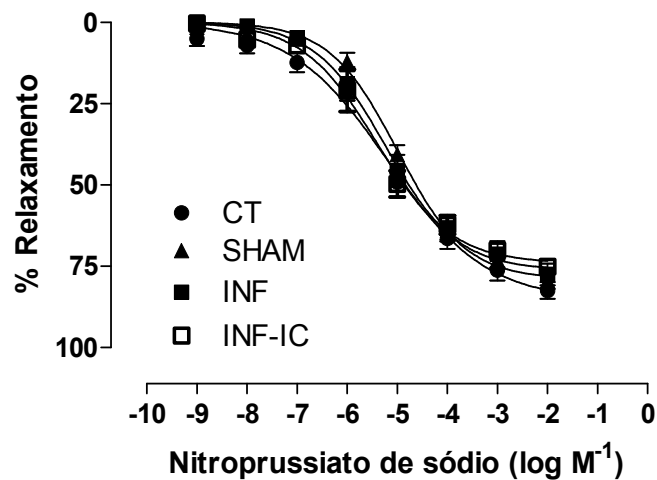


Figura 9. Curva concentração - resposta ao NPS em leito arterial caudal de ratas sete dias após o início dos experimentos. Δ PPM à concentrações crescentes de NPS nos grupos CT (n= 6), SHAM (n= 6), INF (n=5) e INF-IC (n=5), sete dias após o início dos experimentos.

Tabela 7. R_{máx} e -Log EC₅₀ obtidos de curvas concentração-resposta ao NPS em leito arterial caudal de ratos sete dias após o início dos experimentos.

Grupo NPS	R_{máx}	-Log EC₅₀
CT (n=6)	82,6±2,6	5,3±0,22
SHAM (n=6)	79,6±2,5	5,4±0,22
INF (n=5)	77,6±3,3	5,0±0,05
INF-IC (n=5)	75,2±1,6	5,2±0,05

Para testar a associação entre diferentes variáveis em relação à resposta vascular à FE, realizamos o teste de correlação de Pearson. A Rmáx à FE apresentou uma associação negativa significativa tanto com a PDFVE (Figura 10A) quanto com a AI (Figura 10B).

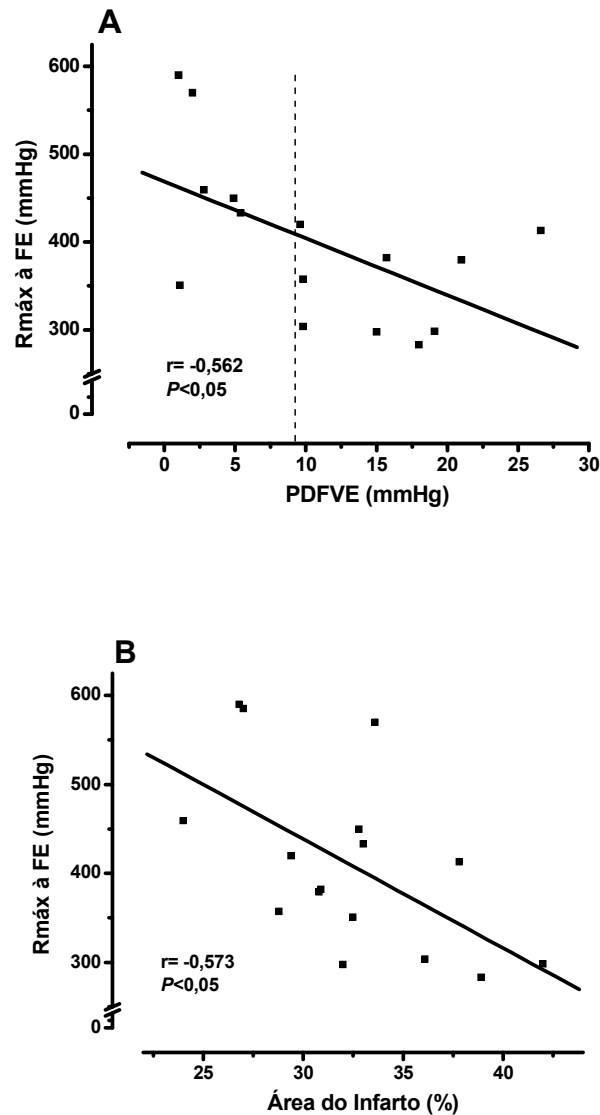


Figura 10. Análise de correlação de Pearson entre a PDFVE (A) e a AI (B) com a Rmáx à FE. A linha vertical tracejada indica a divisão em animais que desenvolveram ou não a IC.

5 DISCUSSÃO

5.1 ASPECTOS GERAIS

As doenças cardiovasculares, que tem o IM como principal representante, são responsáveis pelo aumento dos índices de morbidade e mortalidade que acometem uma parcela representativa da população mundial. Nesse contexto preocupante, diversos estudos clínicos e experimentais têm sido realizados para tentar reduzir os altos índices de mortalidade nos pacientes acometidos pelo IM e para fornecer melhores opções terapêuticas para esses pacientes.

Com os experimentos realizados por John's & Olson (1954) foi possível reproduzir o IM em animais de pequeno porte através da ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda, e assim mimetizar o desenvolvimento da IC. Com isso, os ratos passaram a ser os animais mais utilizados para estudar o IM e o desenvolvimento da IC. De forma comparativa, as alterações ocorridas durante o processo de remodelamento cardíaco humano, são similares aos que ocorrem nesse modelo experimental (Kohno et al., 2009).

Já é bem estabelecido na literatura a importância da AI sobre o desenvolvimento da IC. Pereira et al. (2005) observaram que trinta dias após o IM, alguns animais apresentavam sinais de IC e outros não, mesmo com AI semelhantes. Alterações ponderais, hemodinâmicas e de reatividade vascular no leito caudal foram diferentes em cada subgrupo estudado. Trabalhos posteriores em nosso laboratório sustentam a subdivisão do grupo que foi

submetido ao IM ao mostrar que, além das alterações ponderais e hemodinâmicas, existem alterações funcionais na contratilidade miocárdica (Fernandes, 2006) e da câmara cardíaca (Moura, 2007), oito semanas após o IM.

Arêas (2009) avaliou as alterações cardíacas sete dias após o IM e observaram que, já existiam subgrupos funcionalmente diferentes, além de alterações ponderais e hemodinâmicas similares às aquelas encontradas na descrição original feita por Pereira et al (2005).

Baseado nisso, objetivamos avaliar com esse estudo se as alterações vasculares detectadas na fase crônica já estariam presentes aos sete dias após o infarto em ratas, visto que alterações cardíacas já foram observadas em ratos (Arêas 2009). Inicialmente, fez-se necessário instituir uma padronização para estabelecer através da variável PDFVE, a caracterização da IC, já que estudos à consideram como referência para a determinação da IC Pfeffer et al., 1979; Anversa et al., 1985; Pfeffer et al., 1985). Após isso, análises de reatividade vascular no leito arterial caudal foram realizadas, para avaliação dos animais com e sem sinais de IC.

5.2 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO MODELO UTILIZADO

Os resultados apresentados foram realizados sete dias após o início do estudo, para avaliação dos parâmetros ponderais e hemodinâmicos de ratas CT, SHAM e INF.

Nossos resultados mostram que o IM gerou alterações bastante significativas nos parâmetros ponderais avaliados. Foi observada redução do PC, aumento da razão pulmão/PC e VD/PC no grupo infartado. Esses dados estão de acordo aos observados por Ono et al. (1998) sete dias após o IM em ratos, evidenciando redução do PC final e aumento da razão VD/PC no grupo infartado. Além disso, em avaliação realizada em diferentes períodos após o infarto houve redução do PC final (Ono et al., 1998; Sartório et al., 2005), hipertrofia de VD (Pfeffer et al., 1979; Mill et al., 2003; Bianchi et al., 2006; Resende et al., 2006; Giuberti et al., 2007) e aumento da razão PP/PC (Jasmin et al., 2003; Bianchi et al., 2006; Giuberti et al., 2007) em ratos. Essas alterações decorrem do processo de remodelamento ventricular que acomete o miocárdio após a injúria isquêmica. Porém, Csanyi et al. (2006) não observaram alterações significativas na razão VD/PC em fêmeas e em machos sete dias após o infarto (Csanyi et al. 2006). Isso pode ser explicado por um número reduzido de animais utilizados nesse trabalho, o que pode dificultar a detecção de diferenças significativas. Em contraste, a razão VE/PC se manteve semelhante entre os grupos avaliados no presente trabalho. Isso pode ser devido a perda de tecido miocárdico presente nas ratas infartadas contrabalanceado pela hipertrofia do miocárdio remanescente, como

previamente descrito (Mill *et al.*, 1990; Stefanon *et al.* 1994; Mill *et al.*, 2003; Bianchi *et al.*, 2006; Resende *et al.*, 2006; Giuberti *et al.*, 2007).

Em relação aos parâmetros hemodinâmicos, alterações importantes foram encontradas no grupo submetido ao IM. Assim, apesar da semelhança nos valores de PAD, o grupo infartado apresentou redução significativa da PAS. Além disso, A PSVE e a $dP/dt+$ e $dP/dt-$ foram reduzidas pelo IM. Esses eventos já estão amplamente estabelecidos na literatura como sendo decorrentes de perda de massa contrátil e disfunção do miocárdio remanescente (Pfeffer *et al.*, 1979; Pfeffer *et al.*, 1985; Anversa *et al.*, 1984; Mill *et al.*, 2003; Bianchi *et al.*, 2006; Giuberti *et al.*, 2007; Sartório *et al.*, 2007).

A PDFVE aumentou no grupo INF. Esse aumento da pressão de enchimento ventricular, extensamente observado na literatura (Pfeffer *et al.*, 1979; Pfeffer *et al.*, 1985; Mill *et al.*, 2003; Bianchi *et al.*, 2006; Resende *et al.*, 2006; Giuberti *et al.*, 2007; Stefanon *et al.*, 2009), determina as alterações observadas nos parâmetros ponderais, como a hipertrofia do VD e congestão pulmonar (Pfeffer *et al.*, 1979; Pfeffer *et al.*, 1985). Assim, o aumento na PDFVE observado, indiretamente indica o acúmulo de sangue na câmara cardíaca que de forma retrógrada atinge o pulmão, resultando em um processo de remodelamento pulmonar. Este fato impõe ao VD a necessidade de aumentar a força contrátil para manter o débito sanguíneo pulmonar adequado, desencadeando então a hipertrofia ventricular direita (Jasmin *et al.*, 2003; Jasmin *et al.*, 2004).

Essa relação descrita anteriormente pode ser evidenciada nos nossos resultados através das correlações significativas obtidas entre as razões do peso do pulmão/PC e VD/PC com a PDFVE, similar as descrições feitas anteriormente (Pfeffer *et al.*, 1979; Pfeffer *et al.*, 1985). De forma interessante,

a variação do PC durante os sete dias foi a variável que melhor se correlacionou com a PDFVE, sendo mais acentuada a perda de peso quando maior for a PDFVE. Essas associações também foram observadas quando os parâmetros ponderais foram relacionados com a AI, exceto em relação à hipertrofia de VD. Isso mostra que essas duas variáveis, a PDFVE e a AI, se associam às alterações nos parâmetros ponderais, sendo de forma conjunta ou independentes.

De acordo com Pfeffer et al. (1979), existe associação positiva entre a AI e a PDFVE, mostrando que incrementos na AI determinam aumento da PDFVE. Nossos resultados corroboram com essa idéia mostrando que essa correlação é significativa, porém, com baixo grau de determinação (aproximadamente 15%) Isso pelo fato de existir uma grande variação da PDFVE em relação a AI. Segundo Pereira et al. (2005), animais com a mesma AI podem ou não desenvolver IC trinta dias após o IM. Arêas (2009), descreveu que isso ocorre já com sete dias após o IM. Nossos dados mostram que apenas 15 % das variações da PDFVE são determinadas por variações na AI. Baseado nisso, os animais infartados foram divididos em dois grupos: aqueles que desenvolveram IC e aqueles que não desenvolveram. Alguns autores caracterizam a IC através do uso de dois desvios padrão acima da média do grupo SHAM (Anversa et al., 1985). Apesar de julgar coerente o uso de dois desvios padrão para caracterizar a IC, acreditamos que quando utilizamos os valores de animais não infartados (SHAM), esse valor ficaria subestimado. Ao contrário, o uso de dois desvios padrão em relação à média do grupo INF, o valor ficaria superestimado devido a enorme variação existente na PDFVE em animais infartados (ponto de corte acima de 19 mmHg para caracterização dos nossos

animais). Então, a subdivisão foi realizada utilizando o limite superior do intervalo de confiança de 95% em relação a média da PDFVE nos animais infartados como ponto de corte para a caracterização da IC nesses animais. Desta forma, reavaliamos os dados levando em consideração essa subdivisão no grupo infartado. Surpreendentemente, com a subdivisão, a AI foi similar nos dois grupos mesmo diante de diferenças na PDFVE entre os grupos, semelhante aos resultados encontrados por Pereira et al. (2005), Fernandes (2006), Moura (2007), Arêas (2009). A variação do PC foi maior no grupo que desenvolveu IC, assim como a razão VD/PC e pulmão/PC. Isso corrobora ainda mais com a idéia que as variações da PDFVE sugerem o desenvolvimento da hipertrofia do VD e da congestão pulmonar como proposto (Jasmin et al., 2003; Jasmin et al., 2004). Com o objetivo de identificar animais com IC através de variáveis de fácil aquisição e sem que necessitasse sacrificar o animal, a variação do PC apresentou alta sensibilidade e especificidade para detecção da IC de acordo com o ponto de corte pré-estabelecido para a PDFVE. Esse achado é de extrema importância para o desenvolvimento dos próximos estudos no laboratório, visto ser facilmente adquirida e permitir subdividir os grupos ainda em vida.

Resultados como a redução na PAS e na PSVE, e nas $dP/dt +$ e $dP/dt -$ foram observados no grupo IC. Esses resultados acordam com o encontrado na literatura, em que ratos com IC após sete dias do IM apresentam aumento na PDFVE, seguido de redução das $dP/dt+$ e $dP/dt-$ do VE (Jasmin et al., 2004; Fracarollo et al. 2008, Kashina et al. 2008).

Essas diferenças encontradas no presente estudo confirmam os dados descritos por Arêas (2009), mostrando que sete dias após o IM já é possível

segmentar subgrupos funcionalmente diferentes mas que apresentam a mesma AI. Além disso, confirma a descrição para a fase crônica do infarto feita por Pereira et al. (2005). Isso reforça a idéia de que a IC pode ser determinada por fatores que sejam independentes de alterações na AI e que não tenham interferência direta nessa variável. Além disso, esses fatores têm relação direta com a fase aguda do IM, já que a IC pode ser detectada precocemente aos sete dias.

Alguns fatores podem auxiliar na explicação para esses efeitos. Um importante mecanismo de desenvolvimento precoce da IC é a reação inflamatória. Como foi exposto anteriormente, animais infartados com superexpressão de TNF- α ou IL-6 apresentam maiores efeitos deletérios do processo de remodelamento ventricular (Ono et al., 1998; Deten et al., 2002; Frangogiannis et al., 2005; Frantz et al., 2009). Níveis elevados de TNF- α estão relacionados com a hipertrofia cardíaca (Yokoyama et al., 1997), dilatação (Kubota et al., 1997; Bryant et al., 1998) e fibrose intersticial (Sivasubramanian et al., 2001). Além disso, tem sido descrito que a apoptose na área remanescente ao infarto determina a progressão para a IC em animais e humanos induzindo dilatação ventricular (Narula et al., 1996; Olivetti et al., 1997; Palojoki et al., 2001).

5.3 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO VASCULAR NO LEITO ARTERIAL CAUDAL

Após evidenciar diferenças importantes em relação a função cardíaca e parâmetros ponderais entre animais que desenvolveram IC e os que não desenvolveram, nós avaliamos se alterações na função vascular já estariam presentes nestes animais. Para avaliar a função vascular após subdivisão dos animais INF, inicialmente descrito neste trabalho, foram realizados protocolos experimentais de reatividade vascular no leito arterial caudal de ratas Wistar, sete dias após a indução do IM.

Na curva dose-resposta à FE, os animais que desenvolveram IC apresentaram reatividade vascular expressivamente reduzida quando comparados aos demais grupos. Estes resultados também foram demonstrados previamente onde os animais classificados como tendo IC, trinta dias após o infarto, obtiveram uma redução na reatividade vascular à FE quando comparado ao grupo SHAM, em leito caudal de ratos (Pereira et al., 2005). Isto mostra que apesar do processo de remodelamento cardíaco não estar completo aos sete dias, já existe alterações vasculares semelhantes às descritas na fase crônica do IM. Este fato sugere que as alterações vasculares no grupo com IC estão, pelo menos em parte vinculadas a função cardíaca e não às alterações de remodelamento cardíaco propriamente dito. Isso pôde ser confirmado através da análise de correlação entre a $R_{\text{máx}}$ à FE e a PDFVE, mostrando forte correlação negativa entre essas duas variáveis. O aumento da liberação basal de NO observado no grupo com IC, pode justificar essa menor reatividade vascular a FE que não ocorreu nos outros grupos estudados.

Por outro lado, neste mesmo trabalho realizado por Pereira et al. (2005), foi observado aumento na reatividade vascular à FE no grupo que não desenvolveu IC, porém esta situação não foi observado sete dias após o IM, realizado no presente estudo. Uma possível explicação para este fato é que as alterações do remodelamento ainda não foram completadas aos sete dias após o IM, sugerindo que as alterações no grupo INF, com função cardíaca preservada, seja em parte dependentes do processo de remodelamento ventricular. Como foi descrito anteriormente, a PDFVE no grupo INF foi similar aos grupos não infartados. Além disso, a AI se correlacionou com a R_{máx} a FE, o que pode determinar alterações da função endotelial ao longo do processo de remodelamento cardíaco, independente do aumento na PDFVE. Trabalhos relatam aumento na resposta vasoconstrictora a FE após IM em leito arterial caudal de ratos três dias após o IM (Sartório et al., 2003), em anéis isolados de aorta (Teerlink et al., 1994) de ratos sete dias após indução do IM, porém nenhum deles foi realizado com a subdivisão funcional dos grupos.

Em modelo experimental de IM, a função endotelial também pode ser avaliada através da resposta vasodilatadora dependente do endotélio vascular, induzida por ACh e através da resposta vasodilatadora independentemente do endotélio vascular induzida pelo NPS. Em nossos resultados, nenhum grupo apresentou alterações na vasodilatação ao NPS. Isso mostra que na presença do doador direto de NO, o músculo liso vascular apresentou a mesma capacidade de relaxamento nos quatro grupos estudados, sugerindo integridade funcional do músculo liso vascular. Porém, na resposta vasodilatadora dependente do endotélio vascular, o relaxamento observado no grupo infartado com função normal foi semelhante ao grupo SHAM, mas significativamente reduzido

quando comparado aos grupos CT e INF-IC. Estes dados corroboram com estudos prévios em que a resposta vasodilatadora a ACh foi reduzida no terceiro e trigésimo dia após infarto em artéria caudal de ratos (Sartório 2003; Pereira 2005) e em anéis de aorta de ratos (Schaffer et al., 2004; Sartório et al., 2007). É importante ressaltar que os trabalhos anteriores que estudaram a reatividade vascular em animais após o IM não subdividiram os animais pela função cardíaca. Como já foi apresentado anteriormente neste trabalho, existem diferenças importantes entre esses dois grupos e que, quando analisados em conjunto, podem gerar conclusões equivocadas.

O prejuízo do relaxamento induzido por ACh presente no grupo SHAM e ausente no grupo CT sete dias após a indução do IM pode ser explicado pela influência do processo inflamatório induzido pelo procedimento cirúrgico e invasivo, sem ter relação com a perda de tecido miocárdico, já que no grupo SHAM não há oclusão da artéria coronária. Por outro lado, o grupo com IC não apresentou este prejuízo mesmo tendo sido exposto às mesmas condições, mostrando que este grupo tem resposta aumentada à ACh. Corroborando com isso, o grupo que desenvolveu IC apresentou aumento significativo da liberação basal do NO quando comparado aos demais grupos, superando os níveis liberados pelo grupo CT. Essa resposta foi observada por Pereira et al. (2005) encontrando uma maior produção de NO nos animais insuficientes trinta dias após indução do IM.

Ainda, o aumento da liberação basal de NO pelo grupo insuficiente pode justificar o relaxamento dependente do endotélio nesse grupo semelhante ao grupo CT, ou seja, esse aumento na resposta vasodilatadora pode ser devido a

maior produção ou biodisponibilidade de NO presente nesses animais, o que reflete na menor reatividade vascular à FE apresentada pelo grupo INF-IC.

Com a avaliação da modulação endotelial, após a retirada do endotélio vascular, foi observada similaridade entre os grupos SHAM e CT, porém os grupos INF e INF-IC apresentaram redução semelhante da modulação endotelial. Estes dados indicam um prejuízo no endotélio vascular dos animais INF, já que após a sua retirada a dependência do mesmo mostrou-se reduzida. Em relação ao grupo INF-IC após a retirada do endotélio, a resposta foi similar ao grupo INF, evidenciando a importante participação do endotélio na resposta constritora reduzida neste grupo.

Como um dos principais objetivos desse estudo foi caracterizar o animal com IC precocemente, é possível que parte da discrepância entre os resultados do presente estudo e os disponíveis na literatura sejam devido a não subdivisão em animais com e sem IC. Além disso, como há grande variação no leito vascular estudado, tempo após o procedimento cirúrgico e a espécie dos animais de experimentação, é plausível encontrar dados que se opõem aos citados acima.

Em conclusão, os resultados do presente estudo mostram que sete dias após o IM já é possível identificar animais com dicotomia de respostas hemodinâmicas e vasculares, mesmo com AI semelhantes.

Considerando os resultados deste trabalho, pode-se sugerir que os futuros estudos realizados neste modelo experimental de IM devam considerar a dicotomia funcional cardíaca e vascular apresentada pelos animais que apresentem a mesma AI. A não observância desta dicotomia funcional entre

animais infartados pode dificultar as análises e interpretações dos resultados obtidos neste modelo experimental de IC.

6 CONCLUSÕES

Conclui-se com o presente trabalho que sete dias após o IM:

- é possível caracterizar subgrupos de animais com a mesma área de infarto, que apresentam ou não IC;
- os parâmetros ponderais e hemodinâmicos diferem significativamente entre os subgrupos infartados;
- os animais com IC apresentam reduzida resposta vasoconstrictora e resposta vasodilatadora aumentada, provavelmente pelo aumento da biodisponibilidade do NO.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbate A, Salloum FN, Vecile E, Das A, Hoke NN, Straino S, Biondi-Zoccai GGL, Houser JE, Qureshi IZ, Ownby ED, Gustini E, Biasucci LM, Severino A, Capogrossi MC, Vetrovec GW, Crea F, Baldi A, Kukreja RC, Dobrina A. Anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, inhibits apoptosis in experimental acute myocardial infarction. *Circulation* 2008; 117: 2670–2683.

American Heart Association. *Heart Disease and Stroke Statistics – 2007 Update*. Dallas, TX: American Heart Association; 2009.

Amione GT. Immune activation in chronic heart failure. *Am J Cardiol* 2005; 95: 3C–8C.

Anand SS, Islam S, Rosengren A, Franzosi MG, Steyn K, Afzal HY, Keltai M, Diaz R, Rangarajan S, Yusuf S. Risk factors for myocardial infarction in woman and men: insights from the INTERHEART study. *Eur Heart J* 2008; 29: 932–940.

Angus JA, Cocks TM. Endothelium-derived relaxing factor. *Pharmacol Ther* 1989; 41: 303–351.

Anversa P, Begui C, MacDonald SL, Levicky V, Kikkawa Y e Olivetti G. Morphometric of right ventricular hypertrophy induced by myocardial infarction in rats. *Am J Pathol* 1984; 116: 505-513.

Anversa P, Loud AV, Levicky V, Guideri G. Left ventricular failure induced by myocardial infarction. II. Tissue morphometry. *Am J Physiol* 1985; 248: H883-H889.

Arêas GPT. Desempenho contrátil do ventrículo direito 7 dias após infarto em ratos com e sem sinais de insuficiência cardíaca. Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, 2009.

Baicu CF, Stroud JD, Livesay VA, Hapke E, Holder J, Spinale FG, Zile MR. Changes in extracellular collagen matrix alter myocardial systolic performance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284: 122–132.

Baldi A, Abbate A, Bussani R, Patti G, Melfi R, Angelini A, Dobrina A, Rossiello R, Silvestri F, Baldi F, Di Sciascio G. Apoptosis and post-infarction left ventricular remodeling. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34: 165–174.

Bauersachs J, Widder JD. Endothelial dysfunction in heart failure. *Pharmac Rep* 2008; 60: 119–126.

Bax JJ, Marwick TH, Molhoek SG, Bleeker GB, van Erven L, Boersma E, Steendijk P, van der Wall EE, Schalij MJ. Left ventricular dyssynchrony predicts

benefit of cardiac resynchronization therapy in patients with end-stage heart failure before pacemaker implantation. *Am J Cardiol*. 2003; 92(10):1238–1240.

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1620–1624.

Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996; 271: 1424–1437.

Berthonneche C, Sulpice T, Boucher F, Gouraud L, de Leiris J, O'Connor SE, Hebert JM, Janiak P. New insights into the pathological role of TNF- α in early cardiac dysfunction and subsequent heart failure after infarction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287: 340–350.

Bianchi RC, Gumz BP, Giuberti K, Stefanon I. Myocardial infarction reactivity to phenylephrine in isolated aortic rings of ovariectomized rats. *Life Sciences* 2006; 78: 875–811.

Bozkurt B, Kribbs SB, Clubb FJ, Michael LH, Didenko VV, Hornsby PJ, Seta Y, Oral H, Spinale FG, Mann DL. Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor- α promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats. *Circulation* 1998; 97: 1382–1391.

Bryant D, Becker L, Richardson J, Shelton J, Franco F, Peshock R, Thompson M, Giroir B. Cardiac failure in transgenic mice with myocardial expression of tumor necrosis factor- α . *Circulation* 1998; 97: 1375– 1381.

Buja LM. Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Pathol* 2005; 14: 170–175.

Bujak M, Frangogiannis NG. The role of TGF- β signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res* 2007; 74: 184–95.

Busatto VC, Cicilini MA, Mill JG. Increased angiotensin-converting enzyme activity in the left ventricle after infarction. *Braz J Med Biol Res* 1997; 30: 679–687.

Busse R, Fleming I, Hecker M. Control of nitric oxide and prostacyclin syntheses in endothelial cells. *Arzneimittelforschung*. 1994; 44: 392–396.

Campbell DJ, Habener JF. Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. *J Clin Invest* 1986; 78: 31–39.

Carr A, Frei B. The role of natural antioxidants in preserving the biological activity of endothelium-derived nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 2000; 1806–1814.

Chen D, Assad-Kottner C, Orrego C, Torre-Amione G. Cytokines and acute heart failure. *Crit Care Med* 2008; 36: S9–S16.

Chung MK, Gulick TS, Rotondo RE, Schreiner GF, Lange LG. Mechanism of cytokine inhibition of β -adrenergic agonist stimulation of cyclic AMP in rat cardiac myocytes: impairment of signal transduction. *Circ Res* 1990; 67: 753–763.

Cigola E, Kajstura J, Li B, Meggs LG, Anversa P. Angiotensin II activates programmed myocyte cell death in vitro. *Exp Cell Res* 1997; 231: 363–371.

Cleland JGF, Torabi A, Khan NK. Epidemiology and management of heart failure and left ventricular systolic dysfunction in the aftermath of a myocardial infarction. *Heart* 2005; 91: ii7-ii13.

Cleutjens JPM, Verluyten MJA, Smits JFM, Daemen MJAP. Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *Am J Pathol* 1995; 147: 325–338.

Crow MT, Mani K, Nam YI, Kitsis RN. The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res* 2004; 95: 957-970.

Csanyi G, Bauer M, Dietl W, Lomnicka M, Stepuro T, Podesser BK, Chlopicki S. Functional alterations in NO, PGI₂ and EDHF pathways in the aortic

endothelium after myocardial infarction in rats. *Eur J Heart Fail* 2006; 8: 769-776.

Darley-Usmar V, Wiseman H, Halliwell B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett* 1995; 369: 131–135.

DATASUS (2007) Morbidade e mortalidade hospitalar do SUS. Ministério da Saúde – Sistema de informações hospitalares (SIH/SUS). www.datasus.com.br, acessado em setembro de 2009.

Deten A, Volz HC, Briest W, Zimmer HG. Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. Experimental studies in rats. *Cardiovasc Res* 2002; 55: 329–340.

Dobaczewski M, Bujak M, Zymek P, Ren G, Entman ML, Frangogiannis NG. Extracellular matrix remodeling in canine and mouse myocardial infarcts. *Cell Tissue Res* 2006; 324: 475–488.

Drexler H, Hayoz D, Munzel T, Horning B, Just H, Brunner HR, Zelis R. Endothelial function in chronic congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1992; 69: 1596–1601.

Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47–95.

Ducharme A, Frantz S, Aikawa M, Rabkin E, Lindsey M, Rohde LE, Schoen FJ, Kelly RA, Werb Z, Libby P, Lee RT. Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. *J Clin Invest* 2000 ;106 :55-62.

Eaton LW, Bulkley BH. Expansion of acute myocardial infarction: it's relationship to infarct morphology in a canine model. *Circ Res* 1981; 49: 80-88.

Ertl G, Frantz S. Healing after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2005; 66: 22-32.

Fernandes AA. Diferença na contratilidade de ventrículo direito e esquerdo de ratos com e sem insuficiência cardíaca após infarto do miocárdio. Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, 2006.

Fishbein MC, Maclean MB, Maroko PR. Experimental myocardial infarction in the rat. Qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *Am J Pathol* 1978; 90: 57–70.

Fletcher PJ, Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Left ventricular diastolic pressure-volume relations in rats with healed myocardial infarction. Effects on systolic function. *Circ Res* 1981; 49: 618–626.

Forstemann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning and functions. *Hypertension* 1994; 23: 1121–1131.

Forstemann U, Nakane M, Tracey WR, Pollock JS. Isoforms of nitric oxide synthase: functions in the cardiovascular system. *Eu Heart J* 1993; 14: 10–15.

Förstermann U, Münzel T. Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease: From Marvel to Menace. *Circulation* 2006; 113: 1708–1714.

Fraccarollo D, Galuppo P, Schraut S, Kneitz S, van Rooijen N, Ertl G, Bauersachs J. Immediate mineralocorticoid receptor blockade improves myocardial infarct healing by modulation of the inflammatory response. *Hypertension* 2008; 51: 905–914.

França AS, Rossoni LV, Amaral SM, Vassallo DV. Reactivity of the isolated perfused rat tail vascular bed. *Braz J Med Biol Res* 1997; 30: 891–895.

Frantz S, Bauersachs J, Ertl G. Post-infarct remodelling: contribution of wound healing and inflammation. *Cardiovasc Res* 2009; 81: 474-481.

Freedman JE, Sauter R, Barttinelli EM, Ault K, Knowles C, Huang PL, Loscalzo. Deficient platelet-derived nitric oxide and enhanced hemostasis in mice lacking the NOSIII gene. *Circ Res* 1999; 84: 1416–1421.

Furchgott R, Zawadzki JVB. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373–376.

Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic, guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989; 83: 1774–1777.

Giuberti K, Pereira RB, Bianchi PR, Paigel AS, Vassallo DV, Stefanon I. Influence of Ovariectomy in the Right Ventricular Contractility in Heart Failure Rats. *Arch Med Res* 2007; 38: 170–175.

Griendling KK e Alexander RW. Oxidative stress and cardiovascular disease. *Circulation* 1997; 96: 3264–3275.

Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activation in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994; 74: 1141–1148.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000; 86: 494–501.

Gurantz D, Cowling RT, Varki N, Frikovsky E, Moore CD, Greenberg BH. IL-1 β and TNF- α upregulate angiotensin II type 1 (AT1) receptors on cardiac

fibroblasts and are associated with increased AT1 density in the post-MI heart. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 38: 505–515.

Hamid T, Gu Y, Ortines RV, Bhattacharya C, Wang G, Xuan YT, Prabhu SD. Divergent tumor necrosis factor receptor-related remodeling responses in heart failure. Role of nuclear factor- κ B and inflammatory activation. *Circulation* 2009; 119: 1386–1397.

Hellermann JP, Jacobsen SJ, Redfield MM, Reeder GS, Weston SA, Roger VL. Heart failure after myocardial infarction: clinical presentation and survival. *Eur J Heart Fail* 2005; 7: 119–125.

Hochman JS, Bulkley BH. Expansion of acute myocardial infarction: an experimental study. *Circulation* 1982; 65: 1446-1450.

Hornig B, Arakawa N, Kohler C, Drexler H. Vitamin C improves endothelial function of conduit arteries in patients with chronic heart failure. *Circulation* 1998; 97: 363–368.

Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 1995; 377: 239–242.

Ignarro LJ, Kadowitz PJ. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1985; 25: 171–191.

Iida S, Chu Y, Francis J, Weiss RM, Gunnett CA, Faraci FM, Heistad DD. Gene transfer of extracellular superoxide dismutase improves endothelial function in rats with heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: H525–H532.

Jasmin JF, Calderone A, Leung TK, Villeneuve L, Dupuis J. Lung structural remodeling and pulmonary hypertension after myocardial infarction: complete reversal with irbesartan. *Cardiovasc Res* 2003; 58: 621–631.

Jasmin JF, Mercier I, Hnasko R, Cheung MWC, Tanowitz HB, Dupuis J, Lisanti MP. Lung remodeling and pulmonary hypertension after myocardial infarction: pathogenic role of reduced caveolin expression. *Cardiovasc Res* 2004; 63: 747–755.

Jiang L, Huang Y, Hunyor S, dos Remedios CG. Cardiomyocyte apoptosis is associated with increased wall stress in chronic failing left ventricle. *Eur Heart J* 2003; 24: 742–751.

Johns TNP, Olson BJ. Experimental myocardial infarction. Method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg* 1954; 140 (5): 675–682.

Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Clark WA, Sonnenblick EH, Krajewski S, Reed JC, Olivetti G, Anversa P. Apoptotic and necrotic myocytes cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest* 1996; 74: 86–107.

Kaschina E, Grzesiak A, Li J, Foryst-Ludwig A, Timm M, Rompe F, Sommerfeld M, Kemnitz R, Curato C, Namsolleck P, Tschöpe C, Hallberg A, Alterman M, Hucko T, Paetsch I, Dietrich T, Schnackenburg B, Graf K, Dahlof B, Kintscher U, Unger T, Stecklings UM. Angiotensin II type 2 receptor stimulation. A novel option of therapeutic interference with the renin-angiotensin system in myocardial infarction? *Circulation* 2008; 118: 2523-2532.

Katz SD, Biasucci L, Sabba C, Strom JA, Jondeau G, Galvao M, Solomon S, Nikolic SD, Forman R, Lejemtel TH. Impaired endothelium-mediated vasodilation in the peripheral vasculature of patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1992; 19: 918–925.

Katz SD, Hryniewicz K, Hriljac I, Balidemaj K, Dimayuga C, Hudaihed A, Yasskiy A. Vascular endothelial dysfunction and mortality risk in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2005; 111: 310–314.

Kesteloot H, Sans S, Kromhout D. Evolution of all-causes and cardiovascular mortality in the age-group 75-84 years in Europe during the period 1970-1996; a comparison with worldwide changes. *Eur Heart J* 2002; 23: 384–398.

Kifor I, Dzau VJ. Endothelial renin-angiotensin pathway: evidence for intracellular synthesis and secretion of angiotensins. *Circ Res*. 1987; 60: 422–428.

Klosinska M, Rudzinski T, Grzelak P, Stefanczyk L, Drozd J, Krzeminska-Pakula M. Endothelium-dependent and –independent vasodilation is more attenuated in ischaemic than in non-ischaemic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2009; 11: 765–770.

Kohno T, Anzai T, Naito K, Miyasho T, Okamoto M, Yokota H, Yamada S, Maekawa Y, Takahashi T, Yoshikawa T, Ishizaka A, Ogawa S. Role of high-mobility group box 1 protein in post-infarction healing process and left ventricular remodeling. *Cardiovasc Res* 2009; 81: 565-573.

Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric Oxide: An endogenous modulator of leucocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 4651–4655.

Kubota T, McTiernan CF, Frye CS, Slawson SE, Koretsky AP, Demetris AJ, Feldman AM. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac specific overexpression of tumor necrosis factor- α . *Circ Res* 1997; 81: 627–635.

Lanas F, Avezum A, Bautista LE, Diaz R, Luna M, Islam S, Yusuf S, for the INTERHEART Investigators in Latin America. Risk factors for acute myocardial infarction in Latin America. The INTERHEART Latin American Study. *Circulation* 2007; 115: 1067–1074.

Lefer DJ, Jones SP, Girod WG, Baines A, Grisham MB, Cockrell AS, Huang PL, Scalia R. Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice. *Am J Physiol* 1999; 276: H1943–H1950.

Lijnen P, Petrov V. Renin-angiotensin system, hypertrophy and gene expression in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: 949–970.

Liu Y, Leri A, Li B, Wang X, Cheng W, Kajstura J, Anversa P. Angiotensin II stimulation in vitro induces hypertrophy of normal and postinfarcted ventricular myocytes. *Circ Res* 1998; 82: 1145–1159.

Mann DL. Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. *Circ Res* 2002; 91:988–998.

Mill JG, Milanez MC, Resende MM, Gomes MGS, Leite CM. Spironolactone prevents cardiac collagen proliferation after myocardial infarction in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003; 30: 739-744.

Mill JG, Stefanon I, Leite CM; Vassalo DV. Changes in performance of the surviving myocardium after left ventricular infarction in rats. *Cardiovasc Res* 1990; 24: 748–753.

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol rev* 1991; 43: 109–142.

Monden Y, Kubota T, Inoue T, Tsutsumi T, Kawano S, Ide T, Tsutsui H, Sunagawa K.. Tumor necrosis factor-alpha is toxic via receptor 1 and protective via receptor 2 in a murine model of myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293: H743–753.

Moro C, Jouan MG, Rakotovo A, Toufektsian MC, Ormezzano O, Nagy N, Tosaki A, de Leiris J, Boucher F. Delayed expression of cardiac cytokines after reperfused myocardial infarction: possible trigger for cardiac dysfunction and ventricular remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293: H3014–H3019.

Moura VGC. Função direita de corações isolados de ratos com e sem sinais de insuficiência cardíaca oito semanas após infarto agudo do miocárdio. Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, 2007.

Munzel T, et al. Flow-mediated arteriolar dilation is abnormal in congestive heart failure. *Circulation*. 1993; 87: VII 92–VII96.

Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006 69: 562–573

Najafi F, Jamrozik K, Dobson AJ. Understanding the 'epidemic of heart failure': a systematic review of trends in determinants of heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2009; 5: 472–479.

Nakata S, Tsutsui M, Shimokawa H, Suda O, Morishita T, Shibata K, Yatera Y, Sabanai K, Tanimoto A, Nagasaki M, Tasaki H, Sasaguri Y, Nakashima Y, Otsuji Y, Yanagihara N. Spontaneous myocardial infarction in mice lacking all nitric oxide synthase isoforms. *Circulation* 2008; 117:2211–2223.

Narula J, Haider N, Virmani R, Sisalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, Schimidt U, Semigran MJ, Dec GW, Khaw B. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med* 1996; 335: 1182–1189.

Okamura T, Aimi Y, Kimura H, Murakami K, Toda N. Existence of renin in the endothelium of human artery. *J Hypertens* 1992; 10: 49–53.

Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* 1997; 336: 1131–1141.

Ono K, Matsumori A, Shioi T, Furukawa Y, Sasayama S. Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: possible implication in left ventricular remodeling. *Circulation* 1998; 98: 149–156.

Palmer RM e Moncada S. Biosynthesis and actions of nitric oxide. *Semin Perinatol* 1991; 15: 16–19.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release account for the biological activity of endothelium - derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524–526.

Palojoki E, Saraste A, Eriksson A, Pulkki K, Kallajoki M, Voipio-Pulkki LM, Tikkanen I. Cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: 2726–2731.

Pereira RB, Sartório CL, Vassallo DV, Stefanon S. Differences in tail vascular bed reactivity in rats with and without heart failure following myocardial infarction. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 312: 1321–1325.

Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 1990; 81: 1161–1172.

Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, Braunwald E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 1979; 44: 503- 512.

Pfeffer MA, Pfeffer JM, Steinberg C, Finn P. Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. *Circulation* 1985; 72 (2): 406–412.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Modulation of platelet aggregation by an L-arginine-nitric oxide pathway. *Trends Pharmacol Sci* 1991; 12:87–88.

Rakugi H, Jacob HJ, Krieger JE, Ingelfinger JR, Pratt RE. Vascular injury induces angiotensinogen gene expression in the media and neointima. *Circulation* 1993; 87: 283–290.

Rapoport RM, Murod F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in the aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res* 1983; 52: 353–357.

Resende MM, Kauser K, Mill JG. Regulation of cardiac and renal mineralocorticoid receptor expression by captopril following myocardial infarction in rats. *Life Sci* 2006; 78: 3066–3073.

Rey FE e Pagano PJ. The reactive adventitia: fibroblast oxidase in vascular function. *Arterioscler Tromb Vasc Biol* 2002; 22: 1962: 1971.

Rosamond W, Flegal K, Friday G, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Ho M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lloyd-Jones D, McDermott M, Meigs J, Moy C, Nichol G, O'Donnell CJ, Roger V, Rumsfeld J, Sorlie P, Steinberger J, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Hong Y. Heart disease and stroke statistics – 2007 update. A report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2007; 115: e69–e171.

Rosenkranz S, Flesch M, Amann K, Haeuseler C, Kilter H, Seeland U, Schluter KD, Bohm M. Alterations of beta-adrenergic signaling and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing TGF-beta 1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283: 1253-1262.

Sartório CL, Fraccarollo D, Galuppo P, Leutke M, Ertl G, Stefanon I, Bauersachs J. Mineralocorticoid receptor blockade improves vasomotor dysfunction and vascular oxidative stress early after myocardial infarction. *Hypertension* 2007; 50: 919–925.

Sartório CL, Pinto VD, Cutini GJS, Vassallo DV, Stefanon I. Effects of inducible nitric oxide synthase inhibition on the rat tail vascular bed reactivity three days after myocardium infarction. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; 45: 321–326.

Schäfer A, Fraccarollo D, Tas P, Schmidt I, Ertl G, Bauersachs J. Endothelial dysfunction in congestive heart failure: ACE inhibition vs. angiotensin II antagonism. *Eur J Heart Fail* 2004; 6: 151-159.

Schwarz K, Simoni G, Yu X, Wiedemann S, Strasser RH. Apoptosis at a distance: remote activation of caspase-3 occurs early after myocardial infarction. *Mol Cell Biochem* 2006; 281:45–54.

Shechter M, Matetzky S, Arad M, Feinberg MS, Freimark D. Vascular endothelial function predicts mortality risk in patients with advanced ischaemic chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2009; 11: 588–593.

Silvestre JS, Heymes C, Oubénaissa A, Robert V, Aupetit-Faisant B, Carayon A, Swynghedauw B, Delcayre C. Activation of cardiac aldosterone production in rat myocardial infarction. Effect of angiotensin II receptor blockade and role in cardiac fibrosis. *Circulation* 1999; 99: 2694–2701.

Sivasubramanian N, Cocker ML, Kurrelmeyer KM, McLellan WR, DeMayo FJ, Spinale FG, Mann DL. Left ventricular remodeling in transgenic mice with cardiac restricted overexpression of tumor necrosis factor. *Circulation* 2001; 104: 826–831.

Spencer FA, Lessard D, Gore JM, Yarzebski J, Goldberg RJ. Declining length of hospital stay for acute myocardial infarction and post discharge outcomes. A community-wide perspective. *Arch Intern Med* 2004; 164: 733–740.

Spencer FA, Meyer TE, Gore JM, Goldberg RJ. Heterogeneity in the management and outcomes of patients with acute myocardial infarction complicated by heart failure: the National Register of Myocardial Infarction. *Circulation* 2002; 105: 2605–2610.

Spinale FG, Escobar GP, Hendrick JW, Clark LL, Camens SS, Mingoia JP, Squires CG, Stroud RE, Ikonomidis JS. Chronic matrix metalloproteinase

inhibition following myocardial infarction in mice: differential effects on short and long-term survival. *J Pharmacol Experim Ther* 2006; 318: 966–973.

Stefanon I, Auxiliadora-Martins M, Vassallo DV, Mill JG. Analysis of right and left ventricular performance of the rat heart with chronic myocardial infarction. *Braz J Med Biol Res* 1994; 27: 2667-2679

Stefanon I, Cade JR, Fernandes AA, Ribeiro Junior RF, Targueta GP, Mill JG, Vassallo DV. Ventricular performance and Na⁺-K⁺ ATPase activity are reduced early and late after myocardial infarction in rats. *Braz J Med Biol Res* 2009 ;42 : 902-911.

Sun Y, Zhang JQ, Zhang J Lamparter S. Cardiac remodeling by fibrous tissue after infarction in rats. *J Lab Clin Med* 2000; 135: 316–323.

Takemura G, Fujiwara H. Role of apoptosis in remodeling after myocardial infarction. *Pharmacol Ther* 2004; 1004: 1–16.

Taketa Y, Miyamori I, Yoneda T, Iki K, Hatakeyama H, Blair IA, Hsieh FY, Takeda R. Production of aldosterone in isolated rat blood vessels. *Hypertension* 1995; 25: 170–173.

Tan J, Hua Q, Li J, Fan Z. Prognostic value of interleukin-6 during a 3-year follow-up in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction. *Heart Vessels* 2009; 24: 329–334.

Tao ZY, Cavaasin MA, Yang F, Liu YH, Yang XP. Temporal changes in matrix metalloproteinase expression and inflammatory response associated with cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *Life Sciences* 2004; 74: 1561–1572.

van den Borne SW, Cleutjens JP, Hanemaaijer R, Creemers EE, Smits JF, Daemen MJ, Blankesteyn WM. Increased matrix metalloproteinase-8 and -9 activity in patients with infarct rupture after myocardial infarction. *Cardiovasc Pathol* 2009; 18: 37–43.

Veinot JP, Gattinger DA, Fliss H. Early apoptosis in human myocardial infarcts. *Hum Pathol* 1997; 28: 485-492.

Velagaleti RS, Pencina MJ, Murabito JM, Wang TJ, Parikh NI, D'Agostino RB, Levy D, Kannel WB, Vasan RS. Long-term trends in the incidence of heart failure after myocardial infarction. *Circulation* 2008; 118: 2057–2062.

Velazquez EJ, Francis GS, Armstrong PW, Aylward PE, Diaz R, O'Connor CM, White HD, Henis M, Rittenhouse LM, Kilaru R, van Gilst W, Ertl G, Maggioni AP, Spac J, Weaver WD, Rouleau JL, McMurray JJV, Pfeffer MA, Califf RM. An international perspective on heart failure and left ventricular systolic dysfunction

complicating myocardial infarction: the VALIANT registry. *Eur Heart J* 2004; 25: 1911–1919.

Weisman HF, Bush DE, Mannisi JA, Weisfeldt ML, Healy B. Cellular mechanisms of myocardial infarct expansion. *Circulation* 1988; 78: 186-201.

Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Murnford RA, Swiderek KM, Lee TD, Dining A, Troso T, Nathan C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 1992; 256: 225–228.

Xu X, Wan W, Powers AS, Li J, Ji LL, Lao S, Wilson B, Erikson JM, Zhang JQ. Effects of exercise training on cardiac function and myocardial remodeling in post myocardial infarction rats. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 44: 114–122.

Yan C, Kim D, Aizawa T, Berk BC. Functional interplay between angiotensin II and nitric oxide: cyclic GMP as a key mediator. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:26–36.

Yang F, Liu YH, Yang XP, Xu J, Kapke A, Carretero AO. Myocardial infarction and cardiac remodelling in mice. *Exp Physiol* 2002; 87.5: 547–555.

Yokoyama T, Nakano M, Bednarczyk JL, McIntyre BW, Entman M, Mann DL. Tumor necrosis factor- α provokes a hypertrophic growth response in adult cardiac myocytes. *Circulation* 1997; 95: 1247–1252.

Zhao W, Ahokas RA, Weber KT, Sun Y. ANG II-induced cardiac molecular and cellular events: role of aldosterone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 291:H336-H343.