

Características Fisiopatológicas del Modelo de Insuficiencia Cardíaca Post Infarto de Miocardio en el Ratón

Paulo J. F. Tucci

Escola Paulista de Medicina - Unifesp

Resumen

La insuficiencia cardíaca congestiva (ICC), desencadenada en el ratón como consecuencia de Infarto de Miocardio, es el modelo más comúnmente utilizado en investigación experimental para desarrollar síndrome congestivo. Siguiendo a la necrosis miocárdica, las manifestaciones que ocurren en el roedor reproducen muy satisfactoriamente los hallazgos encontrados en humanos con descompensación cardíaca, y fundamentan análisis de la patogenia, de la fisiopatología y del tratamiento de la ICC con reconocido provecho clínico. Dos características son inadecuadas en el modelo: la mortalidad elevada en las primeras 24 h que siguen a la oclusión coronaria y la significativa diversidad de tamaños de los infartos obtenidos. En este texto son descritas particularidades metodológicas y fisiopatológicas del modelo, terminando por hacer referencia a una técnica alternativa de producción de necrosis miocárdica por corriente eléctrica con radiofrecuencia, que evoluciona con baja mortalidad y tamaño homogéneo de los infartos.

Hace años la insuficiencia cardíaca congestiva (ICC) se sitúa entre los temas más investigados en Cardiología. Al lado de las informaciones recogidas en humanos, es destacada la contribución de investigaciones conducidas en animales de laboratorio. Entre varios modelos experimentales disponibles, aquel que promueve el síndrome congestivo a partir de la inducción de necrosis miocárdica en el ratón es el más utilizado. La popularidad del modelo en los días actuales y la previsión posible de ampliación del interés por este modelo vuelven importante la descripción de características fisiopatológicas que siguen al infarto de miocardio (IM) en el ratón. Recientemente, una valiosa revisión de la literatura sobre el modelo de infarto de miocardio en el ratón fue publicado en los *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*¹.

Es necesario anticipar que aunque el proceso fisiopatológico que se establece en los roedores después de ligadura de la coronaria sea útil para analizar el remodelado miocárdico

Palabras clave

Insuficiencia cardíaca/fisiopatología, infarto del miocardio, ratones.

que ocurre en el músculo cardíaco remanente y el síndrome congestivo, éste no guarda analogía con los síndromes coronarios humanos. Le faltan al modelo las lesiones arteriales que le confieren perfil propio a la coronariopatía de humanos: arritmias, isquemias transitorias y reincidencias de oclusión coronaria, inexistentes en el animal de experimentación.

La oclusión de la arteria coronaria interventricular anterior es la estrategia más frecuentemente aplicada para la producción de IM.

El electrocardiograma² y el ecocardiograma³⁻¹⁵ son métodos no invasivos capaces de identificar el área de necrosis o cicatriz. Aunque identifique la presencia de la zona inactiva dependiente del IM, el electrocardiograma no es un método apto para cuantificarla². El ecocardiograma posibilita caracterizar la presencia y el tamaño del IM con muy buena sensibilidad³⁻¹⁵, aun en períodos precoces como dos días después de promover la necrosis, además de informar sobre los desvíos de las funciones atrial y ventricular. El mejor método para diagnóstico post mortem del IM depende de la fase en que ocurre la necropsia. En los primeros días de necrosis miocárdica el examen histopatológico puede suscitar dudas en cuanto a los límites del territorio necrosado. Para esta fase, el uso de trifeniltetrazolio (TTZ) es más preciso. En contacto con células vivas, este colorante es reducido por deshidrogenasas y asume un color rojo oscuro. Células muertas, que ya no disponen de las formas reducidas de deshidrogenasas, no son coloreadas. La colocación del miocardio en agua oxigenada, posteriormente, elimina el color rojo de la hemoglobina presente en el hematoma de la región necrosada, aclarándola (Figura 1A). El TTZ posibilita la caracterización de la necrosis inmediatamente después de la muerte celular.

Dos particularidades llaman la atención en el modelo: gran variabilidad en lo que se refiere tanto a la mortalidad en las primeras 24 horas después de la oclusión de la coronaria, como al tamaño del infarto resultante. Los límites de mortalidad descritos en la literatura en la fase inmediata a la oclusión coronaria varían del valor más bajo de 13%¹⁶ hasta el máximo de 65%¹⁷. En nuestro laboratorio, considerando varias series que fueron controladas, la mortalidad inmediata se situó en alrededor de 44% para los ratones machos y de 17% para las ratas. La razón de esta discrepancia entre las mortalidades de los dos géneros no es original, pero su causa no está definida. Hay documentación convincente para afirmar que las arritmias constituyen la causa de muerte durante las 48 h que siguen a la oclusión coronaria¹⁷. Una particularidad importante del modelo es la gran dispersión del tamaño del IM, después de ligadura estandarizada de la arteria coronaria interventricular anterior. En nuestra última

Correspondencia: Paulo José Ferreira Tucci •

Rua Estado de Israel, 181/94 - Vila Clementino - 04022-000

São Paulo, SP - Brasil

E-mail: ptucci@cardiol.br, paulotucci@terra.com.br

Artículo recibido el 29/10/09; revisado recibido el 05/01/10; aceptado el 23/02/10.

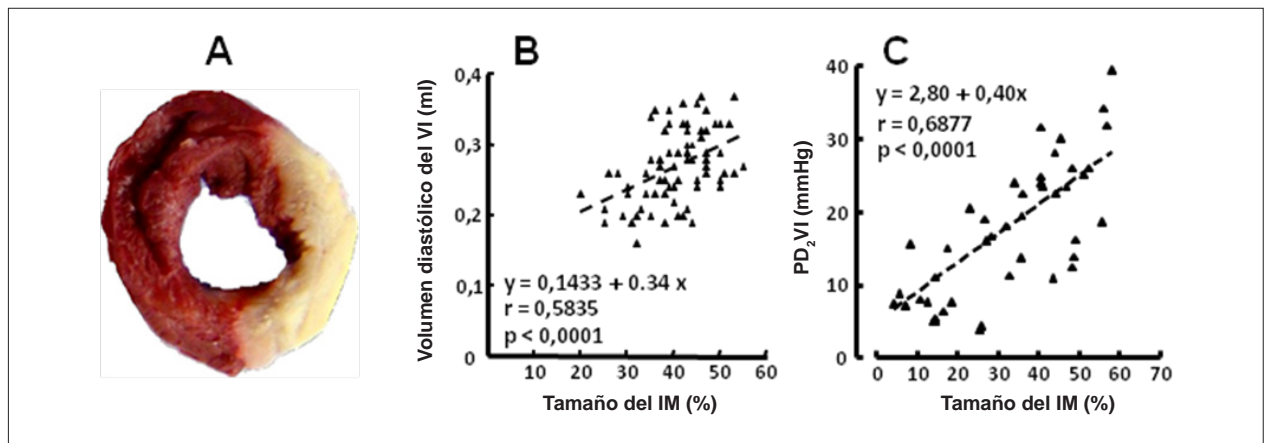


Fig. 1 - Panel A: Corte transversal de corazón sometido a oclusión coronaria 24hs antes, coloreado con trifeniltetrazolio. La zona de necrosis aparece en blanco, contrastando claramente con el miocardio remanente. Son presentadas, aun, las correlaciones lineales encontradas entre el tamaño del infarto de miocardio con el volumen diastólico ventricular (Panel B) y la presión diastólica final (Pd_2VI) del ventrículo izquierdo (Panel C) de ratones infartados semanas antes. Queda caracterizado como estas dos variables crecen proporcionalmente al tamaño del infarto.

serie, conducida para determinar los tamaños de los infartos resultantes de las oclusiones coronarias, verificamos tamaño medio de $40 \pm 19\%$ ($x \pm DE$). La gran variabilidad se hace evidente por el valor elevado del desvío estándar: 48% del valor de la media. Los grandes infartos ($> 40\%$ del VI) - que más interesan para el control de la fisiopatología de la ICC - ocurrieron en 60% de los casos.

Tal como es descrito para humanos, el tamaño del IM es determinante crítico de la repercusión funcional en el corazón. La figura 1B ilustra la correlación que se estableció en el quinto día después de oclusión coronaria⁶ entre el volumen diastólico del ventrículo izquierdo (VI) y el tamaño del IM, mientras que la figura 1C indica la relación que se verificó entre tamaño del IM y la presión diastólica final del ventrículo izquierdo (PDFVI), seis semanas después de inducción de la necrosis miocárdica. Es perceptible la asociación lineal tanto del volumen como de la PDFVI con la magnitud del VI ocupada por el IM. Curiosamente, la presión diastólica ventricular no guardó relación con el tiempo transcurrido después de promoción del IM. La fracción de acortamiento del área transversal* del ventrículo izquierdo, analizada seis semanas después de inducción del infarto, asumió relación lineal inversa con el tamaño de la cicatriz (Figura 2A), configurando disminución creciente de la capacidad de eyección según aumentó el tamaño del IM. En este mismo período post oclusión coronaria, correlaciones más llamativas entre tamaño del IM y repercusiones funcionales fueron verificadas (Figura 2), cuando se analizaron las relaciones entre el tamaño del

IM e indicadores de vaciamiento atrial (razón E/A) y de congestión pulmonar (razón peso del pulmón derecho/peso corporal). Estas razones aumentaron en función exponencial con relación al tamaño del IM (Figuras 2B y 2C), destacándose la particularidad de repercusión ausente o poco significativa, para ambas variables, en infartos que ocupan menos de 25% del perímetro ventricular. Es evidente que no hay alteraciones considerables de esos indicadores mientras el IM es inferior a 25% de la circunferencia del VI, lo que indica que, en el período en que fueron analizados, infartos menores de 25% afectan poco el vaciamiento atrial y, por lo tanto, no inducen la congestión pulmonar.

Una cuestión crucial en el control de ratones infartados es determinar la presencia de ICC porque, en los roedores, los síntomas y señales clínicos del estado congestivo son sutiles y poco frecuentes¹⁸. En series controladas en el laboratorio, todos los animales infartados, que fallecieron durante control más prolongado que una semana, sufrían de ICC, con congestión pulmonar y hepática; las manifestaciones clínicas propias de la ICC pasaron inadvertidas¹⁸. La insuficiencia ventricular izquierda de los ratones infartados puede ser caracterizada indirectamente por método no invasivo (Doppler ecocardiograma; DE), invasivo (presión diastólica ventricular izquierda - Pd_2VI) o post mortem (tenor de agua del pulmón o razón peso del pulmón/peso corporal). El análisis por el DE ofrece información valiosa para el control seriado de los animales, por indicar la dificultad de vaciamiento atrial consecuente a la Pd_2VI elevada. Tanto la razón E/A como el análisis por el Doppler tisular (razón E/En) pueden denunciar la Pd_2VI elevada¹⁵. Curiosamente, en los ratones, el estándar inicial de dificultad de vaciamiento atrial analizado a partir del flujo por la válvula mitral (reducción de la razón E/A) no se manifiesta, al tiempo que se identifica el estándar restrictivo de DE (aumento de la razón E/A). En varias series controladas por nosotros, en ratones normales, los valores medios \pm DE de la razón E/A oscilan poco encima de 2,0. En un conjunto de ratones infartados analizados, valores de la razón E/A superiores a 2,7 identificaron Pd_2VI superior a 12 mmHg con 90% de sensibilidad y 80% de

* No nos valemos más de los volúmenes ventriculares para analizar la función ventricular de ratones por considerar que: la incidencia del ecocardiograma, las implicaciones de la geometría y el reducido tamaño de la cámara - especialmente el volumen sistólico final - comprometen la fidelidad de los valores estimados. Actualmente, damos preferencia a las medidas del área transversal del VI. Por razones equivalentes, no utilizamos más el eco para determinar la masa ventricular, teniendo en cuenta un inconveniente más que se suma: el tamaño muy reducido de la pared de la cavidad (poco mayor de 1 mm) y las imprecisiones de su medida. En el caso de la masa del VI, el descrédito fue fundamentado en comparaciones (test de Bland-Altman) con evaluaciones contemporáneas del peso del VI (datos no publicados).

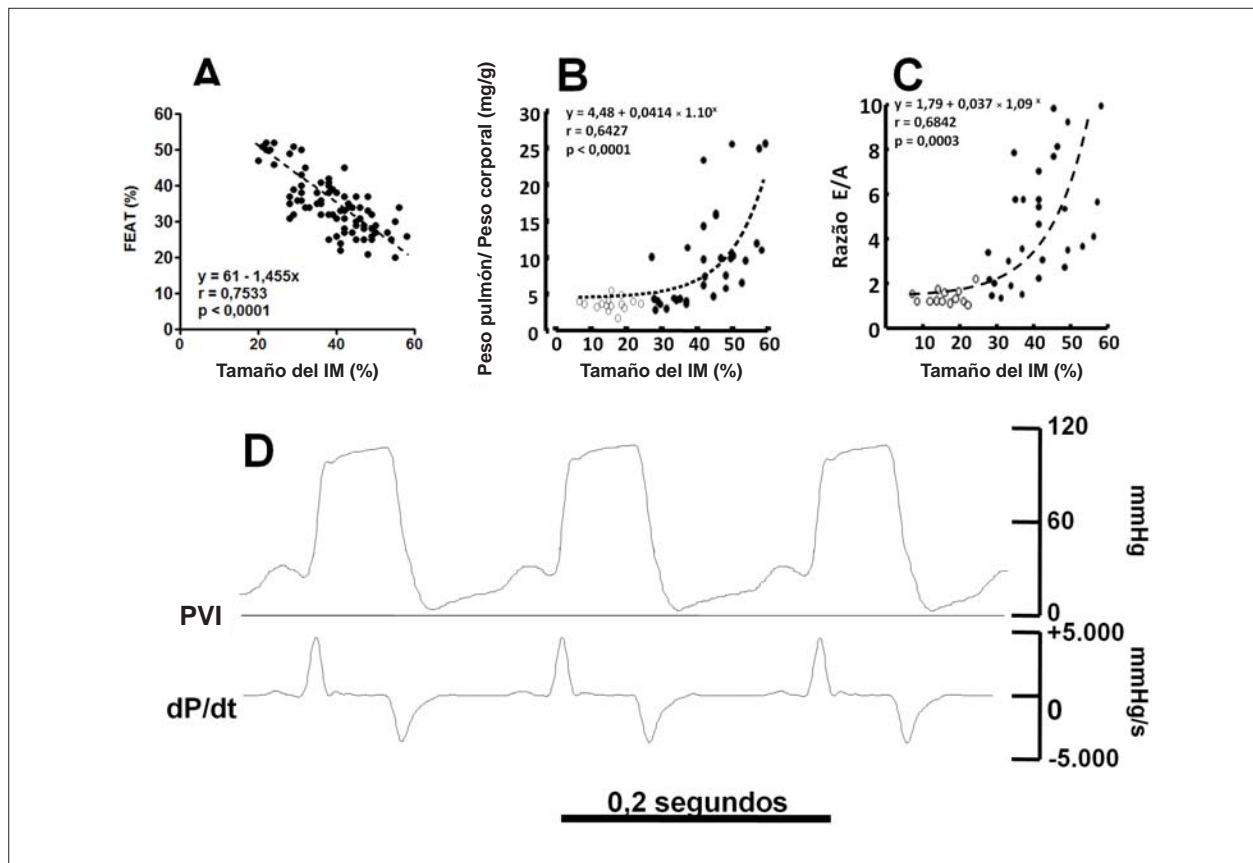


Fig. 2 - Panel A: Correlación lineal inversa entre fracción de acortamiento del área transversal del VI y el tamaño del IM, caracterizando que la capacidad de eyección ventricular es reducida proporcionalmente al tamaño del infarto. En las asociaciones exponenciales que el tamaño del infarto mantiene con la razón peso del pulmón derecho/peso corporal (Panel B) y con la razón E/A (Panel C) es posible identificar que, en el ratón, infartos que ocupan menos de 25% de la circunferencia ventricular despiertan disfunciones ventriculares no significativas. El crecimiento exponencial ocurre después de estos valores. Panel D: Curva de la presión ventricular izquierda (PVI) y de su primera derivada temporal (dP/dt) en ratón portador de Infarto de Miocardio mayor de 40% del perímetro ventricular, 6 semanas después de oclusión coronaria. Notar el aumento destacado de la presión diastólica del VI, durante el reposo, característico de restricción del llenado ventricular. En ratones normales, habitualmente, los valores positivos máximos de la dP/dt son superiores a 7.000 mmHg/s; en el ejemplo, los valores inferiores a 5.000 mmHg/s alertan sobre el compromiso de la capacidad de generar presión, esto es, existencia de disfunción sistólica.

especificidad¹⁵. En una serie más reciente, aun en análisis, el estudio indicó valores de razón E/A de $2,15 \pm 0,44$ en 44 ratones normales. En animales portadores de IM > 40% VI, lo común es verificar medias superiores a 4,0. Esa parece ser la información no invasiva más confiable de que la Pd_2VI está en nivel elevado¹⁵ y, por lo tanto, estamos delante de un portador de ICC. Cabe, por lo tanto, señalar el mérito del DE en volver evidentes disfunciones ventriculares clínicamente ocultas, a través de la determinación de las razones entre dimensiones ventriculares (diámetro, área, volumen) sistólicas y diastólicas". Se considera, también, que el índice de TEI es capaz de indicar la función sistólica ventricular^{3,19}. Adiciónese la capacidad del DE de ofrecer indicaciones capaces de detectar hipertensión pulmonar⁷ y de pronosticar sobrevida¹⁴ en ratones. La detección hemodinámica de la disfunción ventricular se caracteriza por una tenue reducción de la presión sistólica y aumento perceptible de la Pd_2VI (Figura 2D). En animales anestesiados, respirando espontáneamente, sin ventilación mecánica, identificamos valores límites de 12 mmHg para el nivel superior admisible como normal para la Pd_2VI ¹⁵.

No raramente, la curva de la presión diastólica asume morfología muy sugestiva de la restricción al llenado ventricular (Figura 2D). El tenor de agua de los órganos* es una variable rigurosamente controlada dentro de límites bastante estrechos. En el caso del pulmón, el valor medio normal es de 79% y la variabilidad extremadamente baja (desvío estándar de 1%). Esas características vuelven el tenor de agua del pulmón un indicador muy sensible para caracterizar la presencia de congestión pulmonar cuando consideramos un grupo de animales infartados, pues la variabilidad baja facilita la significación estadística de la diferencia entre medias. Con todo, cuando se analizan valores individuales de animales infartados, el rigor fisiológico en el control del tenor de agua dificulta la identificación de valores anormales aislados, una vez que las diferencias individuales entre los normales y los patológicos, habitualmente, no asumen niveles significativos. Para el análisis individual, la relación peso del pulmón derecho/peso corporal es un indicador de mayor sensibilidad,

* Tenor de agua (%) = (peso húmedo - peso seco / peso húmedo) x 100.

dada la franja más amplia ($3,83 \pm 0,63$ mg/g) de los valores normales de esta razón. En ratones normales, es muy raro que esta razón supere el valor de 5 mg/g, algo que, usualmente, ocurre en animales con síndrome congestivo. Datos de laboratorio indican que, comúnmente, al final de la primera semana después de la instalación de la necrosis miocárdica, los ratones con IM > 40% tienen congestión pulmonar²⁰. Notificaciones de la literatura dan cuenta de que, ya en la primera semana post IM, variables neurohormonales se desvían de lo normal²¹ en ratones portadores de grandes infartos.

En la fase aguda del IM, el factor determinante de la disfunción ventricular es la pérdida de cardiomiocitos. El daño inevitable para la función eyectora acarrea aumento del volumen residual del VI y, por lo tanto, dilatación ventricular. Evidenciamos que dos días después de inducción de oclusión coronaria las dimensiones ventriculares están ampliadas²². El aumento del volumen de la cavidad ventricular es el promotor del remodelado miocárdico de la fase crónica. Recurriendo a la ley de Laplace* es posible comprender que una cavidad dotada de gran radio aumenta la fuerza exigida para generar determinada presión, esto es, aumenta la post carga. La dilatación de la cavidad ventricular es reconocida, hace años, como factor crítico en la determinación del remodelado y de la disfunción ventricular²³. Trabajos de nuestro laboratorio documentaron la importancia del volumen ventricular expandido en la capacidad de generar presión⁸ y de eyectar⁷. La reducción de la eyección se manifiesta inmediatamente después de la promoción de la necrosis miocárdica. Ratones estudiados inmediatamente después de oclusión de las coronarias tienen reducción de la fracción de acortamiento del área transversal (FEAT) del VI (datos no publicados). Dos días después, la FEAT asume valores que permanecerán estables hasta las fases más avanzadas del remodelado y ICC^{20,22}. En las fases iniciales, el compromiso de la contractilidad del miocardio remanente no contribuye a la disfunción ventricular. Ratones analizados tres semanas después de oclusión arterial denotaron señales claras de disfunción ventricular, aunque no haya sido identificado afectación del inotropismo del miocardio no envuelto en la necrosis^{11,24}.

En las últimas décadas el modelo experimental de ICC secundaria al IM, en los ratones, vienen contribuyendo notoriamente para analizar la fisiopatología y la terapéutica

del síndrome congestivo, no obstante sus dos grandes problemas: mortalidad inmediata elevada y heterogeneidad del tamaño del IM. Buscando superar estos inconvenientes, hace algunos años fue descrito un modelo de IM promovido por crioinjuria²⁵. Nuestra experiencia con esta técnica no fue satisfactoria (datos no publicados). Es grande el número de congelamientos del miocardio necesarios para conseguir necrosis, no siempre la lesión es transmural y, no raramente, las maniobras para obtener la hipotermia miocárdica acarrear asistolia definitiva. Más recientemente, describimos²⁰ modelo original de promoción de necrosis miocárdica en el VI de ratones a consecuencia de ablación por corriente eléctrica con radiofrecuencia (CRF), tal como habitualmente es aplicada en la clínica para corrección de arritmias. El propósito fue buscar una técnica que posibilitase la obtención de IM con menor variabilidad de tamaño, y menor ocurrencia de mortalidad inmediata. Verificamos infartos con tamaño de $45 \pm 8\%$ de la circunferencia ventricular. La menor dispersión del tamaño del IM obtenido por CRF está caracteriza por desvío estándar significativamente menor que aquel verificado para el tamaño del IM obtenido por oclusión de la descendente anterior. La mortalidad inmediata constatada para la técnica de CRF fue de 7%. Paralelamente, documentamos que, cuando infartos de tamaños semejantes son comparados, la evolución de las disfunciones miocárdica y ventricular, así como la de congestión pulmonar, encontradas en el IM obtenido por CRF fueron equivalentes a aquellas despertadas por la oclusión coronaria. Añádase a eso la posibilidad de controlar el tamaño del infarto variando el tamaño del electrodo positivo utilizado o las características de energía y de duración de la CRF liberada en el miocardio. Más recientemente, testeamos, con igual éxito, esta nueva técnica en ratones domésticos. El interés en la utilización de este modelo debe ampliarse ya a corto plazo, dada la expansión contemporánea de los estudios de tratamiento post infarto de miocardio con células tronco.

Potencial Conflicto de Intereses

Declaro no haber conflicto de intereses pertinentes.

Fuentes de Financiamiento

El presente estudio fue financiado pela FAPESP, CNPq y UNIFESP.

Vinculación Académica

No hay vinculación de este estudio a programas de post grado.

* La fuerza (F) desarrollada por el miocardio para generar determinada presión (P) en el interior de la cavidad es directamente proporcional al radio de la cavidad (R) e inversamente proporcional al espesor de la pared (h): $F = P \times R/2h$.

Referencias

1. Zornof LAM, Paiva SAR, Minicucci MF, Spadaro J. Infarto do miocárdio experimental em ratos: análise do método. *Arq Bras Cardiol*. 2009; 93: 434-40.
2. Bonilha AMM, Saraiva RM, Kanashiro RM, Portes LA, Antonio EL, Tucci PJF. A routine electrocardiogram should not be used to determine the size of myocardial infarction in the rat. *Braz J Med Biol Res*. 2005; 38: 615-9.
3. Cury AF, Bonilha AMM, Saraiva RM, Campos FO, Carvalho AC, de Paola AAV, et al. Myocardial performance index in female rats with myocardial infarction: relationship with ventricular function parameters by Doppler echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr*. 2005; 18 (5): 454-60.
4. dos Santos L, Mello AF, Antonio EL, Tucci PJF. Determination of myocardial infarction size in rats by echocardiography and tetrazolium staining:

Artículo de Revisión

- correlating, agreements, and simplification. *Braz J Med Biol Res.* 2008; 41 (3): 199-201.
5. dos Santos L, Serra AJ, Antonio EL, Hull HF, Tucci PJF. Hiperbaric oxygenation applied immediately after coronary occlusion reduces myocardial necrosis and acute mortality in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2009; 36 (5-6): 594-8.
 6. Helber I, Santos AA, Antonio EL, Flumignan RLC, Bocalini D, Piccolo C, et al. Digitoxin prolongs survival of female rats with heart failure due to large myocardial infarction. *J Card Fail.* 2009; 15 (9): 798-804.
 7. Kanashiro RM, Saraiva RM, Alberta A, Antonio EL, Moisés VA, Tucci PJF. Immediate functional effects of left ventricular reduction: a Doppler echocardiographic study in the rat. *J Card Fail.* 2006; 12 (2): 163-9.
 8. Kanashiro RM, Nozawa E, Murad N, Gerola LR, Moisés VA, Tucci PJF. Myocardial infarction scar plication in the rat: cardiac mechanics in an animal model for surgical procedures. *Ann Thorac Surg.* 2002; 73 (5): 1507-13.
 9. Nozawa E, Kanashiro R, Murad N, Carvalho ACC, Cravo SL, Campos O, et al. Performance of two-dimensional Doppler echocardiography for the assessment of infarct size and left ventricular function in rats. *Braz J Med Biol Res.* 2006; 39 (5): 687-95.
 10. Moisés VA, Ferreira RL, Nozawa E, Kanashiro RM, Campos Fo O, Andrade JL, et al. Structural and functional characteristics of rat hearts with and without myocardial infarct: initial experience with Doppler echocardiography. *Arq Bras Cardiol.* 2000; 75 (2): 125-36.
 11. Peron APON, Saraiva RM, Antonio EL, Andriolo A, Tucci PJF. Food restriction does not impair myocardial mechanics during the healing period of myocardial infarction in the rat. *Nutr Res.* 2005; 25: 1075-84.
 12. Portes LA, Tucci PJF. O treinamento físico por natação atenua o remodelamento miocárdico e congestão pulmonar em ratas Wistar com insuficiência cardíaca secundária a infarto do miocárdio. *Arq Bras Cardiol.* 2006; 87: 54-9.
 13. Portes LA, Saraiva RM, Santos AA, Tucci PJF. Swimming training attenuates remodeling, contractile dysfunction and congestive heart failure in rats with moderate and large myocardial infarction. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2009; 36: 394-9.
 14. Santos AA, Helber I, Flumignan RLC, Antonio EL, Carvalho AC, Paola AAV, et al. Doppler echocardiographic predictors of mortality in female rats after myocardial infarction. *J Card Fail.* 2009; 15 (2): 163-8.
 15. Saraiva RM, Kanashiro RM, Antonio EL, Campos Fo O, Tucci PJF, Moisés VA. Rats with high left ventricular end-diastolic pressure can be identified by Doppler echocardiography one week after myocardial infarction. *Braz J Med Biol Res.* 2007; 40 (11): 1557-65.
 16. Jain M, Liao R, Ngoy S, Whittaker P, Apstein CS, Eberli FR. Angiotensin II receptor blockade attenuates the deleterious effects of exercise training on post-MI ventricular remodeling in rats. *Cardiovasc Res.* 2000; 46 (1): 66-72.
 17. Opitz CF, Mitchell GF, Pfeffer MA, Pfeffer JM. Arrhythmias and death after coronary artery occlusion in the rat: continuous telemetric ECG monitoring in conscious, untethered rats. *Circulation.* 1995; 92 (2): 253-61.
 18. Flumignan RL, Kanashiro RM, Saraiva RM, Portes LA, Antonio EL, Ishiga MMS, et al. Incidence of heart failure in infarcted rats that die spontaneously. *Braz J Med Biol Res.* 2006; 39 (10): 1-6.
 19. Barberato SH, Pecoits Filho R. Influência da redução da pré-carga sobre o índice de desempenho miocárdico (Índice de Tei) e outros parâmetros Doppler ecocardiográficos da função ventricular esquerda. *Arq Bras Cardiol.* 2006; 86: 425-31.
 20. Antonio EL, Santos AA, Araujo SRR, Bocalini D, dos Santos L, Fenelon G, et al. Left ventricle radio-frequency ablation in the rat: a new model of heart failure due to myocardial infarction homogeneous in size and low in mortality. *J Card Fail.* 2009; 15 (6): 540-8.
 21. 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 (4): R1734-R1745.
 22. Santos L, Santos AA, Gonçalves GA, Krieger JE, Tucci PJF. Bone marrow cell therapy prevents infarct expansion and improves border zone remodeling after coronary occlusion in rats. *J Card Fail.* 2009 [ahead of print].
 23. White HD, Norris RM, Brown MA, Brandt PWT, Whitlock RML, Wild CJ. Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction. *Circulation.* 1987; 76 (1): 44-51.
 24. Peron APON, Saraiva RM, Antonio EL, Tucci PJF. A função mecânica do miocárdio remanescente a um infarto do miocárdio é normal durante o período de cicatrização, embora exista insuficiência cardíaca. *Arq Bras Cardiol.* 2006; 86: 105-12.
 25. Huwer H, Winning J, Vollmar B, Welter C, Menger MD, Schafers HJ. Model of chronic systolic and diastolic dysfunction after cryothermia-induced myocardial necrosis in rats. *Comp Med.* 2000; 50 (4): 385-90.