

## Critérios Ecocardiográficos para Definição de Graus de Disfunção Ventricular em Ratos Portadores de Estenose Aórtica

### *Echocardiographic Criteria for the Definition of Ventricular Dysfunction Severity in Aortic Banded Rats*

Vanessa Oliveira Moreira, Ana Valéria Barros de Castro, Marcelle Yumi Yaegaschi, Antonio Carlos Cicogna, Marina Politi Okoshi, Camila Alves Pereira, Flávio Ferrari Aragon, Mário Batista Bruno, Carlos Roberto Padovani, Katashi Okoshi

Faculdade de Medicina de Botucatu e Instituto de Biociências de Botucatu – Unesp – Botucatu, SP

#### OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi identificar variáveis ecocardiográficas que definam graus de disfunção cardíaca em ratos com estenose aórtica (EAo).

#### MÉTODOS

Ratos Wistar ( $n = 23$ ), machos (90-100 g), foram submetidos a cirurgia para indução de EAo. As variáveis ecocardiográficas analisadas foram: diâmetros diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE) e sistólico do átrio esquerdo em valores absolutos e normalizados para o peso corporal; diâmetro sistólico do VE (DSVE); três índices de encurtamento do VE (% de encurtamento endocárdico, %Enc.Endo; % de encurtamento miocárdico, %Enc.Mio; e velocidade de encurtamento da parede posterior do VE, VEPP); e índice de massa do VE (IMVE). Essas variáveis foram utilizadas para a análise de agrupamento (“cluster analysis”).

#### RESULTADOS

A análise de agrupamento possibilitou separar os ratos com EAo em dois grupos: disfunção leve ( $n = 13$ ) e disfunção severa ( $n = 9$ ). Os intervalos de confiança das seguintes variáveis não apresentaram superposição dos seus valores: DDVE, DSVE, %Enc.Endo, %Enc.Mio, IMVE e VEPP.

#### CONCLUSÃO

A utilização conjunta dos intervalos de confiança dessas variáveis permite identificar dois grupos de ratos com estenose aórtica e diferentes graus de comprometimento cardíaco, possibilitando a realização de estudos longitudinais com grupos homogêneos de animais.

#### PALAVRAS-CHAVE

Ecocardiograma, estenose aórtica, disfunção ventricular, ratos, análise de agrupamento.

#### OBJECTIVE

The purpose of this study was to identify echocardiographic parameters that allow distinguishing different levels of cardiac dysfunction in aortic banded rats.

#### METHODS

Wistar male rats (90-100 g) were subjected to aortic banding ( $n=23$ ) or a sham operation ( $n=12$ ). The following echocardiographic parameters were evaluated and used to group rats into groups with similar characteristics using cluster analysis: absolute values and after normalization to body weight of left ventricular end-diastolic diameter (LVDD) and left atrial systolic diameter; left ventricular end-systolic diameter (LVSD); LV weight to body weight ratio (LVW/BW); three indexes of left ventricular shortening (endocardial fractional shortening, EFS; midwall FS, MFS; and posterior wall shortening velocity, (PWSV).

#### RESULTS

The cluster analysis could group aortic banded rats into two groups: mild ( $n=13$ ) and severe ( $n=9$ ) stage of heart failure. There was no overlapping among the values of the 95% confidence interval of the following parameters between the two groups: LVDD, LVSD, EFS, MFS, LVW/BW, and PWSV.

#### CONCLUSION

It is feasible to distinguish two groups of aortic banded rats according to the level of cardiac dysfunction using those echocardiographic parameters. This allows to perform longitudinal studies in homogeneous groups of rats with aortic banding and cardiac dysfunction.

#### KEY WORDS

Echocardiogram, aortic stenosis, ventricular dysfunction, rats, cluster analysis.

**Correspondência:** Katashi Okoshi • Travessa Cyro Targa, 115 - 18610-250 - Botucatu, SP  
E-mail: okoshi@cardiol.br

Recebido em 05/08/05 • Aceito em 11/11/05

Em modelos experimentais de agressão cardíaca, a dificuldade de estabelecer uma classificação *in vivo* do grau de disfunção ventricular tem restringido a realização de estudos longitudinais com o intuito de verificar o efeito de intervenções terapêuticas. A obtenção de grupos homogêneos de animais quanto ao grau de disfunção do coração é de fundamental importância, uma vez que efeitos benéficos ou maléficos de um tratamento podem ser observados de acordo com o comprometimento prévio da função ventricular.

Tradicionalmente, o diagnóstico de disfunção cardíaca em animais é baseado na medida da pressão diastólica do ventrículo esquerdo (VE), que requer cateterização ventricular incorrendo no risco de lesões de valvas cardíacas e conseqüente alteração do desempenho cardíaco<sup>1</sup>. Outros critérios para o diagnóstico de insuficiência cardíaca (IC) baseiam-se na presença de alterações clínicas e anatômicas, tais como taquipnéia, derrame pleural, ascite, trombo no átrio esquerdo e hipertrofia ventricular direita, sendo a maioria delas identificadas após o sacrifício do animal<sup>2-5</sup>.

O ecocardiograma é um importante exame auxiliar no diagnóstico clínico de IC, que permite avaliar: 1) morfologia e função do coração; 2) evolução da disfunção cardíaca causada por diferentes tipos de agressão<sup>6-8</sup>; 3) efeitos cardíacos de intervenções farmacológicas<sup>4</sup>.

Em pequenos animais, o ecocardiograma transtorácico é um dos métodos mais freqüentemente utilizados para avaliar a dimensão das estruturas cardíacas e o desempenho contrátil do VE<sup>4-10</sup>. Habitualmente, a identificação de disfunção ventricular é realizada comparando-se os índices de encurtamento muscular com aqueles obtidos no grupo controle.

Recentemente, Sjaastad e cols.<sup>1</sup> identificaram as variáveis mais importantes para o diagnóstico ecocardiográfico de IC em ratos infartados, utilizando o método estatístico de análise de agrupamento. Esse método foi utilizado também para determinar a evolução funcional cardíaca durante a remodelação induzida pela ligadura da artéria coronária<sup>2</sup>. Entretanto, não há relatos na literatura de estudos ecocardiográficos em modelos experimentais de estenose aórtica (EAo) que tenham focado os graus de disfunção ventricular. O modelo de EAo em ratos é largamente utilizado por induzir hipertrofia ventricular gradual evoluindo para disfunção ventricular. Nesse modelo, um clipe é colocado na aorta ascendente e a estenose se desenvolve de maneira proporcional ao crescimento corporal do animal.

Postulamos a hipótese de que a análise de agrupamento também permitirá identificar critérios que possam distinguir os diferentes graus de disfunção cardíaca a partir do momento de aparecimento de taquipnéia, em um modelo de sobrecarga pressórica induzida por clampamento da raiz da aorta que, habitualmente, evolui com hipertrofia do VE e IC progressiva<sup>11,12</sup>.

O objetivo deste estudo foi, portanto, identificar as

variáveis ecocardiográficas que definam os graus de disfunção ventricular na fase de hipertrofia compensada à descompensação, em ratos portadores de EAo. A identificação dessas variáveis permitirá estabelecer os estágios da remodelação cardíaca induzida pela sobrecarga pressórica e avaliar os efeitos cardíacos de intervenções farmacológicas em diferentes momentos do processo progressivo da disfunção cardíaca.

## MÉTODOS

*Animais e protocolo experimental* - Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp.

Neste estudo, foram utilizados ratos Wistar, machos, com peso corporal de 90 a 100 g, provenientes do Biotério Central – Unesp, Botucatu. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, à temperatura de 23°C e com ciclos de luminosidade de doze horas. Os animais foram alimentados durante todo o período experimental com ração Labina® e água *ad libitum*. Foram utilizados 35 animais, sendo doze controles e 23 com EAo.

*Indução de insuficiência cardíaca pela estenose aórtica* - A estenose aórtica foi induzida de acordo com o método previamente descrito em nosso laboratório<sup>5,13,14</sup>. Em resumo, os animais foram submetidos a tricotomia e toracotomia mediana, após anestesia com cloridrato de cetamina (50 mg/kg intraperitoneal) e cloridrato de xilidino (10 mg/kg intraperitoneal). A seguir, a aorta ascendente foi dissecada e um clipe de prata, com 0,6 mm de diâmetro interno, foi colocado a aproximadamente 3 mm de sua raiz. Durante a cirurgia, os ratos receberam ventilação manual com pressão positiva e 1 ml de soro fisiológico aquecido, intraperitonealmente. Os animais controle foram submetidos à mesma cirurgia, porém sem a colocação do clipe.

Após dezenove semanas da indução de EAo, os animais foram observados diariamente para a detecção de taquipnéia, que é um sinal de disfunção cardíaca.

*Estudo ecocardiográfico* - O ecocardiograma foi realizado após a detecção de taquipnéia, que é observada geralmente após 28 semanas de EAo.

Os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50 mg/kg) e cloridrato de xilidino (1 mg/kg), administrados por via intraperitoneal. Após tricotomia da região anterior do tórax, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo e o exame foi realizado com o equipamento modelo Sonos 2000 da Hewlett-Packard Co., equipado com transdutor eletrônico de 7,5 MHz. Para medir as estruturas do coração foram obtidas imagens em modo monodimensional (modo-M), orientado pelas imagens em modo bidimensional, estando o transdutor em posição paraesternal eixo menor.

A avaliação do VE foi realizada posicionando o cursor

do modo-M logo abaixo do plano da valva mitral no nível dos músculos papilares<sup>15-17</sup>. A imagem do átrio esquerdo foi obtida posicionando o cursor do modo-M no nível do plano da valva aórtica. As imagens obtidas em modo-M foram registradas em impressora modelo UP-890 da Sony Co.

Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas, manualmente, com o auxílio de um paquímetro de precisão. As seguintes estruturas cardíacas foram medidas: diâmetros diastólico e sistólico do VE (DDVE e DSVE, respectivamente), diâmetro do átrio esquerdo (AE) e espessura diastólica do septo interventricular (EDSIV) e da parede posterior do VE (EDPP).

Os valores de DDVE e AE foram normalizados para o peso corporal. A função sistólica do VE foi avaliada pela porcentagem de encurtamento endocárdico, %Enc. Endo  $[(DDVE - DSVE) / DDVE \times 100]$ , porcentagem de encurtamento miocárdico, %Enc. Mio, que é a variação entre os valores diastólico e sistólico da fórmula  $[(\text{diâmetro VE} + \frac{1}{2} \text{ espessura do septo interventricular} + \frac{1}{2} \text{ espessura da parede posterior}) \times 100]$  e a velocidade de encurtamento da parede posterior do VE, VEPP (tangente máxima do movimento sistólico da parede posterior).

A massa do VE (MVE) foi calculada segundo a fórmula<sup>7,15</sup>:  $[(DDVE + EDSIV + EDPP)^3 - DDVE^3] \times 1,04$ ; no qual o valor 1,04 indica a densidade específica do miocárdio. O índice de MVE (IMVE) foi calculado normalizando a MVE para o peso corporal.

*Análise de agrupamento em estágios de disfunção cardíaca* - Considerando isoladamente as variáveis ecocardiográficas de 23 animais portadores de EAo, utilizou-se a técnica de análise de agrupamento ("cluster analysis") para se estabelecer grupos de similaridade quanto à gravidade da doença. Utilizamos as variáveis ecocardiográficas cujos valores aumentam progressivamente com o avançar da doença (DDVE, AE e IMVE), além de parâmetros indicativos de função sistólica (%Enc. Endo, %Enc. Mio e VEPP) e o DSVE, que também está relacionado com a função sistólica do VE. O procedimento empregado na análise dos conglomerados considerou para a formação dos grupos a estratégia SAHN (envolve agrupamentos seqüenciais, aglomerativos, hierárquicos e não-superpostos), tendo como método de agrupamento a técnica do vizinho mais próximo (SLM: "single linkage method"), e como coeficiente de similaridade a distância euclidiana média<sup>18</sup>. A representação final do agrupamento é descrita pelo dendograma (fig.1).

## RESULTADOS

A análise de agrupamento permitiu separar os ratos com EAo em grupos similares, de acordo com a gravidade da disfunção ventricular. Esses grupos foram denominados disfunção leve (n = 13) e disfunção severa

(n = 9). Na análise estatística, não foi possível realizar o agrupamento de apenas um animal com EAo nos grupos já mencionados (fig.1). Esse animal apresentou os menores valores dos índices de função sistólica do VE e os maiores valores dos diâmetros do VE e átrio esquerdo dos animais com EAo. Esses valores se posicionaram fora dos limites de intervalos de confiança do grupo de disfunção severa. Portanto, no nosso grupo de ratos com EAo um animal apresentou disfunção ventricular mais grave que o grupo denominado disfunção severa.

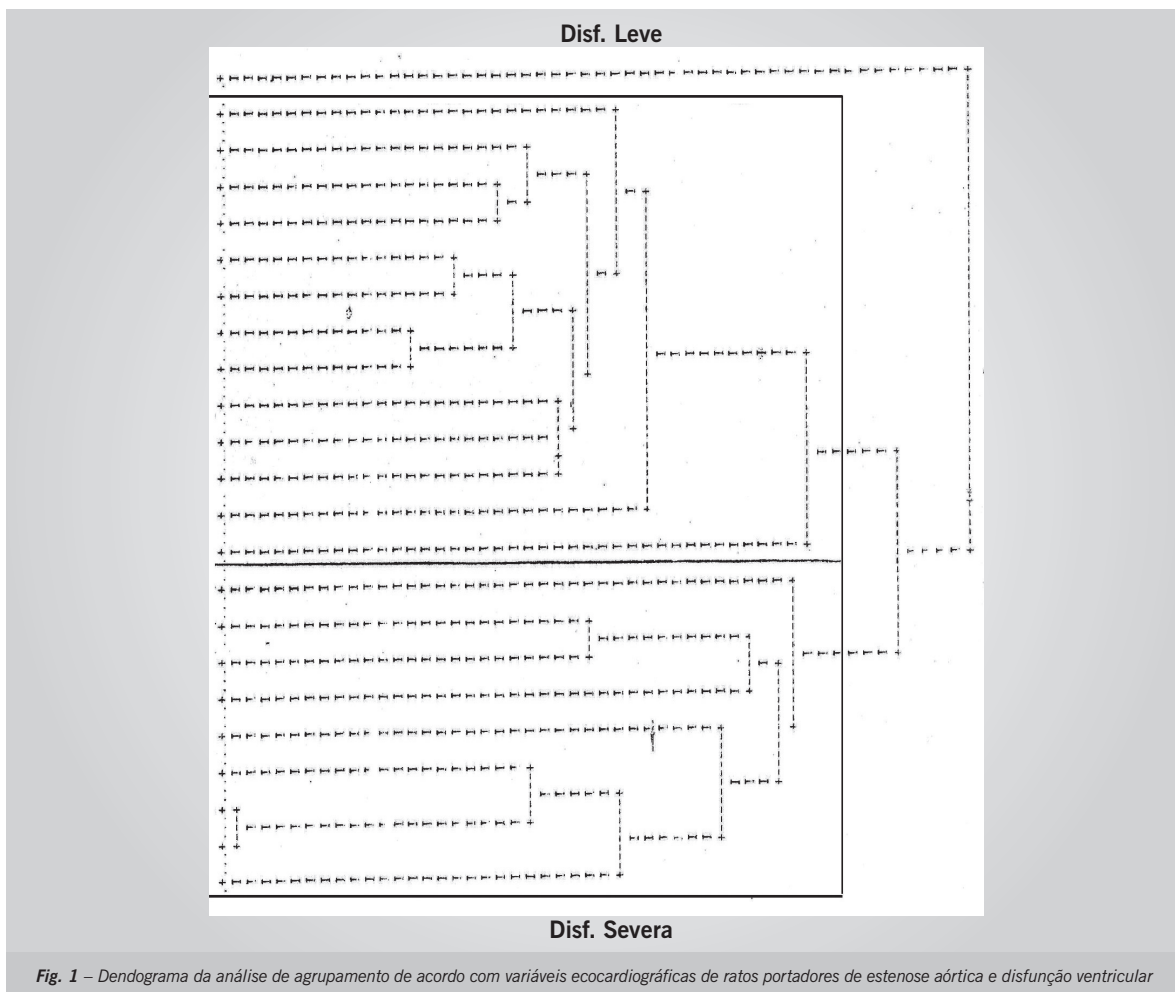
A tabela 1 mostra os valores médios  $\pm$  desvio padrão e os respectivos limites dos intervalos de 95% de confiança para as variáveis ecocardiográficas analisadas considerando os grupos controle e EAo. Os limites dos intervalos de 95% de confiança estão ilustrados nas figuras 2 e 3. As variáveis ecocardiográficas que indicam as dimensões do VE e átrio esquerdo e massa do VE, normalizados para o peso corporal, apresentaram valores mais elevados no grupo EAo-severa em comparação ao grupo EAo-leve. As variáveis indicativas de encurtamento ventricular esquerdo (%Enc. Endo e %Enc. Mio) apresentaram valores menores no grupo EAo-severa em relação ao grupo EAo-leve. As variáveis DDVE, DSVE, %Enc. Endo, %Enc. Mio, IMVE e VEPP não apresentaram superposição dos seus valores de intervalos de confiança entre os dois grupos.

As seguintes variáveis obtidas de ratos sem EAo (controle) mostraram superposição com o grupo EAo-leve: DDVE, DDVE/PC e VEPP. Houve superposição entre os grupos controle e EAo-severa nas variáveis DSVE, %Enc. Endo e %Enc. Mio. O grupo controle não apresentou superposição dos intervalos de confiança com outros grupos nos valores de AE/PC e IMVE.

## DISCUSSÃO

O surgimento e o desenvolvimento do ecocardiograma representou um grande avanço na avaliação *in vivo* do coração. Em pequenos animais utilizados em laboratórios experimentais, esse método tornou possível o acompanhamento do efeito de agressões e/ou tratamentos sobre o coração, de maneira ilimitada quanto ao número de repetições do exame. Em ratos com EAo, os sinais clínicos para identificar a gravidade da IC *in vivo* são limitados. Além disso, o tempo de surgimento dos primeiros sinais de IC é variável; em nosso laboratório é habitualmente observado intervalo de 29 a 37 semanas entre a indução de EAo e o aparecimento de taquiplnéia.

No presente estudo, o ecocardiograma mostrou que os ratos estavam em diferentes graus de comprometimento cardíaco no momento em que foi identificada a taquiplnéia. Tradicionalmente, nos estudos experimentais, os fármacos são introduzidos em momento pré-determinado após a indução de EAo<sup>11,19</sup>. Portanto, é possível que os animais não apresentassem uniformidade quanto ao comprometimento do coração no momento da introdução



**Tabela 1 - Valores médios  $\pm$  desvios padrão e intervalos de 95% de confiança das variáveis ecocardiográficas estudadas**

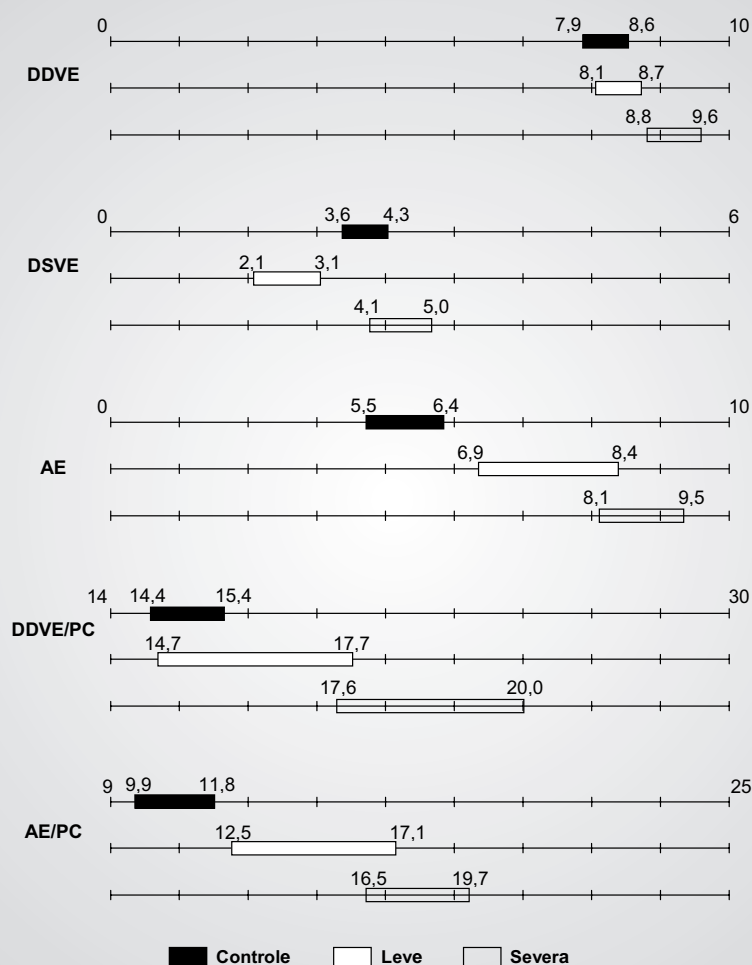
Variável	Controle (n=12)		Disfunção leve (n=13)		Disfunção severa (n=9)	
	Média $\pm$ DP	Limite de confiança	Média $\pm$ DP	Limite de confiança	Média $\pm$ DP	Limite de confiança
DDVE	8,22 $\pm$ 0,56	7,86-8,57	8,38 $\pm$ 0,41	8,07-8,70	9,17 $\pm$ 0,68	8,76-9,58
DSVE	3,96 $\pm$ 0,57	3,60-4,32	2,60 $\pm$ 0,67	2,08-3,11	4,56 $\pm$ 0,76	4,09-5,02
AE	5,95 $\pm$ 0,71	5,50-6,40	7,63 $\pm$ 0,98	6,88-8,38	8,81 $\pm$ 1,13	8,12-9,49
DDVE/PC	14,90 $\pm$ 0,85	14,37-15,44	16,17 $\pm$ 1,97	14,65-17,69	18,80 $\pm$ 1,98	17,60-20,00
AE/PC	10,82 $\pm$ 1,51	9,86-11,78	14,80 $\pm$ 3,02	12,49-17,13	18,07 $\pm$ 2,66	16,46-19,68
%Enc.Endo	51,97 $\pm$ 4,48	49,12-54,82	69,24 $\pm$ 6,70	64,09-74,39	50,54 $\pm$ 5,40	47,28-53,81
%Enc.Mio	30,98 $\pm$ 2,88	29,15-32,81	39,70 $\pm$ 3,49	36,99-42,35	27,65 $\pm$ 3,20	25,71-29,60
Índice MVE	1,89 $\pm$ 0,28	1,71-2,07	2,77 $\pm$ 0,54	2,35-3,18	3,69 $\pm$ 0,74	3,25-4,14
VEPP	45,63 $\pm$ 6,67	41,36-49,86	45,26 $\pm$ 4,42	41,86-48,65	32,85 $\pm$ 4,11	30,37-35,34

*DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo em mm; DSVE: diâmetro sistólico do VE em mm; AE: diâmetro do átrio esquerdo em mm; PC: peso corporal em kg; %Enc.Endo: porcentagem de encurtamento endocárdico do VE; %Enc.Mio: porcentagem de encurtamento da região central das paredes do VE; índice MVE: massa do VE/PC (g/kg); VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior do VE (mm/s).*

do tratamento. Esta heterogeneidade é um fator importante que pode levar à obtenção de resultados discrepantes. Diante dessa consideração, é de fundamental importância a procura de critérios ecocardiográficos para classificar os animais quanto à gravidade da disfunção ventricular, permitindo, dessa forma, a utilização de animais que

apresentem comprometimento estrutural e funcional do coração o mais homogêneo possível.

A análise de agrupamento é uma técnica frequentemente utilizada para agrupar o objeto do estudo de acordo com a semelhança de suas características<sup>1,20,21</sup>. Sjaastad e cols.<sup>1</sup> estabeleceram critérios ecocardiográficos para



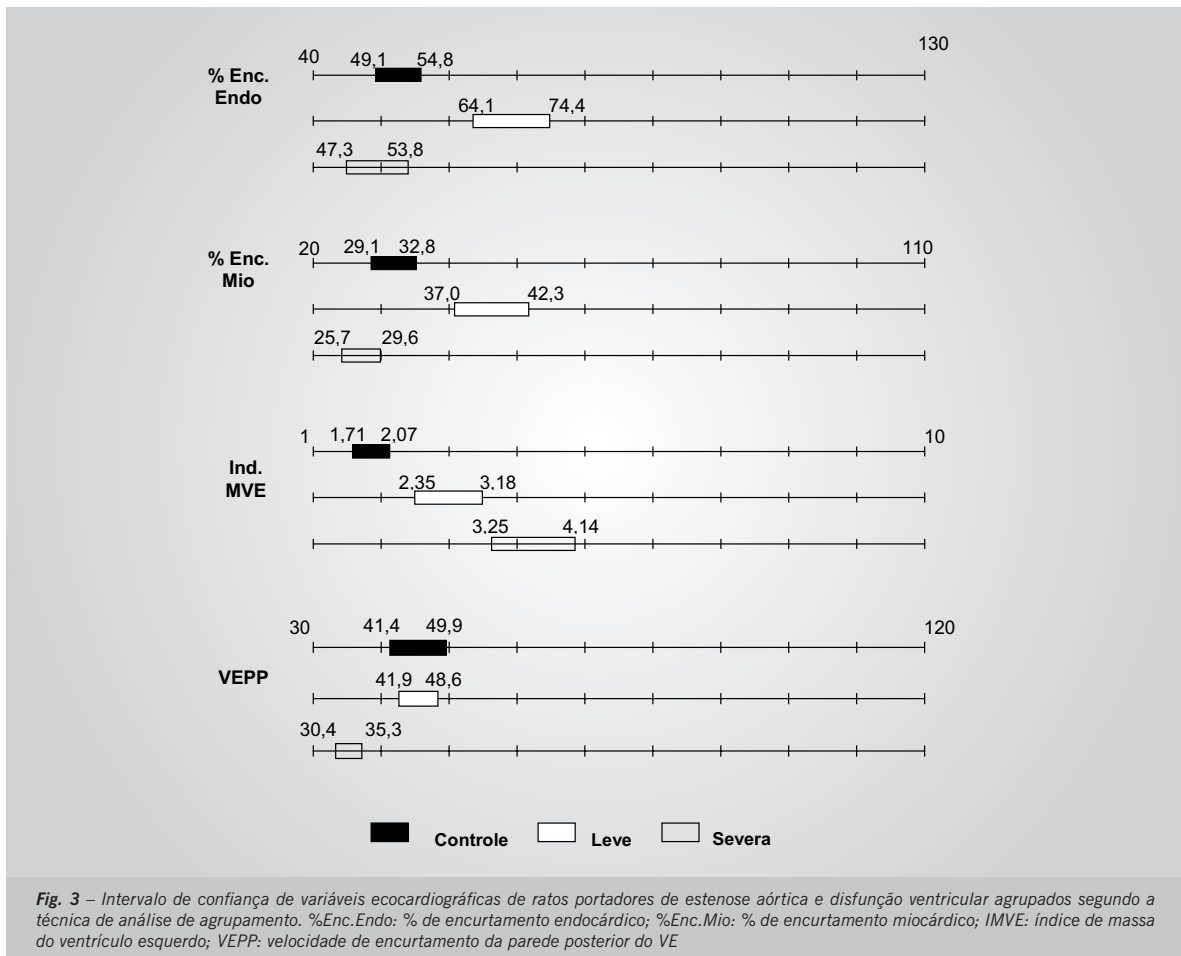
**Fig. 2** – Intervalo de confiança de variáveis ecocardiográficas de ratos portadores de estenose aórtica e disfunção ventricular agrupados segundo a técnica de análise de agrupamento. DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; DSVE: diâmetro sistólico do VE; AE: diâmetro do átrio esquerdo; DDVE/PC: DDVE normalizado para o peso corporal; AE/PC: AE normalizado para o peso corporal

a detecção de IC em ratos, após infarto do miocárdio, utilizando a técnica da análise de agrupamento. Em nosso estudo, com o auxílio dessa análise estatística procuramos classificar o comprometimento cardíaco dos animais com EAo e que apresentavam taquiplnéia. Com o número de ratos utilizados no presente estudo, a análise de agrupamento permitiu separar os ratos com EAo em dois grupos de animais que compartilharam características ecocardiográficas semelhantes (EAo-leve e EAo-severa).

As variáveis DDVE, DSVE, % Enc.Endo, % Enc.Mio, IMVE e VEPP não apresentaram superposição dos valores dos intervalos de confiança entre os dois grupos. As variáveis DDVE/PC, AE e AE/PC apresentaram superposição entre os grupos EAo-leve e EAo-severa. Como os diâmetros do VE e AE sofrem influência da variação do peso corporal (PC), torna-se necessária a normalização de seus valores para o PC. Entretanto, esse procedimento também pode causar erros na interpretação dos resultados

porque os diâmetros do VE e AE não são exatamente proporcionais ao PC. Portanto, a utilização conjunta das variáveis que não apresentaram superposição, à exceção de DDVE e DSVE, permitirá separar ratos com estenose aórtica em dois graus distintos de disfunção ventricular com extrema segurança. Os valores absolutos de DDVE e DSVE devem ser utilizados com cautela porque esses parâmetros habitualmente necessitam ser normalizados para o peso corporal dos animais.

Como já descrito nos resultados, algumas variáveis apresentaram superposição entre os grupos controle e EAo. Essa superposição é compreensível, levando em consideração a remodelação ventricular que se segue à colocação de clipe na aorta<sup>12</sup>. Nesse modelo de sobrecarga de pressão, à medida que o animal cresce ocorre, progressivamente, a instalação de estenose ao fluxo anterógrado do VE com conseqüente desenvolvimento de hipertrofia miocárdica. Esse aumento na espessura miocárdica é acompanhado por aumento progressivo



nos valores dos índices de encurtamento ventricular com manutenção dos valores do DDVE (hipertrofia concêntrica) e redução do DSVE.

Mesmo antes de atingir o pico dos valores de encurtamento sistólico, o animal passa a apresentar taquipnéia em razão da disfunção diastólica do VE decorrente do comprometimento do relaxamento e da complacência ventricular. A partir do momento em que o mecanismo de hipertrofia não mais consegue compensar o excesso de carga inicia-se a dilatação ventricular, e os índices de encurtamento ventricular começam a diminuir pela instalação de disfunção sistólica com manifestação mais exuberante de insuficiência cardíaca, embora haja dificuldade de caracterizar a gravidade da EAo baseada na taquipnéia que é o sinal comumente observado nessa fase da EAo. Portanto, mesmo com disfunção sistólica evidente os valores dos índices de encurtamento ventricular estarão elevados em relação aos animais controles. Com a progressão da disfunção sistólica aqueles índices passarão a ser semelhantes aos controles e posteriormente menores. Pelos motivos expostos acima os índices de encurtamento muscular não apresentam superposição de seus valores entre os grupos controle e EAo-leve e apresentam-se superpostos nos grupos controle e EAo-severa.

Na tentativa de minimizar o efeito da hipertrofia miocárdica sobre o aumento na porcentagem de encurtamento entre o endocárdio do septo interventricular e da parede posterior do VE (%Enc.Endo), calculamos também a porcentagem de encurtamento entre os pontos centrais daquelas paredes (%Enc.Mio)<sup>9,22</sup>. No entanto, as conclusões não diferiram do índice %Enc.Endo, provavelmente pelo intenso grau de hipertrofia ventricular. O índice de massa do VE foi a única variável que não apresentou superposição entre os três grupos. Em nosso estudo, a distinção entre grupos controle e com EAo pôde ser feita também pela medida da espessura da parede do VE (dados não apresentados).

Em conclusão, a análise de agrupamento permite classificar ratos com EAo em grupos com graus distintos de comprometimento cardíaco. A quantificação da disfunção ventricular e, conseqüentemente, a utilização de grupos de animais com comprometimento homogêneo do coração terão papel importante em estudos experimentais sobre fisiopatologia e tratamento da hipertrofia ventricular e insuficiência cardíaca.

## Agradecimento

Os autores agradecem à Fundunesp (processo

n.00758/04) e a Novo Nordisk® o apoio financeiro ao desenvolvimento parcial deste estudo. Os autores agradecem também a contribuição de Mirella Oliveira Silva na realização do estudo.

### Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflitos de interesses pertinentes.

### REFERÊNCIAS

1. Sjaastad I, Sejersted OM, Illebekk A, Bjornerheim R. Echocardiographic criteria for detection of postinfarction congestive heart failure in rats. *J Appl Physiol*. 2000; 89: 1445-54.
2. Francis J, Weiss RM, Wei SG, Johnson AK, Felder RB. Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001; 281: R1734-45.
3. Collins KA, Korcarz CE, Lang RM. Use of echocardiography for the phenotypic assessment of genetically altered mice. *Physiol Genomics*. 2003; 13: 227-39.
4. Satoh S, Ueda Y, Suematsu N, et al. Beneficial effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on sarcoplasmic reticulum function in the failing heart of the Dahl rat. *Circ J*. 2003; 67: 705-11.
5. Bregagnollo EA, Okoshi K, Bregagnollo IF, Padovani CR, Okoshi MP, Cicogna AC. Efeitos da inibição prolongada da enzima de conversão da angiotensina sobre as características morfológicas e funcionais da hipertrofia ventricular esquerda em ratos com sobrecarga pressórica persistente. *Arq Bras Cardiol*. 2005; 84: 225-32.
6. Okoshi K, Matsubara LS, Okoshi MP, et al. Food restriction-induced myocardial dysfunction demonstrated by the combination of *in vivo* and *in vitro* studies. *Nutr Res*. 2002; 22: 1353-64.
7. Paiva SAR, Zornoff LAM, Okoshi MP, et al. Ventricular remodeling induced by retinoic acid supplementation in adult rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 284: H2242-6.
8. Paiva SAR, Zornoff LAM, Okoshi MP, Okoshi K, Cicogna AC, Campana AO. Comportamento de variáveis cardíacas em animais expostos à fumaça de cigarro. *Arq Bras Cardiol*. 2003; 81: 221-4.
9. Reffelmann T, Kloner RA. Transthoracic echocardiography in rats. Evaluation of commonly used indices of left ventricular dimensions, contractile performance, and hypertrophy in a genetic model of hypertrophic heart failure (SHHF-Mcc-facp-Rats) in comparison with Wistar rats during aging. *Basic Res Cardiol*. 2003; 98: 275-84.
10. Litwin S, Katz S, Morgan J, Douglas P. Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat. *Circulation*. 1994; 89: 345-54.
11. Momken I, Kahapip J, Bahi L, et al. Does angiotensin-converting enzyme inhibition improve the energetic status of cardiac and skeletal muscles in heart failure induced by aortic stenosis in rats? *J Mol Cell Cardiol*. 2003; 35: 399-407.
12. Ribeiro HB, Okoshi K, Cicogna AC, et al. Estudo evolutivo da morfologia e função cardíaca em ratos submetidos a estenose aórtica supravalvar. *Arq Bras Cardiol*. 2003; 81: 562-8.
13. Gonçalves G, Zornoff LAM, Ribeiro HB, et al. O Bloqueio do sistema renina-angiotensina atenua a remodelação cardíaca de ratos submetidos a estenose aórtica. *Arq Bras Cardiol*. 2005; 84: 304-8.
14. Carvalho RF, Cicogna AC, Campos GER, et al. Myosin heavy chain expression and atrophy in rat skeletal muscle during transition from cardiac hypertrophy to heart failure. *Int J Exp Path*. 2003; 84: 201-6.
15. Litwin SE, Katz SE, Weinberg EO, Lorell BH, Aurigemma GP, Douglas OS. Serial echocardiographic-Doppler assessment of left ventricular geometry and function in rats with pressure-overload hypertrophy: chronic angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the transition to heart failure. *Circulation*. 1995; 91: 2642-54.
16. Simone G, Devereux RB, Camargo MJ, et al. In vivo left ventricular anatomy in rats with two-kidney, one clip and one-kidney, one clip renovascular hypertension. *J Hypertens*. 1992; 10: 725-32.
17. Douglas PS, Katz SE, Weinberg EO, Chen MH, Bishop SP, Lorell BH. Hypertrophic remodeling: gender differences in the early response to left ventricular pressure overload. *J Am Coll Cardiol*. 1998; 32: 1118-25.
18. Padovani CR. Análise de Agrupamento ("Cluster Analysis"). Publicação do Depto. Matemática e Estatística – ESALQ/USP, Piracicaba – SP, 1982, 16p.
19. Butz S, Driamov S, Remondino A, et al. Losartan but not enalaprilat acutely reduces reperfusion ventricular tachyarrhythmias in hypertrophied rat hearts after low-flow ischaemia. *J Pharm Pharmacol*. 2004; 56: 521-8.
20. Hansell AL, Lam KA, Richardson S, Visick G, Soriano JB. Medical event profiling of COPD patients. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2004; 13: 547-55.
21. Ebrahim S, Montaner D, Lawlor DA. Clustering of risk factors and social class in childhood and adulthood in British women's heart and health study: cross sectional analysis. *BMJ*. 2004; 328: 861-5.
22. Ballo P, Mondillo S, Guerrini F, Barbati R, Picchi A, Focardi M. Midwall mechanics in physiologic and hypertensive concentric hypertrophy. *J Am Soc Echocardiogr*. 2004; 17: 418-27.