

A Hipertrofia Cardíaca Induzida por Sobrecarga de Pressão Varia de Acordo com os Diferentes Tamanhos de Agulhas para Ligadura e os Pesos Corporais em Ratos

Pressure Overload-induced Cardiac Hypertrophy Varies According to Different Ligation Needle Sizes and Body Weights in Mice

Zhen Jia,¹ Zhijun Chen,² Hongfei Xu,¹ Malik Akuffu Armah,¹ Peng Teng,¹ Weidong Li,¹ Dongdong Jian,¹ Liang Ma,¹ Yiming Ni¹

Department of Cardio-Thoracic Surgery, The First Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University,¹ Zhejiang - China

Department of Cardio-Thoracic Surgery, Zhoushan Hospital,² Zhejiang - China

Resumo

Fundamentos: O modelo de hipertrofia cardíaca (HC) para ratos foi amplamente utilizado, proporcionando assim uma base de pesquisa efetiva para a exploração de HC.

Objetivo: pesquisar os efeitos do modelamento de HC sob constrição da aorta abdominal (CAA) usando diferentes agulhas e pesos em ratos.

Métodos: foram utilizadas quatro agulhas com diâmetros externos diferentes (0,35, 0,40, 0,45 e 0,50 mm) para CAA. Foram selecionados 150 ratos C57BL / 6 machos de acordo com o peso corporal (PC) e divididos em 3 níveis de peso: 18 g, 22 g e 26g (n = 50 em cada grupo). Todos os níveis de peso foram divididos em 5 grupos: um grupo *sham* (n = 10) e 4 grupos CAA usando 4 intensidades de ligadura (n = 10 por grupo). Após a cirurgia, foram registradas as taxas de sobrevivência, foi realizada ecocardiografia, os corações foram dissecados e utilizados para detecção histológica, e os dados foram analisados estatisticamente, $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados: Todos os ratos morreram nos seguintes grupos de CAA: 18 g/0,35 mm, 22 g/0,35 mm, 26 g/0,35 mm, 22 g/0,40 mm e 26 g/0,40 mm. Todos os ratos com CAA, aqueles ligados com uma agulha de 0,50 mm, e aqueles que sofreram operação *sham* sobreviveram. Ocorreram diferentes taxas de mortalidade nos seguintes grupos de CAA: 18 g/0,40 mm, 18 g/0,45 mm, 18 g/0,50 mm, 22 g/45 mm, 22 g/0,50 mm, 26 g/0,45 mm e 26 g/0,50 mm. As proporções de peso do coração/peso corporal ($5,39 \pm 0,85$, $6,41 \pm 0,68$, $4,67 \pm 0,37$, $5,22 \pm 0,42$, $4,23 \pm 0,28$, $5,41 \pm 0,14$ e $4,02 \pm 0,13$) aumentaram significativamente em comparação com os grupos *sham* para ratos com os mesmos níveis de peso.

Conclusão: uma agulha de 0,45mm levou a HC mais óbvia do que as agulhas de 0,40 mm e 0,50mm e causou HC extraordinária em ratos de 18 g. (Arq Bras Cardiol. 2018; 110(6):568-576)

Palavras-chave: Cardiomegalia; Peso Corporal; Insuficiência Cardíaca; Agulhas/utilização; Ratos.

Abstract

Background: The cardiac hypertrophy (CH) model for mice has been widely used, thereby providing an effective research foundation for CH exploration.

Objective: To research the effects of CH modeling under abdominal aortic constriction (AAC) using different needles and weights in mice.

Methods: Four needles with different external diameters (0.35, 0.40, 0.45, and 0.50 mm) were used for AAC. 150 male C57BL/6 mice were selected according to body weight (BW) and divided into 3 weight levels: 18 g, 22 g, and 26g (n = 50 in each group). All weight levels were divided into 5 groups: a sham group (n = 10) and 4 AAC groups using 4 ligation intensities (n = 10 per group). After surgery, survival rates were recorded, echocardiography was performed, hearts were dissected and used for histological detection, and data were statistically analyzed, $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results: All mice died in the following AAC groups: 18g/0.35 mm, 22 g/0.35 mm, 26 g/0.35 mm, 22 g/0.40 mm, and 26 g/0.40 mm. All mice with AAC, those ligated with a 0.50-mm needle, and those that underwent sham operation survived. Different death rates occurred in the following AAC groups: 18 g/0.40 mm, 18 g/0.45 mm, 18 g/0.50 mm, 22 g/45 mm, 22 g/0.50 mm, 26 g/0.45 mm, and 26 g/0.50 mm. The heart weight/body weight ratios (5.39 ± 0.85 , 6.41 ± 0.68 , 4.67 ± 0.37 , 5.22 ± 0.42 , 4.23 ± 0.28 , 5.41 ± 0.14 , and 4.02 ± 0.13) were significantly increased compared with those of the sham groups for mice with the same weight levels.

Conclusion: A 0.45-mm needle led to more obvious CH than did 0.40-mm and 0.50-mm needles and caused extraordinary CH in 18-g mice. (Arq Bras Cardiol. 2018; 110(6):568-576)

Keywords: Cardiomegaly; Body Weight; Heart Failure; Needles/utilization; Rats

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Yiming Ni •

Department of Cardio-Thoracic Surgery, The First Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310003 – China

E-mail: 1183020@zju.edu.cn

Artigo recebido em 21/08/2017, revisado em 25/10/2017, aceito em 24/11/2017

DOI: 10.5935/abc.20180088

Introdução

A hipertrofia cardíaca (HC) é uma alteração patológica compensatória que geralmente é induzida por sobrecarga de pressão (SP), anormalidade neurohumoral e os efeitos das citocinas. Caracteriza-se por hipertrofia de cardiomiócitos e hiperplasia intersticial, e resulta em um coração aumentado e espessamento das paredes do coração. Clinicamente, a HC está envolvida no desenvolvimento de muitas doenças, como doença valvular, hipertensão, estenose arterial e hipertrofia miocárdica primária. Se essas doenças se desenvolvem em seu próprio ritmo, a função cardíaca (FC) irá gradualmente se descompensar, levando à insuficiência cardíaca (HF), que reduz a qualidade de vida e aumenta a taxa de mortalidade. Portanto, a HC é uma preocupação generalizada e tem sido explorada no nível molecular pelos pesquisadores. Devido à alta homologia genômica entre ratos e seres humanos, um modelo de HC estabelecido para ratos tem sido amplamente utilizado em experiências com animais, proporcionando assim uma base de pesquisa efetiva para a exploração de HC.

Atualmente, a HC induzida por SP é uma maneira comum de estabelecer o modelo. A constrição da aorta abdominal (CAA) é altamente recomendada pelos pesquisadores devido à alta taxa de sucesso e à capacidade de realizar cirurgia sem necessidade de toracotomia ou ventilação. No entanto, os efeitos de modelagem com diferentes intensidades de ligadura para certos pesos corporais (PCs) ainda não foram relatados. Portanto, utilizamos 3 ratos PC usados com frequência (18 g, 22 g e 26 g) e 4 diferentes tamanhos de agulha (0,35, 0,40, 0,45 e 0,50 mm) para estabelecer o modelo de HC para cada nível de peso para CAA, resumir as taxas de sobrevivência, e avaliar os efeitos da HC.

Métodos

Grupos de animais e manipulação

Cento e cinquenta ratos machos de tipo selvagem C57BL/6 foram obtidos do Shanghai SLAC Laboratory Animal Co. Ltd (Xangai, China). Todos os animais foram tratados e atendidos de acordo com o *Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório* (National Institutes of Health, Washington, DC, 1996). Os protocolos experimentais foram aprovados pelo nosso Comitê Institucional de Cuidados e Uso Animal da Universidade de Zhejiang (Hangzhou, China). Os ratos foram selecionados de acordo com pesos de aproximadamente 18 g (intervalo 17,3-18,7 g), 22 g (intervalo, 20,8-23,0 g) e 26 g (intervalo, 25,1-27,0 g) e foram divididos nos seguintes três níveis de peso: 18g (18,0 ± 0,3 g; n = 50), 22 g (22,0 ± 0,6 g; n = 50) e 26 g (26,1 ± 0,5 g; n = 50). Todos os níveis de peso foram divididos usando um método de randomização para criar um grupo *sham* (n = 10) e 4 grupos de CAA de acordo com as intensidades de ligadura (0,35, 0,40, 0,45 e 0,50mm; n = 10 por grupo). Em relação ao PC, não foram encontradas diferenças significativas entre os 5 grupos para cada nível de peso (Tabela S1) e os PC pré-operatórios de ratos que morreram e dos que sobreviveram não foram significativos (Tabela S2).

Os ratos foram anestesiados com 4% de hidrato de cloral (0,1 ml / 1 g de PC, injeção intraperitoneal). Quando os ratos

não responderam quando o dedo do pé foi comprimido, os membros foram fixados na placa de operação na posição supina e a pele foi preparada barbeando e desinfestando com álcool. Uma gaze estéril foi colocada no lado direito do abdômen e uma incisão medioventral foi criada cerca de 1,5 cm a partir do xifoide. A pele foi fixada com um espalhador e as vísceras foram puxadas suavemente com um cotonete e colocadas na gaze. Em seguida, a aorta abdominal foi isolada usando uma técnica de dissecação sem corte com microforceps curvados no microscópio. Uma sutura de seda de 6-0 foi enrolada e puxada para trás em torno da aorta 1 mm acima da artéria mesentérica superior. Uma agulha de acupuntura blunt de 2 mm (diâmetros externos: 0,35 mm, 0,40 mm, 0,45 mm e 0,50 mm; Huatuo; Suzhou Medical Appliance Factory, Suzhou, China; critério número GB2024-1994) foi então colocada ao lado da aorta. A sutura estava amarrada confortavelmente ao redor da agulha e da aorta. A agulha foi removida imediatamente após a ligadura, as vísceras foram substituídas, o peritôneo e a pele foram suturados, e os ratos foram colocados para se recuperar. A ligadura aórtica foi omitida apenas para o grupo *sham*. Após a cirurgia, as orelhas foram cortadas para diferenciar os ratos. Em seguida, os ratos foram colocados em uma incubadora a 30°C até que eles acordaram e foram devolvidos às suas gaiolas. O estado de sobrevivência foi registrado diariamente. Para observar o desenvolvimento físico de ratos sob diferentes condições, as diferenças de PC antes da cirurgia e na semana 8 pós-cirurgia foram calculadas como a mudança no PC.

Imagem ecocardiográfica

Após as semanas pós-operatório 4 e 8, os ratos foram pesados e anestesiados com 4% de hidrato de cloral e colocados em uma almofada de aquecimento após a preparação da pele. O ecocardiograma bidimensional transtorácico (2D) foi realizado utilizando o sistema ecocardiográfico ultra-som GE Vivid E9 (General Electric Company, Fairfield, CT, EUA) com a sonda GE 9L (transdutor de matriz linear de 8 MHz, General Electric Company). As varreduras do eixo longo paraesternal do modo M do ventrículo esquerdo no nível das cordas mitrais foram utilizadas para quantificar a espessura do septo interventricular no final da diástole (ESId), espessura do septo interventricular no final da sístole (ESIs), dimensão interna do ventrículo esquerdo no final da diástole (DIVEd), dimensão interna do ventrículo esquerdo no final da sístole (DIVEs), espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo no final da diástole (EPPVEd), espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo no final da sístole (EPPVEs), fração de ejeção (FE) e encurtamento fraccionário (EF). Todos os ratos foram testados usando os mesmos parâmetros.

Peso cardíaco, peso cardíaco/peso corporal e peso cardíaco/comprimento tibial

Após a análise ecocardiográfica às 8 semanas após a cirurgia, os ratos foram sacrificados por deslocação cervical e os corações foram dissecados. Então, os tecidos auriculares e vasculares foram cortados cuidadosamente, deixando os ventrículos. Os corações foram enxaguados com solução salina tamponada com fosfato (SSTF), drenados apertando suavemente sobre papel absorvente, pesados, fotografados sob luz natural e fixados em paraformaldeído a 4%.

Os comprimentos tibiais (CTs, valor médio da tibia bilateral) foram registrados. O peso cardíaco (PCo), PC e CT foram medidos e a relação PCo/PC e a relação PCo/CT foram calculadas para avaliar a resposta hipertrófica à SP.

Exame histológico do coração

Corações extraídos foram fixados em paraformaldeído a 4% por 24h e desidratados. Após os procedimentos histológicos de rotina, os corações foram incorporados em parafina e cortados em seções de 4 μ -m. As seções foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e picrossirius Red (PSR). As seções transversais cardíacas foram adquiridas em vistas microscópicas 20x a partir de seções HE e 5 espessuras do ventrículo esquerdo em cada visão foram selecionadas em amostragem sistemática e medidas usando Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, EUA). Então, os valores médios foram calculados. As mudanças morfológicas dos cardiomiócitos foram adquiridas em vistas microscópicas 400 \times a partir de seções HE. Os depósitos intersticiais e/ou perivasculares de colágeno foram capturados em vistas microscópicas 200 \times sob luzes padrão. O colágeno foi corado com PSR, indicando fibrose. Pelo menos 6 visualizações foram selecionadas de forma cega, e cada fotografia foi analisada para revelar a proporção de colágeno vermelho para toda a área de tecido usando o Image-Pro Plus 6.0. Então, os valores médios foram calculados.

Análise estatística

O software estatístico SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) foi utilizado para todas as análises estatísticas. O teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S) foi utilizado para verificar a normalidade das variáveis quantitativas conforme apropriado. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (DP). A ANOVA unidirecional e os testes pós-hoc Tukey foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

CAA excessivo pode levar à morte

Monitoramos as mortes de ratos após a cirurgia de acordo com critérios de insuficiência cardíaca aguda (ICA). Os dados (Tabela 1) mostraram que todos os óbitos ocorreram dentro de 5 dias, e uma alta incidência de óbito ocorreu durante o período inicial de 24 h pós-cirurgia.

CAA aumenta as dimensões cardíacas e reduz a função cardíaca

A ecocardiografia foi realizada no final das semanas pós-operatórias 4 e 8. Na semana 4 pós-operatório, os dados (Tabela 2) mostraram uma tendência de aumento do coração para ratos com CAA, incluindo espessamento da parede ventricular e um aumento na dilatação da câmara; no entanto, as diferenças em FE e EF não foram significativas, indicando que mudanças na estrutura do coração não tiveram um efeito pronunciado na função cardíaca nesse momento. Na semana 8 pós-cirurgia, a tendência do aumento do coração continuou; no entanto, os valores FE e EF para os grupos CAA diminuíram significativamente. Essa alteração na função cardíaca da semana 4 à semana 8 foi consistente com a função sistólica, começando a ser marcadamente afetada na semana 4 após a cirurgia de SP.

CAA aumenta o PCo, e as relações PCo/PC e PCo/CT

Geralmente, o aumento do PCo, e das relações PCo/PC e PCo/CT são os três principais indicadores de HC. Em nosso estudo, como é mostrado na Tabela 3, descobrimos que o CAA aumentou significativamente o PCo e causou uma relação PCo/PC e PCo/CT significativamente maior em comparação com os grupos *shams* para todos os níveis de peso. Os valores PCo, PCo/PC e PCo/CT para os grupos CAA 0,45 mm foram significativamente maiores que os dos grupos CAA 0,50 mm. Estes índices relacionados ao PCo para os grupos de 18 g/0,45 mm foram significativamente maiores mesmo que os dos grupos de 18 g/0,40 mm.

CAA leva à hipertrofia dos cardiomiócitos e aumenta os depósitos de colágeno

Para os ratos submetidos à cirurgia CAA, os corações demonstraram diferentes graus de aumento (Figura 1A), aumento dos músculos papilares e espessamento das paredes ventriculares (Figura 1B). O espessamento da parede aumentou significativamente em comparação com o do grupo *sham* (Tabela 4). Os grupos *shams* apresentaram arquitetura normal dos cardiomiócitos em comparação com os grupos CAA. Foram observadas mudanças patológicas, incluindo cardiomiócitos e cardiomiócitos aumentados, desordenados e eosinofílicos, ricos em citoplasma e núcleos traquiomáticos e pantomórficos em cada um dos grupos CAA (Figura 1C). Depósitos dispersos de colágeno nos espaços intersticial e perivasculares foram observados nos grupos *shams*. Em comparação, em alguns grupos

Tabela 1 – Mortes de ratos após a cirurgia

	Agulhas (mm) para 18 g			Agulhas (mm) para 22 g			Agulhas (mm) para 26 g		
	0,35	0,40	0,45	0,35	0,40	0,45	0,35	0,40	0,45
0-24 h	10	4	1	10	7	1	10	8	3
24 h-3 d	0	0	0	0	2	0	0	1	2
3 d-5 d	0	0	1	0	1	2	0	1	1

Não houve mortes de ratos no grupo CAA 0.50-mm ou no grupo *sham*. As mortes foram registradas durante 3 períodos (0-24h, 24h-3d e 3-5 d); 54 mortes ocorreram dentro de 0-24h após a cirurgia. O número total de óbitos foi de 65.

Tabela 2 – Resultados ecocardiográficos de ratos de 18 g, 22 g e 26 g

	18 g/0,40 mm (n = 6)	18 g/0,45 mm (n = 8)	18 g/0,50 mm (n = 10)	18 g/Sham (n = 10)	22 g/0,45 mm (n = 7)	22 g/0,50 mm (n = 10)	22 g/Sham (n = 10)	26 g/0,45 mm (n = 4)	26 g/0,50 mm (n = 10)	26 g/Sham (n = 10)
Semana 4										
ESId	0,92 ± 0,05*	0,96 ± 0,05*	0,86 ± 0,05	0,81 ± 0,04	0,82 ± 0,06	0,83 ± 0,04	0,78 ± 0,04	0,84 ± 0,03	0,80 ± 0,04	0,80 ± 0,04
ESIs	1,12 ± 0,05	1,24 ± 0,15*	1,08 ± 0,10	1,05 ± 0,04	1,06 ± 0,07*	1,00 ± 0,04	0,98 ± 0,03	1,15 ± 0,08	1,11 ± 0,07	1,08 ± 0,08
DIVEd	3,21 ± 0,31	3,33 ± 0,26	3,00 ± 0,16	3,08 ± 0,28	3,04 ± 0,20	3,01 ± 0,17	3,00 ± 0,19	3,40 ± 0,11*	3,11 ± 0,15	2,96 ± 0,22
DIVES	2,13 ± 0,26	2,37 ± 0,26*	2,03 ± 0,11	2,09 ± 0,21	1,92 ± 0,13	1,98 ± 0,14	2,07 ± 0,18	2,24 ± 0,18*	2,02 ± 0,13	1,93 ± 0,14
EPPVEd	0,94 ± 0,04*	1,01 ± 0,08*	0,87 ± 0,04	0,81 ± 0,09	0,85 ± 0,04	0,87 ± 0,05*	0,81 ± 0,07	0,90 ± 0,06	0,89 ± 0,05	0,87 ± 0,06
EPPVES	1,13 ± 0,06	1,24 ± 0,06*	1,08 ± 0,09	1,04 ± 0,03	1,04 ± 0,04	1,00 ± 0,07	1,04 ± 0,10	1,27 ± 0,04*	1,12 ± 0,07	1,10 ± 0,05
FE %	70,7 ± 3,8	66,0 ± 3,9	67,9 ± 3,5	68,5 ± 2,6	72,1 ± 4,5	68,3 ± 3,7	70,6 ± 3,6	70,5 ± 5,4	71,2 ± 3,1	73,1 ± 4,7
EF %	34,5 ± 2,4	31,2 ± 2,1*	34,5 ± 2,3	34,3 ± 2,4	36,9 ± 2,3	35,7 ± 3,0	36,7 ± 2,8	36,3 ± 2,6	37,5 ± 2,3	36,6 ± 3,2
Semana 8										
ESId	0,93 ± 0,08*	0,97 ± 0,05*	0,88 ± 0,04	0,83 ± 0,07	0,99 ± 0,06*	0,91 ± 0,02*	0,84 ± 0,07	0,93 ± 0,08	0,91 ± 0,06	0,85 ± 0,06
ESIs	1,18 ± 0,20	1,33 ± 0,14*	1,15 ± 0,07	1,10 ± 0,10	1,26 ± 0,07*	1,16 ± 0,10*	1,04 ± 0,08	1,19 ± 0,10	1,17 ± 0,11	1,14 ± 0,07
DIVEd	3,34 ± 0,24	4,12 ± 0,34*	3,30 ± 0,41	3,14 ± 0,15	3,26 ± 0,13	3,15 ± 0,13	3,23 ± 0,15	3,50 ± 0,12*	3,29 ± 0,16	3,20 ± 0,15
DIVES	2,13 ± 0,11	3,02 ± 0,27*	2,21 ± 0,40	1,94 ± 0,18	2,28 ± 0,11	2,11 ± 0,14	2,19 ± 0,12	2,50 ± 0,15*	2,33 ± 0,26	2,14 ± 0,15
EPPVEd	0,96 ± 0,08*	1,03 ± 0,08*	0,93 ± 0,04*	0,84 ± 0,08	0,99 ± 0,05*	0,96 ± 0,04*	0,90 ± 0,06	1,02 ± 0,07*	0,96 ± 0,04*	0,90 ± 0,04
EPPVES	1,23 ± 0,08*	1,35 ± 0,13*	1,20 ± 0,07*	1,07 ± 0,07	1,22 ± 0,06*	1,14 ± 0,07	1,07 ± 0,08	1,30 ± 0,08*	1,13 ± 0,05*	1,04 ± 0,06
FE %	64,7 ± 4,6*	60,9 ± 2,4*	67,6 ± 4,7*	75,5 ± 5,5	63,3 ± 3,0*	67,7 ± 3,3*	74,2 ± 3,2	62,8 ± 2,6*	67,5 ± 5,3*	73,1 ± 2,9
EF %	33,2 ± 3,0*	29,4 ± 1,9*	35,8 ± 4,3*	41,0 ± 5,5	32,9 ± 1,6*	35,5 ± 2,4*	40,8 ± 3,1	31,0 ± 3,2*	32,7 ± 3,8*	36,9 ± 2,5

ESId: espessura do septo interventricular no final da diástole; ESIs: espessura do septo interventricular no final da sístole; DIVEd: dimensão interna do ventrículo esquerdo no final da diástole; DIVES: dimensão interna do ventrículo esquerdo no final da sístole; EPPVEd: espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo no final da diástole; EPPVES: espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo no final da sístole; FE, fração de ejeção; EF, encurtamento fracionário. As dimensões cardíacas (incluindo ESId, ESIs, DIVEd, DIVES, EPPVEd e EPPVES) (mm) e os índices funcionais (incluindo FE e EF) modificaram-se por meio de ecocardiografia. Os dados foram analisados estatisticamente e apresentados como a média ± DP. Na semana 4, as dimensões cardíacas para os grupos CAA aumentaram significativamente em comparação com os grupos sham (*p < 0,05); na semana 8, mais dimensões cardíacas aumentaram significativamente, e os valores de FE e EF para os grupos CAA diminuíram significativamente comparativamente aos dos grupos sham para 3 níveis de peso (*p < 0,05).

Tabela 3 – Índices relacionados ao peso cardíaco de ratos de 18 g, 22 g e 26 g

	18 g/0,40 mm (n = 6)	18 g/0,45 mm (n = 8)	18 g/0,50 mm (n = 10)	18 g/Sham (n = 10)	22 g/0,45 mm (n = 7)	22 g/0,50 mm (n = 10)	22 g/Sham (n = 10)	26 g/0,45 mm (n = 4)	26 g/0,50 mm (n = 10)	26 g/Sham (n = 10)
PCo	136,5 ± 22,3*	170,0 ± 21,4**	124,0 ± 9,9*	103,5 ± 7,0	137,1 ± 7,4**	115,5 ± 7,6*	104,3 ± 7,4	153,5 ± 4,8**	114,3 ± 5,1*	103,2 ± 5,6
PCo/PC	5,39 ± 0,85*	6,41 ± 0,68**	4,67 ± 0,37*	3,86 ± 0,18	5,22 ± 0,42**	4,23 ± 0,28*	3,62 ± 0,26	5,41 ± 0,14**	4,02 ± 0,13*	3,59 ± 0,16
PCo/CT	63,8 ± 10,3*	74,4 ± 9,3**	57,6 ± 4,6*	47,8 ± 3,6	59,6 ± 3,3**	54,2 ± 3,8*	48,3 ± 3,9	65,6 ± 1,3**	49,2 ± 2,6*	44,1 ± 2,8

PCo: peso do coração; PC: peso corporal; CT: comprimento tibial; PCo (mg), PCo/PC (mg/g) e PCo/CT (mg/cm) foram medidos e calculados a partir de CAA e grupos sham de 3 níveis de PC. Os dados são apresentados como a média ± DP. * Comparados com o grupo sham no mesmo nível; PC, os índices relacionados ao peso cardíaco dos grupos CAA aumentaram significativamente (p < 0,05). ** Comparados com os grupos restantes no mesmo nível de PC, os índices relacionados ao peso do coração do grupo CAA 0,45-mm aumentaram significativamente (p < 0,05).

Tabela 4 – Espessura do ventrículo esquerdo (mm) com base no peso e tamanho da agulha

Peso	0,40 mm	0,45 mm	0,50 mm	Sham
18 g	1,81 ± 0,30*	1,86 ± 0,17*	1,59 ± 0,09*	1,27 ± 0,07
22 g		1,69 ± 0,24*	1,55 ± 0,19*	1,22 ± 0,14
26 g		1,82 ± 0,30*	1,59 ± 0,22*	1,34 ± 0,07

Os dados são apresentados como a média ± DP (n = 5). * P < 0,05 representa uma diferença significativa entre a constrição da aorta abdominal (CAA) e os grupos shams.

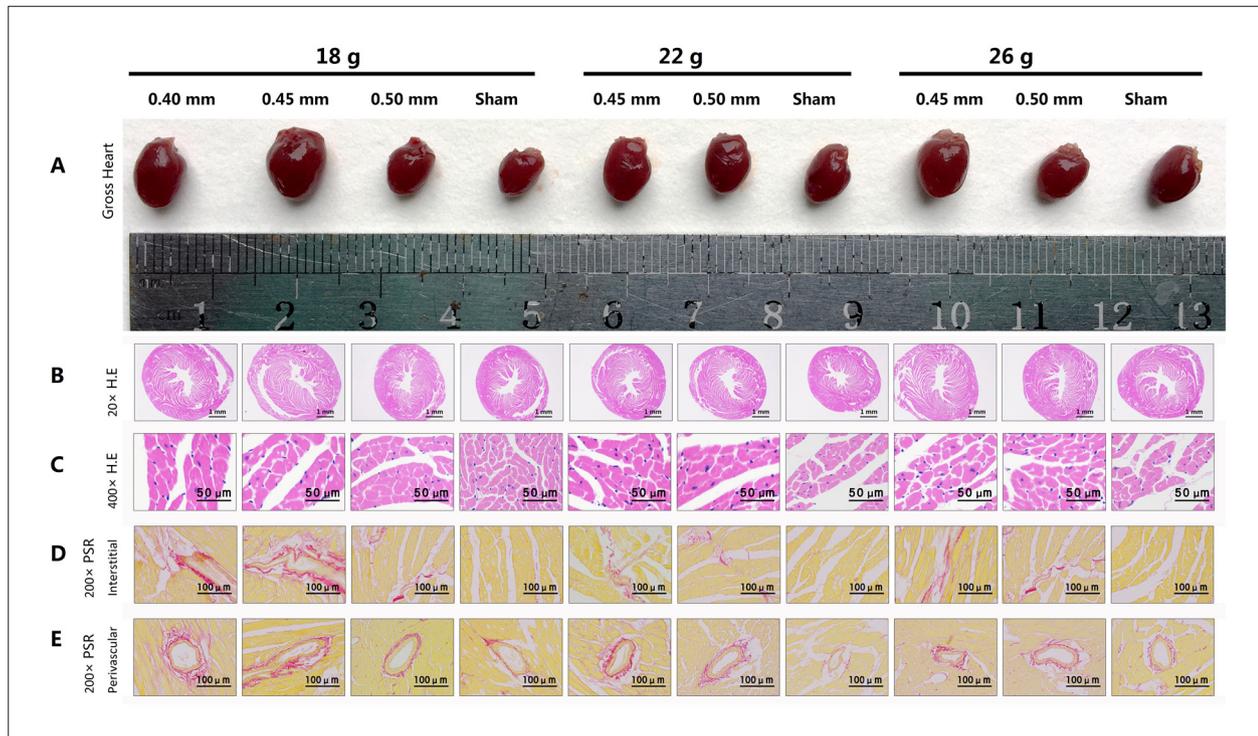


Figura 1 – Hipertrofia de cardiomiócitos e depósitos de colágeno no exame histológico. (A) Corpos grossos sob luz natural. (B) Vistas 20 x microscópicas das seções HE. (C) Vistas microscópicas de 400 x das seções HE. (D) Exibições microscópicas representativas de 200 x sob luzes padrão de seções PSR no espaço intersticial. (E) Exibições microscópicas representativas de 200 x sob luzes padrão de seções PSR no espaço perivascular. A fibrose é apresentada como vermelha nas seções do PSR.

CAA, uma maior quantidade e uma maior amplitude de depósitos vermelhos foram observados no espaço intersticial (Figura 1D) e observou-se colágeno espessado no espaço perivascular, especialmente na parede vascular externa (Figura 1E). A análise estatística indicou que o grupo CAA apresentou uma área de colágeno significativamente maior do que o grupo sham (Tabela 5). Estes resultados implicam que CAA é capaz de induzir HC induzida por SP e fibrose.

CAA pode restringir o desenvolvimento físico

A análise mostrou que com CAA 0,45mm, o PC aumentou significativamente em ratos de 18 g em relação aos ratos de 22 g e 26 g (Tabela 6), indicando que os grupos de 18 g tinham maior potencial de desenvolvimento. Nos grupos de ratos de 18 g, os dados mostraram que o valor de 18 g/0,40 mm foi significativamente menor que o dos grupos 18 g/0,45 mm e 18 g/sham, e que não houve diferenças significativas entre os 18 g/0,45 mm e 18 g/grupos sham

(Tabela 7), indicando que o grupo 18 g/0,45 mm teve desenvolvimento físico quase normal. O desenvolvimento do grupo 18 g/0,40 mm foi limitado.

Discussão

Neste estudo, realizamos CAA de acordo com 4 intensidades de ligadura diferentes para ratos de 3 diferentes níveis de peso para avaliar as taxas de sobrevivência de ratos com HC induzida por SP sob diferentes condições. Este é o primeiro estudo que mostra que existem diversidades de HC existem entre grupos sob ligaduras e PC diferentes.

CAA é amplamente utilizada na modelagem de HC induzida por SP em ratos. A ligadura da agulha é usualmente utilizada e a eficiência da modelagem é altamente dependente da intensidade da ligadura. No entanto, a constrição excessiva levará à morte,¹ e os achados da nossa pesquisa (Tabela 1) demonstraram esse ponto. Neste estudo, uma agulha de

Tabela 5 – Percentagem do depósito de colágeno no ventrículo esquerdo com base no peso e tamanho da agulha

Peso	0,40 mm	0,45 mm	0,50 mm	Sham
18 g	5,8 ± 2,2*	8,9 ± 1,3*	5,1 ± 1,3*	2,6 ± 1,0
22 g		5,2 ± 1,6*	4,9 ± 1,5*	2,5 ± 0,9
26 g		6,1 ± 1,0*	5,3 ± 1,8*	3,1 ± 0,8

Os dados são apresentados como a média ± DP (n = 6). * p < 0,05 representa uma diferença significativa entre a constrição da aorta abdominal (CAA) e os grupos shams.

0,35 mm causou a morte de todos os ratos nos três níveis de peso e a agulha de 0,40 mm causou a morte de todos os ratos nos grupos de 22 g e 26 g. Ao contrário, todos os ratos com CAA submetidos a cirurgia com uma agulha de 0,50 mm ou operação *sham* sobreviveram. Os ratos nos outros grupos apresentaram taxas de mortalidade diferentes. Em relação à seleção de agulhas para os intervalos PC deste estudo, uma agulha menor que 0,35 mm de diâmetro causou maior constrição e morte. No entanto, uma agulha com mais de 0,50 mm de diâmetro não alterou a taxa de sobrevivência, mas reduziu a eficiência de HC devido ao SP reduzido por uma constrição mais fraca. É por isso que escolhemos agulhas entre 0,35 mm e 0,50 mm.

A morte pode ocorrer após a CAA. Indubitavelmente, a CAA aumenta a pós-carga cardíaca. Para lidar com a biodinâmica adicional, o coração exerce uma série de mudanças adaptativas, incluindo ativação e hipertrofia de cardiomiócitos e hiperplasia da matriz extracelular.² Este mecanismo compensatório mantém o débito cardíaco (DC) efetivo por um período de tempo, mantendo a sobrevivência do organismo; é também a base para o estabelecimento do modelo HC. No entanto, quando a pós-carga súbita está fora do rango do ajuste de cardiomiócitos, a corrente sanguínea será limitada e causará constrição, resultando em ICA. A ICA é tipicamente caracterizada por mudanças rápidas nos sintomas de insuficiência cardíaca (IC).³ Sato et al.,⁴ consideraram a incidência de morte dentro de 5 dias como um critério de avaliação de ICA. ICA poderia melhorar moderadamente ou notavelmente no segundo dia, se for efetivamente controlada. A ICA leva a alta pressão ventricular e a alta pressão ventricular leva a alta pressão arterial pulmonar, levando a congestão pulmonar, que é uma das causas de morte após CAA.⁵ Liao et al.,⁶ sugeriram que o pneumoedema cardiogênico é a principal causa de morte pós-operatória para ratos SP. Além disso, a arritmia pode ocorrer como parte das mudanças eletrofisiológicas,⁷ e os sarcômeros de cardiomiócitos podem ser desordenados durante as mudanças patológicas.⁸ Estas são todas ameaças graves para a taxa de sobrevivência após a CAA. Nosso registro de tempos de morte de ratos (Tabela 1) mostrou o fenômeno de todas as mortes ocorrendo dentro de 5 dias. Uma alta incidência de morte ocorreu durante as 24h iniciais, o que está de acordo com os critérios de ICA acima mencionados. Além disso, há uma correlação positiva entre DC e PC;^{9,10} portanto, em comparação com os ratos de baixo peso, ratos de alto peso requerem mais DC e terão pós-carga cardíaca mais aumentada do que os ratos de baixo peso com a mesma constrição aórtica. Os resultados do estudo atual (Tabela 1) indicam que os ratos de maior peso apresentaram menor tolerância para CAA, o que se reflete nas taxas de mortalidade. Em relação aos ratos com CAA submetidos a

ligadura com uma agulha de 0,40 mm, todos os ratos nos grupos de 22 g e 26 g morreram. Entretanto, 6 dos 10 ratos sobreviveram no grupo de 18 g.

O diagnóstico de HC geralmente depende de mudanças na função cardíaca e na morfologia.¹¹ A ecocardiografia pode ser realizada in vitro de forma não invasiva durante a primeira avaliação de HC, e é especialmente utilizada para monitorar mudanças na função cardíaca.¹² Realizamos exames ecocardiográficos de ratos no final da semana 4 e da semana 8 pós-cirurgia. Os dados (dados da semana 4 na Tabela 2) mostraram que, no final da semana 4, surgiram fenômenos de paredes ventriculares espessadas, câmaras ventriculares aumentadas e diminuição das funções cardíacas em cada grupo CAA em comparação com os grupos *shams*, e essa diversidade era consistente com as mudanças cardíacas características que ocorrem com a sobrecarga de pressão crônica.^{13,14} Essas tendências se tornaram mais pronunciadas no final da semana 8 (dados da semana 8 na Tabela 2), quando FE e EF, que representam a função cardíaca, foram significativamente menores em comparação com os grupos *shams*. A HC também aumentou o PCo. No nosso estudo, o PCo, as relações PCo/PC e PCo/CT para os grupos CAA foram significativamente aumentados (Tabela 3). O remodelamento cardíaco é a alteração patológica mais típica de HC, incluindo hipertrofia de cardiomiócitos e aumento da matriz extracelular.¹⁵ Nossos resultados histológicos mostraram diâmetros externos aumentados e espessura ventricular em corações totais e seções transversais sob CAA (Figuras 1A e B). A coloração dos grupos CAA mostrou a patologia hipertrofica dos cardiomiócitos e dos núcleos (Figura 1C). A coloração com PSR dos grupos CAA mostrou depósitos extensos de colágeno (Figura 1D), particularmente no espaço perivascular (Figura 1E). A análise estatística mostrou que a espessura do ventrículo esquerdo (Tabela 4) e a porcentagem de depósito de colágeno (Tabela 5) foram significativamente aumentadas nos grupos CAA em comparação com o grupo *sham*. Em relação à formação de colágeno, Kuwahara et al.¹⁶ indicaram que os fibroblastos cardíacos são ativados no dia 3 após SP e que os tecidos fibrosos neoformativos afetam principalmente à função diastólica em vez da função sistólica durante as 4 semanas iniciais. Em seguida, a fibrose miocárdica excessiva está implicada na disfunção sistólica devido à sua tração mais intensa e a função cardíaca começa a se deteriorar significativamente. Quanto aos valores FE e EF para os grupos CAA (Tabela 2), as tendências descendentes da semana 4 para semana 8 estão em conformidade com essa teoria.

Escolher a agulha apropriada é fundamental para estabelecer o modelo HC. Com base nesses resultados, descobrimos que todos os ratos com CAA morreram quando

Tabela 6 – Mudanças de peso corporal com CAA sob agulha de 0,45 mm

	18 g/0,45 mm (n = 8)	22 g/0,45 mm (n = 7)	26 g/0,45 mm (n = 4)
Mudança no PC (g)	8,4 ± 0,8*	4,4 ± 0,8	2,4 ± 0,3

PC: peso corporal; CAA: constrição da aorta abdominal. Os dados são apresentados como média ± DP. * $P < 0,05$ representa uma diferença significativa entre os grupos 18 g/0,45 mm e 22 g/0,45 mm e 26 g/0,45 mm.

Tabela 7 – Peso corporal e mudanças no PC em ratos de 18 g

	18 g/0,40 mm (n = 6)	18 g/0,45 mm (n = 8)	18 g/0,50 mm (n = 10)	18 g/Sham (n = 10)
PC antes da cirurgia (g)	18,1 ± 0,4	18,1 ± 0,3	18,0 ± 0,4	17,9 ± 0,4
PC na semana 8 (g)	25,3 ± 0,4*	26,5 ± 0,9	26,6 ± 0,8	26,8 ± 0,9
Mudança PC (g)	7,2 ± 0,6*	8,4 ± 0,8	8,6 ± 0,6	8,8 ± 0,9

PC: peso corporal. Mudanças no PC de ratos de 18 g antes e após a cirurgia para 8 semanas. Os dados são apresentados como a média ± DP. * $P < 0,05$ representa uma diferença significativa entre o grupo 18 g/0,40 mm e os grupos restantes após a cirurgia.

uma agulha de 0,35 mm foi usada para ligadura para todos os 3 níveis de peso e quando uma agulha de 0,40 mm foi usada para ligadura nos grupos de 22 g e 26 g; portanto, esses 5 grupos de emparelhamentos de agulhas-peso eram claramente inadequados para seu uso. O grupo de 18 g/0,40 mm apresentou HC óbvia comparado com o grupo sham e sua taxa de sobrevivência foi aceitável (6 em 10). No entanto, ainda deve ser excluído porque o grupo 18 g/0,45 mm apresentou HC mais óbvia e maiores taxas de sobrevivência (8 em cada 10) (Tabela 1, Tabela 3). As agulhas de 0,45 mm e 0,50 mm estão disponíveis para todos os 3 níveis de peso, mas ambas podem resultar em hipertrofia miocárdica definitiva. No entanto, os valores do PCo e das relações PCo/PC e PCo/CT para os ratos CAA ao usar a agulha de 0,45 mm foram significativamente maiores do que aqueles quando se usa uma agulha de 0,50 mm para cada nível de peso (Tabela 3). Portanto, para todos os 3 níveis de peso do nosso estudo, um modelo de HC pode ser estabelecido usando uma agulha de 0,50 mm e a taxa de sobrevivência dos ratos não será ameaçada. No entanto, uma agulha de 0,45 mm leva a um modelo de HC mais eficaz e de maior mortalidade do que a agulha de 0,50 mm.

Normalmente, com o modelo HC induzido por SP, as agulhas mais finas criam estenose aórtica mais severa e conduzem a HC mais pronunciada e vice-versa. No entanto, observamos um fenômeno interessante: o nível de HC do grupo 18 g/0,45 mm foi anormalmente maior do que o grupo 18 g/0,40 mm (ratos de 18 g na Tabela 3). Quanto à análise dos dados de PC com CAA (Tabela 6), as mudanças no PC em ratos de 18 g durante as semanas 0 a 8 foram significativamente maiores do que as dos ratos de 22 g e 26 g, indicando que os ratinhos de 18 g têm maior potencial de desenvolvimento físico após a cirurgia e que o desenvolvimento físico é frequentemente acompanhado de desenvolvimento de órgãos.¹⁷ Portanto, o coração de ratos de 18 g também possui maior potencial de desenvolvimento. Para o mesmo nível de peso, a mudança de PC no grupo 18 g/0,45 mm durante as semanas 0 a 8 foi significativamente maior que a do grupo 18 g/0,40 mm (mudança de PC na

Tabela 7). Como foi mencionado, o PC está positivamente relacionado ao DC; portanto, talvez a ligadura maior tenha limitado o DC no grupo 18 g/0,40 mm, que também limitou o desenvolvimento físico e o desenvolvimento de órgãos, incluindo o desenvolvimento do coração. No final da semana 8, não houve diferença significativa no PC para o grupo 18 g/0,45 mm e o 18g/grupo sham; ambos tiveram PC significativamente maior do que o grupo 18 g/0,40 mm (PC na semana 8 na Tabela 7). A agulha de 0,45 mm não tinha limites óbvios em ratos de 18 g, mas a vantagem de PC para o grupo de 18 g/0,45 mm em comparação com o grupo de 18 g/0,40 mm depende de maior DC e requer mais miocárdio hipertrófico para suporte. Assim, para estabelecer modelos de HC para CAA em ratos com potencial de desenvolvimento, como ratos de 18 g, pode haver uma região de intensidade de ligadura especial que pode causar HC mais óbvia do que as duas regiões adjacentes. No entanto, esse fenômeno deve incluir múltiplos fatores e merece maiores estudos.

Conclusão

Estabelecemos modelos de HC usando 4 tamanhos de agulha de ligadura e 3 pesos para ratos. Os dados mostraram que ambas as agulhas de 0,45 mm e 0,50 mm levam a HC. No entanto, a agulha de 0,45 mm traz um modelo mais efetivo e provoca HC óbvia em ratos de 18 g.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Zhen J, Yiming N; Obtenção de dados: Zhen J, Chen Z, Hongfei X, Dongdong J; Análise e interpretação dos dados: Zhen J, Chen Z; Análise estatística: Zhen J, Chen Z, Peng T; Obtenção de financiamento: Hongfei X; Redação do manuscrito: Zhen J, Dongdong J; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Armah MA, Weidong L, Liang M.

Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pelo The National Natural Science Foundation of China (número 81570343).

Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de tese de Doutorado de Zhen Jia pela Zhejiang University.

Aprovação Ética e consentimento informado

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University sob o número de protocolo 2014-17. Todos os procedimentos envolvidos nesse estudo estão de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975, atualizada em 2013. O consentimento informado foi obtido de todos os participantes incluídos no estudo.

Referências

1. Zhao CZ, Zhao XM, Yang J, Mou Y, Chen B, Wu HD, et al. Inhibition of farnesyl pyrophosphate synthase improves pressure overload induced chronic cardiac remodeling. *Sci Rep*. 2016 Dec 23;6:39186. doi: 10.1038/srep39186.
2. Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol*. 2003;65:45-79. doi: 10.1146/annurev.physiol.65.092101.142243.
3. Alla F, Zannad F, Filippatos G. Epidemiology of acute heart failure syndromes. *Heart Fail Rev*. 2007;12(2):91-5. doi: 10.1007/s10741-007-9009-2.
4. Sato N, Lam CS, Teerlink JR, Greenberg BH, Tsutsui H, Oh BH, et al. Evaluating the efficacy, safety, and tolerability of serelaxin when added to standard therapy in Asian patients with acute heart failure: design and rationale of RELAX-AHF-ASIA trial. *J Card Fail*. 2017;23(1):63-71. doi: 10.1016/j.cardfail.2016.10.016.
5. Yamamoto K, Ohishi M, Katsuya T, Ito N, Ikushima M, Kaibe M, et al. Deletion of angiotensin-converting enzyme 2 accelerates pressure overload-induced cardiac dysfunction by increasing local angiotensin II. *Hypertension*. 2006;47(4):718-26. doi: 10.1161/01.HYP.0000205833.89478.5b.
6. Liao Y, Bin J, Asakura M, Xuan W, Chen B, Huang Q, et al. Deficiency of type 1 cannabinoid receptors worsens acute heart failure induced by pressure overload in mice. *Eur Heart J*. 2012;33(24):3124-33. doi: 10.1093/eurheartj/ehr246.
7. Martinez-Rubio A, Schwammenthal Y, Schwammenthal E, Block M, Reinhardt L, Garcia-Alberola A, et al. Patients with valvular heart disease presenting with sustained ventricular tachyarrhythmias or syncope: results of programmed ventricular stimulation and long-term follow-up. *Circulation*. 1997;96(2):500-8. doi: https://doi.org/10.1161/01.CIR.96.2.500.
8. Massengill MT, Ashraf HM, Chowdhury RR, Chrzanowski SM, Kar J, Warren SA, et al. Acute heart failure with cardiomyocyte atrophy induced in adult mice by ablation of cardiac myosin light chain kinase. *Cardiovasc Res*. 2016;111(1):34-43. doi: 10.1093/cvr/cvw069.
9. Foppa M, Arora G, Gona P, Ashrafi A, Salton CJ, Yeon SB, et al. Right ventricular volumes and systolic function by cardiac magnetic resonance and the impact of sex, age, and obesity in a longitudinally followed cohort free of pulmonary and cardiovascular disease: the Framingham Heart Study. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2016;9(3):e003810. doi: 10.1161/CIRCIMAGING.115.003810.
10. Karimian S, Stein J, Bauer B, Teupe C. Impact of severe obesity and weight loss on systolic left ventricular function and morphology: assessment by 2-dimensional speckle-tracking echocardiography. *J Obes*. 2016;2016:2732613. doi: 10.1155/2016/2732613.
11. Elliott P, McKenna WJ. Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet*. 2004;363(9424):1881-91. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16358-7.
12. Zhao B, Wang S, Chen J, Ji Y, Wang J, Tian X, et al. Echocardiographic characterization of hypertrophic cardiomyopathy in Chinese patients with myosin-binding protein C3 mutations. *Exp Ther Med*. 2017;13(3):995-1002. doi: 10.3892/etm.2017.4089.
13. Hunter JJ, Chien KR. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med*. 1999;341(17):1276-83. doi: 10.1056/NEJM199910213411706.
14. Huang CK, Chen BY, Guo A, Chen R, Zhu YQ, Kutschke W, et al. Sildenafil ameliorates left ventricular T-tubule remodeling in a pressure overload-induced murine heart failure model. *Acta Pharmacol Sin*. 2016;37(4):473-82. doi: 10.1038/aps.2016.13.
15. Tsotetsi OJ, Woodiwiss AJ, Netjhardt M, Qubu D, Brooksbank R, Norton GR. Attenuation of cardiac failure, dilatation, damage, and detrimental interstitial remodeling without regression of hypertrophy in hypertensive rats. *Hypertension*. 2001;38(4):846-51. doi: https://doi.org/10.1161/hy1001.092649.
16. Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Kai M, Takeshita A, Egashira K, et al. Transforming growth factor-beta function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats. *Circulation*. 2002;106(1):130-5. doi: https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000020689.12472.E0.
17. Minior VK, Levine B, Ferber A, Guller S, Divon MY. Nucleated red blood cells as a marker of acute and chronic fetal hypoxia in a rat model. *Rambam Maimonides Med J*. 2017;8(2). doi: 10.5041/RMMJ.10302.

Materiais Suplementares

Tabela S1 – Peso corporal dos ratos antes da cirurgia

Peso	0,35 mm	0,40 mm	0,45 mm	0,50 mm	Sham
18 g	18,0 ± 0,4	18,0 ± 0,3	18,1 ± 0,3	18,0 ± 0,4	17,9 ± 0,4
22 g	22,1 ± 0,4	22,0 ± 0,6	21,9 ± 0,6	22,2 ± 0,7	22,1 ± 0,6
26 g	26,0 ± 0,7	26,1 ± 0,5	26,0 ± 0,5	25,9 ± 0,3	26,3 ± 0,5

Não foram encontradas diferenças significativas entre os 5 grupos de acordo com as comparações em pares de cada nível de peso ($p > 0,05$); portanto, o peso corporal pode ser considerado um índice para o mesmo nível de peso. Os dados são apresentados como a média ± DP (g) (n = 10). Os pesos corporais não diferiram significativamente um do outro ($p > 0,05$).

Tabela S2 – Pesos corporais dos ratos antes da constrição aórtica abdominal

Peso	Sobrevivência	Morte
18 g	18,1 ± 0,3 (n = 24)	18,0 ± 0,3 (n = 16)
22 g	22,1 ± 0,7 (n = 17)	22,0 ± 0,5 (n = 23)
26 g	25,9 ± 0,4 (n = 14)	26,1 ± 0,6 (n = 26)

Os dados retrospectivos mostraram que a diferença entre o peso na morte e sobrevivência não era significativa para cada nível de peso ($p > 0,05$), indicando que as diferenças de peso individuais para o mesmo nível de peso não influenciavam a morte pós-operatória. Os dados são apresentados como média ± DP (g).

