

Estudo Evolutivo da Morfologia e Função Cardíaca em Ratos Submetidos a Estenose Aórtica Supravalvar

Henrique Barbosa Ribeiro, Katashi Okoshi, Antonio Carlos Cicogna, Edson Antonio Bregagnollo, Maria Aparecida Marchesan Rodrigues, Carlos Roberto Padovani, Flávio Ferrari Aragon, Elenize Jamas, Marina Politi Okoshi

Botucatu, SP

Objetivo - Caracterizar, evolutivamente, o modelo experimental de hipertrofia ventricular esquerda (HVE) por indução de estenose aórtica supravalvar em ratos jovens.

Métodos - Ratos Wistar foram submetidos a toracotomia para colocação de clipe ao redor da aorta torácica (grupo EAo, n=12). Animais controle foram submetidos à mesma cirurgia, porém sem a colocação do clipe (grupo C, n=12). A função cardíaca foi analisada por ecocardiogramas seriados após 6, 12 e 21 semanas. Outros grupos foram utilizados para avaliação histológica e quantificação da hidroxiprolina miocárdica (HOP: 2, 6, 12 e 21 semanas).

Resultados - A EAo promoveu precocemente HVE concêntrica e aumento progressivo da concentração de HOP. À microscopia óptica, observou-se hipertrofia dos miócitos e da camada média dos ramos intramurais das artérias coronárias. A função sistólica foi supranormal no período 6 semanas (porcentagem de encurtamento - EAo₆: 70,3±10,8; C₆: 61,3±5,4; p<0,05), apresentando-se reduzida apenas no último período. A partir de 12 semanas, verificou-se disfunção diastólica (E/A - EAo₁₂: 4,20±3,25; C₁₂: 1,61±0,16; p<0,05).

Conclusão - A indução de EAo promove HVE concêntrica e fibrose miocárdica. A função cardíaca, dependendo do período de análise, encontra-se melhorada, normal ou deprimida. O modelo é adequado e potencialmente útil para estudos sobre a fisiopatologia e tratamento nas diferentes fases evolutivas da hipertrofia cardíaca.

Palavras-chave: hipertrofia miocárdica, ecocardiograma, função ventricular, estenose aórtica, ratos.

A hipertrofia cardíaca representa um importante mecanismo adaptativo, ocorrido em resposta à sobrecarga hemodinâmica crônica, permitindo o coração de manter suas funções básicas em vigência de aumento das condições de carga^{1,2}. Entretanto, a hipertrofia ventricular esquerda constitui um fator de risco para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca congestiva e morte súbita³.

Diversos modelos experimentais têm sido propostos para o estudo da hipertrofia ventricular esquerda por sobrecarga pressórica. Entre eles, destacam-se a indução de estenose de artéria renal⁴ e de aorta abdominal^{5,6} ou torácica⁷, ou mesmo o desenvolvimento de animais geneticamente modificados, como o rato espontaneamente hipertenso⁸⁻¹². No entanto, muitos desses modelos animais apresentam limitações para seu uso em trabalhos experimentais. Por exemplo, a indução de estenose de artéria renal ou de aorta abdominal, em ratos, além de acarretar hipertensão arterial sistêmica e hipertrofia ventricular esquerda, pode também promover importante ativação sistêmica do sistema nervoso adrenérgico e do sistema renina-angiotensina-aldosterona¹³⁻¹⁵. A intensa ativação neurohormonal está associada à ocorrência de importantes lesões cardíacas, como necrose miocárdica, peri-arterite e fibrose reparativa^{4,6}. Desta maneira, estes modelos podem ser muito agressivos ao miocárdio e, portanto, pouco representativos das lesões que se desenvolvem, gradualmente, em humanos com sobrecarga pressórica crônica. Por outro lado, os ratos espontaneamente hipertensos desenvolvem aumento gradual da pressão arterial sistêmica a partir de um mês de idade e, aos três meses, já apresentam estabelecida hipertrofia ventricular esquerda^{16,17}. Entretanto, esses ratos exibem longo período de hipertrofia miocárdica estável, sem desenvolver insuficiência cardíaca, ocorrida, em geral, somente a partir de 20 meses de idade^{9,11,18}. Portanto, embora nesse modelo as alterações cardíacas sejam semelhantes às que ocorrem na cardiopatia hipertensiva humana^{9,16}, há um custo muito elevado para os estudos de prevenção e tratamento de insuficiência cardíaca, porque os animais têm que ser mantidos em biotério por longo período de tempo.

Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP

Correspondência: Henrique Barbosa Ribeiro - Faculdade de Medicina de Botucatu,

UNESP - Depto de Clínica Médica - Rubião Júnior, S/N - Cep 18618-000

Botucatu, SP - E-mail: henrique37@terra.com.br

Recebido para publicação em 5/12/02

Aceito em 23/2/03

Mais recentemente, o modelo de estenose da aorta ascendente tem sido utilizado para promover o desenvolvimento gradual de hipertrofia ventricular esquerda em ratos jovens^{7,19-25}. Os animais, três a quatro semanas após o nascimento, são submetidos a toracotomia mediana para colocação de clipe, com cerca de 0,6mm de diâmetro interno, ao redor da aorta torácica, 2 a 3mm acima de sua raiz. Imediatamente após a colocação do clipe, o diâmetro da aorta se mantém preservado; com o crescimento do animal e a manutenção do diâmetro do vaso, ocorre o aparecimento progressivo da estenose aórtica. Precocemente, os ratos desenvolvem hipertrofia ventricular esquerda que está associada, a curto prazo, com melhora da função sistólica do coração; a seguir, os animais começam a apresentar depressão do desempenho mecânico do coração e desenvolvem quadro clínico de insuficiência cardíaca, a partir de 20 semanas após a indução da estenose aórtica^{7,20,26-28}. Neste modelo de hipertrofia ventricular esquerda, não existe ativação sistêmica do sistema nervoso simpático ou do sistema renina-angiotensina-aldosterona^{7,21,26,29}. Provavelmente, em decorrência desse fato, a avaliação histológica, realizada 21 semanas após a indução da estenose aórtica, não revelou a presença de importantes lesões cardíacas, como periarterite, necrose miocárdica ou áreas extensas de fibrose^{7,26}.

As vantagens deste modelo experimental são o desenvolvimento gradual de hipertrofia ventricular esquerda, a ausência de severas lesões anatômicas no miocárdio e o baixo custo para a manutenção dos animais devido ao curto período necessário para o desenvolvimento de hipertrofia ventricular esquerda e de insuficiência cardíaca. Nos vários trabalhos realizados com este modelo^{7,19-21,26,30,31}, foram utilizados diferentes períodos para a análise morfológica e/ou funcional do coração, não existindo estudos sobre a avaliação simultânea e evolutiva da histologia miocárdica e da função cardíaca após a indução da estenose aórtica.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar, evolutivamente, o modelo experimental de hipertrofia ventricular esquerda por estenose aórtica supraavulvar, em ratos Wistar jovens, por meio de avaliação morfológica e funcional do coração. A morfologia miocárdica foi analisada, à microscopia óptica, 2, 6, 12 e 21 semanas após a indução da estenose aórtica e a função cardíaca foi avaliada, *in vivo*, por meio de estudo ecocardiográfico, realizado 6, 12 e 21 semanas após a colocação do clipe na aorta ascendente. Adicionalmente, o conteúdo de colágeno foi quantificado pela determinação seriada da concentração de hidroxiprolina no ventrículo esquerdo.

Métodos

Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso corporal de 90 a 100g, provenientes do Biotério do Campus de Botucatu da Universidade Estadual Paulista (UNESP). Os animais foram mantidos em gaiolas, com quatro ratos por caixa, à temperatura ambiente de 23°C, com ciclos de luminosidade de 12h e alimentados com ração Purina e água *ad libitum*. O protocolo utilizado foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

Após anestesia com cloridrato de cetamina (50 mg/kg intramuscular) e cloridrato de xilidino (10 mg/kg intramuscular), os ratos foram submetidos a toracotomia mediana. A seguir, a aorta ascendente foi dissecada e um clipe de prata, com 0,6mm de diâmetro interno, foi colocado a, aproximadamente, 3mm da raiz da aorta. Durante a cirurgia, os ratos foram ventilados manualmente, com pressão positiva. Os animais controles foram submetidos à mesma cirurgia, porém sem a colocação do clipe.

Os ratos foram divididos em dois grupos: controle (C) e estenose aórtica (EAo). Para avaliação morfológica e bioquímica (dosagem de hidroxiprolina), cinco a sete animais de cada grupo foram mortos 2, 6, 12 e 21 semanas após a indução da EAo. Os subgrupos formados receberam a denominação: C₂, C₆, C₁₂, C₂₁ e EAo₂, EAo₆, EAo₁₂ e EAo₂₁.

Outros grupos de ratos (C e EAo) foram constituídos somente para o estudo funcional. Como esta avaliação foi feita *in vivo* e sem posterior sacrifício dos animais, os mesmos ratos foram analisados em três períodos experimentais: 6, 12 e 21 semanas após a indução da EAo (n = 12 para os grupos C e EAo). Devido à dificuldade em nosso serviço para a obtenção de imagens ecocardiográficas adequadas em ratos de baixo peso, o estudo funcional não foi realizado no período de 2 semanas após a indução da EAo.

Os ratos foram pesados, anestesiados com pentobarbital sódico (50mg/kg intraperitoneal) e submetidos a toracotomia mediana para a remoção do coração, lavado rapidamente em soro fisiológico. A seguir, os ventrículos direito (VD) e esquerdo (VE) foram dissecados e pesados separadamente. Da parte central do ventrículo esquerdo, foi cortado um anel com 2 a 3mm de espessura, compreendendo toda a extensão de sua parede. O material foi imerso em formalina 10% neutra e tamponada, durante 48h, a 4°C. Após esse período, o tecido foi lavado, desidratado e incluído em parafina. Cortes histológicos com 5 a 7µm de espessura foram submetidos à coloração por hematoxilina e eosina e analisados em microscopia óptica.

A análise morfométrica foi realizada utilizando-se uma câmara de vídeo acoplada a um microscópio Leica conectado a computador equipado com um programa analisador de imagem (*Image-Pro Plus 3.0, Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA*). Em secções transversas do ventrículo esquerdo, foram medidas as áreas seccionais (AS) de, no mínimo, 50 fibras cardíacas cujo núcleo era claramente identificado no centro da célula.

A concentração miocárdica de hidroxiprolina foi mensurada em tecido obtido da ponta do ventrículo esquerdo, de acordo com o método descrito por Switzer³², utilizando-se a técnica previamente descrita em outros trabalhos de nosso laboratório³³⁻³⁵.

O grau de hipertrofia ventricular foi avaliado pela relação entre o peso úmido dos ventrículos direito e esquerdo e o peso corporal dos animais.

Os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50 mg/kg) e cloridrato de xilidino (1 mg/kg), administrados por via intramuscular, em seguida, realizada tricotomia na região anterior do tórax e os animais posicionados em decúbito

lateral esquerdo para realização do ecocardiograma³⁶, utilizando o modelo *Sonos 2000 da Hewlett-Packard Co.*, equipado com transdutor eletrônico de 7,5MHz de frequência.

Para mensuração das estruturas cardíacas, foram obtidas imagens em modo monodimensional (modo-M) com feixe de ultra-som orientado pelas imagens em modo bidimensional, estando o transdutor em posição para-esternal eixo menor. A imagem do ventrículo esquerdo foi obtida posicionando o cursor do modo-M logo abaixo do plano da valva mitral no nível dos músculos papilares^{22,37,38}. As imagens da aorta (AO) e do átrio esquerdo (AE) foram obtidas com o cursor do modo-M posicionado ao nível do plano da valva aórtica. As imagens obtidas 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.

Os diâmetros diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) do ventrículo esquerdo foram medidos no momento do ciclo cardíaco em que seus valores eram máximo e mínimo, respectivamente. A espessura diastólica da parede posterior do ventrículo esquerdo (EDVE) foi medida no mesmo momento do ciclo cardíaco em que foi realizada a medida do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo. O diâmetro da raiz da aorta (AO) foi obtido no instante imediatamente anterior à abertura da valva aórtica. O átrio esquerdo (AE) foi medido no momento em que seu diâmetro era máximo^{22,38}. Foram derivadas das dimensões acima descritas: espessura relativa do ventrículo esquerdo (EDVE/DDVE), AE/AO, DDVE/PC e AE/PC.

A função sistólica do ventrículo esquerdo foi avaliada pela porcentagem de encurtamento (ΔD): $[(DDVE - DSVE) / DDVE] \times 100$, e a função diastólica analisada pela razão entre picos de velocidade de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral.

Um dia após a realização do ecocardiograma correspondente ao período de 21 semanas, os animais foram mor-

tos sob anestesia com pentobarbital sódico. Nesse momento, procurou-se identificar sinais de insuficiência cardíaca, segundo Conrad e cols.³⁹ e Cicogna e cols.^{11,18}: taquipnéia, derrame pleuro-pericárdico, ascite e presença de trombo no átrio esquerdo.

Com relação à análise estatística, os dados numéricos estão expostos como média \pm desvio padrão. O estudo das variáveis morfométricas e da concentração miocárdica de hidroxiprolina foi realizado pelo método de análise de variância (ANOVA) para o esquema fatorial 2 X 4, para o modelo inteiramente casualizado, complementado com o teste de comparações múltiplas de *Tukey*. Os resultados obtidos no estudo ecocardiográfico foram analisados pelo método de análise de variância dos perfis multivariados para grupos dependentes (MANOVA). O nível de significância considerada foi de 5%.

Resultados

Os parâmetros corporais estão expostos na tabela I. O peso corporal foi semelhante entre os grupos EAo e C somente no período de 2 semanas após a cirurgia. A seguir, ocorreram variações significantes entre os grupos: após 6 semanas o peso corporal foi maior no C e, após 12 e 21 semanas, foi menor nos C em comparação com os grupos EAo. O peso do ventrículo esquerdo foi sempre maior nos grupos EAo em relação aos respectivos C. Na avaliação evolutiva, o peso do ventrículo esquerdo aumentou significativamente entre 2 e 6 semanas nos dois grupos, C e EAo, e não se alterou nos outros períodos de análise. O peso do ventrículo direito foi maior no grupo EAo que no C somente no período 21 semanas. Na avaliação evolutiva, o peso do VD apresentou o mesmo comportamento que o peso do ventrículo esquerdo nos grupos C e mostrou o seguinte resultado nos grupos EAo: $EAo_2 < (EAo_6 = EAo_{12}) < EAo_{21}$. A relação VE/PC foi maior em EAo nos quatro períodos anali-

Tabela I - Parâmetros corporais dos ratos

		Período experimental (semanas)			
		2 (n=5)	6 (n=7)	12 (n=7)	21 (n=7)
PC (g)	C	155 \pm 9 ^a	395 \pm 33 ^b	383 \pm 18 ^b	403 \pm 40 ^b
		NS	*	*	*
VE (g)	EAo	161 \pm 10 ^a	348 \pm 42 ^b	418 \pm 39 ^c	440 \pm 48 ^c
	C	0,43 \pm 0,03 ^a	0,83 \pm 0,07 ^b	0,80 \pm 0,07 ^b	0,83 \pm 0,08 ^b
VD (g)	EAo	0,65 \pm 0,08 ^a	1,26 \pm 0,12 ^b	1,26 \pm 0,16 ^b	1,41 \pm 0,22 ^b
	C	0,15 \pm 0,02 ^a	0,24 \pm 0,04 ^b	0,26 \pm 0,04 ^b	0,25 \pm 0,04 ^b
VE/PC (mg/g)	EAo	0,15 \pm 0,02 ^a	0,25 \pm 0,05 ^b	0,26 \pm 0,04 ^b	0,40 \pm 0,14 ^c
	C	2,76 \pm 0,14 ^b	2,10 \pm 0,19 ^a	2,09 \pm 0,12 ^a	1,92 \pm 0,15 ^a
VD/PC (mg/g)	EAo	4,07 \pm 0,44 ^c	3,64 \pm 0,22 ^b	3,01 \pm 0,19 ^a	3,20 \pm 0,39 ^a
	C	0,96 \pm 0,11 ^b	0,61 \pm 0,07 ^a	0,67 \pm 0,09 ^a	0,57 \pm 0,06 ^a
	EAo	0,96 \pm 0,15 ^b	0,72 \pm 0,12 ^a	0,63 \pm 0,11 ^a	0,92 \pm 0,30 ^b

C - controle; EAo - estenose aórtica supra-avalvar; PC - peso corpóreo; VE - peso do ventrículo esquerdo; VD - peso do ventrículo direito. ANOVA e Tukey. ^{a, b, c} - grupos que não têm a mesma letra apresentam diferenças estatisticamente significantes entre os quatro momentos de avaliação (p<0,05); * p < 0,05 vs respectivo grupo controle; NS - não significante.

sados. Nos grupos C, a relação foi maior em C₂ que nos demais momentos e, nos ratos com EAo, teve o seguinte comportamento: EAo₂>EAo₆>(EAo₁₂=EAo₂₁). A relação VD/PC foi maior no grupo EAo que no C somente no último período de avaliação. Nos grupos C, esta relação foi maior em C₂ que nos demais momentos e, nos grupos EAo, foi semelhante nos períodos 2 e 21 semanas, ambos maiores que em 6 e 12 semanas.

Dos 12 animais do grupo EAo que evoluíram por 21 semanas, 3 apresentaram sinais de insuficiência cardíaca incluindo taquipnéia, derrame pleural e ascite.

À avaliação histológica do ventrículo esquerdo, os grupos C tiveram morfologia normal. Nos grupos EAo, observou-se hipertrofia progressiva dos miócitos a partir de 2 semanas de evolução. Os ramos intramurais das artérias coronárias apresentaram hipertrofia da camada média, que era discreta após 2 e 6 semanas, tornando-se mais evidente a partir de 12 semanas (fig. 1). Não se observou necrose de fibras miocárdicas, fibrose intersticial ou peri-arterite em todos os momentos estudados.

A área seccional dos miócitos do ventrículo esquerdo foi significativamente maior nos grupos EAo que nos C, em todos os momentos estudados. Em ambos os grupos, ocorreu aumento progressivo das áreas seccionadas miocitárias durante o processo evolutivo (fig. 2).

A concentração miocárdica de hidroxiprolina foi maior nos grupos EAo que nos C, a partir de 6 semanas de evolução; nos C, a concentração foi semelhante em todos os períodos de avaliação e, nos EAo, ocorreu aumento progressivo de seus valores com a evolução do processo hipertrófico (fig. 3).

As médias e os desvios padrão das medidas do ventrículo esquerdo, átrio esquerdo e aorta estão apresentados na tabela II. DDVE foi semelhante nos grupos C e EAo nos três momentos avaliados e foi maior nos períodos 12 e 21 semanas em relação a 6 semanas em ambos os grupos. Quando normalizada para PC, a variável teve comportamento se-

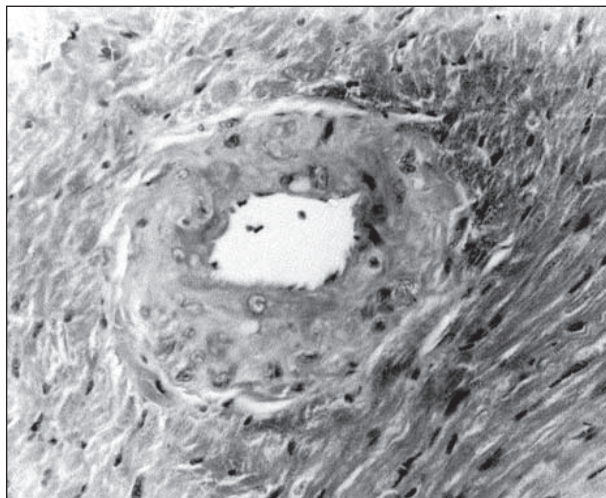


Fig. 1 - Hipertrofia da camada média de ramo intramural de artéria coronária em rato com estenose aórtica supralvar após 21 semanas. HE. 400X.

melhante nos grupos C e EAo, havendo redução progressiva de seus valores durante a avaliação evolutiva (p<0,05). DSVE foi menor em EAo₆ que C₆. No grupo C, este parâmetro não se alterou durante o período experimental e, no grupo EAo, o momento 21 semanas foi significativamente maior que 6 semanas. EDVE e EDVE/DDVE foram maiores no grupo EAo nos três momentos avaliados e não se alteraram com a idade do animal ou a evolução do processo hipertrófico. O diâmetro do AE foi maior no grupo EAo nos três períodos, e seu valor foi maior em EAo₂₁ que em EAo₆ e EAo₁₂. O diâmetro da AO foi maior em EAo₁₂ que em C₁₂. As relações AE/AO e AE/PC foram maiores no grupo EAo nos três momentos estudados. Nos dois grupos de animais, AE/AO não se alterou durante a evolução e AE/PC foi maior no período 6 que em 12 e 21 semanas.

As médias e os desvios padrão da frequência cardíaca (FC) e dos índices de função sistólica e diastólica estão expostos na tabela III. A frequência cardíaca foi maior no grupo EAo nos momentos 12 e 21 semanas em relação aos respectivos C. No grupo C, a FC foi menor em C₂₁ que em C₆ e, no grupo EAo, não ocorreu variação desta variável nos três períodos analisados. ΔD foi maior em EAo₆ que em C₆. No grupo C, este índice não se alterou com a idade e, no grupo EAo, houve redução de seu valor no período 21 em relação a 6 e 12 semanas. A relação E/A foi maior em EAo₁₂ e EAo₂₁ em relação aos respectivos C e ao EAo₆. No grupo controle, E/A não se alterou com a idade.

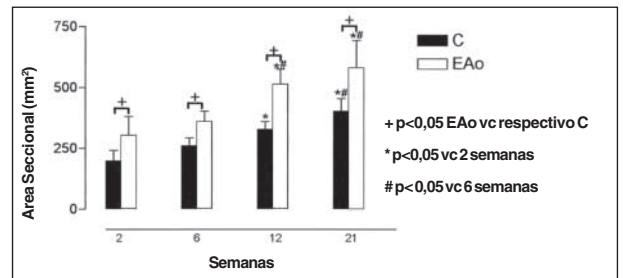


Fig. 2 - Área seccional transversa dos miócitos do ventrículo esquerdo dos grupos controle (C) e estenose aórtica supralvar (EAo) após 2, 6, 12 e 21 semanas de evolução. Cada coluna representa média ± desvio-padrão. +, *, # indicam diferenças significantes entre grupos conforme indicado na figura (ANOVA-duas vias e teste de Tukey para p<0,05).

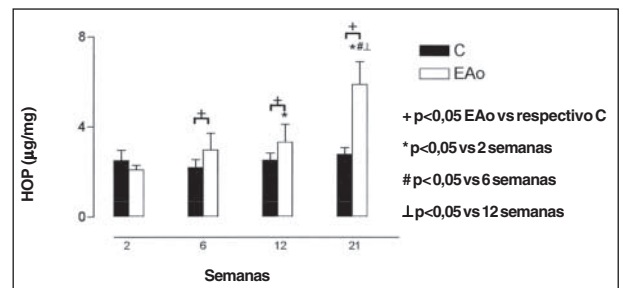


Fig. 3 - Concentração miocárdica de hidroxiprolina (HOP) dos grupos controle (C) e estenose aórtica supralvar (EAo) após 2, 6, 12 e 21 semanas de evolução. Cada coluna representa média ± desvio-padrão. +, *, #, indicam diferenças significantes entre grupos conforme indicado na figura (ANOVA-duas vias e teste de Tukey para p<0,05).

Tabela II - Análise ecocardiográfica dos parâmetros estruturais do coração

		Período experimental (semanas)		
		6 (n=12)	12 (n=12)	21 (n=12)
DDVE(mm)	C	7,51 ± 0,55 ^a	8,16 ± 0,64 ^b	8,39 ± 0,58 ^b
		NS	NS	NS
DDVE/PC(mm/kg)	EAO	7,38 ± 0,58 ^a	8,34 ± 0,96 ^b	8,50 ± 0,78 ^b
	C	23,8 ± 1,6 ^c	19,7 ± 2,2 ^b	16,9 ± 1,2 ^a
DSVE(mm)		NS	NS	NS
	EAO	25,7 ± 3,3 ^c	21,5 ± 3,3 ^b	18,8 ± 3,1 ^a
EDVE(mm)	C	2,91 ± 0,47 ^a	3,19 ± 0,73 ^a	3,35 ± 0,37 ^a
		*	NS	NS
EDVE/DDVE	EAO	2,24 ± 0,99 ^a	2,73 ± 1,52 ^{ab}	3,22 ± 1,36 ^b
	C	1,51 ± 0,16 ^a	1,49 ± 0,13 ^a	1,50 ± 0,09 ^a
AE(mm)		*	*	*
	EAO	1,76 ± 0,18 ^a	1,92 ± 0,22 ^a	1,95 ± 0,16 ^a
AO(mm)	C	0,20 ± 0,03 ^a	0,18 ± 0,02 ^a	0,18 ± 0,01 ^a
		*	*	*
AE/AO	EAO	0,24 ± 0,03 ^a	0,23 ± 0,03 ^a	0,23 ± 0,02 ^a
	C	5,03 ± 0,79 ^a	5,24 ± 0,62 ^a	5,47 ± 0,68 ^a
AE/PC (mm/kg)		*	*	*
	EAO	7,20 ± 1,80 ^a	7,35 ± 0,89 ^a	8,44 ± 1,02 ^b
AE/AO	C	3,49 ± 0,24 ^a	3,53 ± 0,29 ^a	3,79 ± 0,22 ^b
		NS	*	NS
AE/PC (mm/kg)	EAO	3,47 ± 0,29 ^a	3,77 ± 0,25 ^b	3,96 ± 0,26 ^b
	C	1,45 ± 0,24 ^a	1,49 ± 0,21 ^a	1,45 ± 0,16 ^a
AE/PC (mm/kg)		*	*	*
	EAO	2,08 ± 0,48 ^a	1,95 ± 0,25 ^a	2,14 ± 0,26 ^a
AE/PC (mm/kg)	C	15,9 ± 2,6 ^b	12,5 ± 1,4 ^a	11,0 ± 1,3 ^a
		*	*	*
AE/PC (mm/kg)	EAO	25,3 ± 7,7 ^b	18,5 ± 2,2 ^a	18,6 ± 2,8 ^a

C - controle; EAO - estenose aórtica supravalvar; DDVE e DSVE - diâmetros diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo (VE); PC - peso corporal; EDVE: espessura diastólica da parede do VE; AE - diâmetro do átrio esquerdo; AO - diâmetro da aorta. Análise de variância dos perfis multivariados para grupos dependentes (MANOVA). ^{a, b, c} - grupos que não têm a mesma letra apresentam diferenças estatisticamente significantes entre os três momentos de avaliação (p<0,05); * p < 0,05 vs respectivo grupo controle; NS - não significante.

Discussão

Neste estudo, avaliamos a função cardíaca, a morfologia e o desenvolvimento de fibrose no miocárdio de ratos jovens submetidos a estenose aórtica supravalvar por diferentes períodos evolutivos.

A indução de EAO rapidamente estimula a hipertrofia

ventricular esquerda, que se torna evidente já no período mais precoce de avaliação, com duas semanas de evolução. A partir de 6 semanas, não ocorreu aumento do peso do ventrículo esquerdo ou da espessura diastólica da parede ventricular, o que poderia sugerir que, após a indução da estenose aórtica, a hipertrofia ventricular esquerda ocorre precocemente, mantendo-se estável a seguir. Entretanto, à

Tabela III - Avaliação funcional do ventrículo esquerdo por ecocardiograma

		Período experimental (semanas)		
		6 (n=12)	12 (n=12)	21 (n=12)
FC (bpm)	C	281 ± 22 ^a	265 ± 26 ^{ab}	245 ± 15 ^b
		NS	*	*
ΔD (%)	EAO	291 ± 21 ^a	291 ± 22 ^a	271 ± 29 ^a
	C	61,3 ± 5,4 ^a	61,2 ± 6,6 ^a	60,1 ± 2,9 ^a
E/A		*	NS	NS
	EAO	70,3 ± 10,8 ^b	68,4 ± 12,2 ^b	62,8 ± 11,4 ^a
E/A	C	1,64 ± 0,27 ^a	1,61 ± 0,16 ^a	1,72 ± 0,33 ^a
		NS	*	*
E/A	EAO	2,07 ± 1,55 ^a	4,20 ± 3,25 ^b	4,71 ± 2,08 ^b

C - ratos controle; EAO - ratos submetidos a estenose aórtica supravalvar; FC - frequência cardíaca; ΔD - porcentagem de encurtamento; E/A - razão entre picos de velocidade de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral. Análise de variância dos perfis multivariados para grupos dependentes (MANOVA). ^{a, b} - grupos que não têm a mesma letra apresentam diferenças estatisticamente significantes entre os três momentos de avaliação (p<0,05); * p < 0,05 vs respectivo grupo controle; NS - não significante.

avaliação morfométrica, verificou-se que os valores da área seccional dos miócitos aumentaram progressivamente até 12 semanas, mostrando a existência de hipertrofia adicional durante a evolução do processo.

O estudo ecocardiográfico permitiu definir a hipertrofia ventricular esquerda como sendo do tipo concêntrica, caracterizada por aumento da espessura da parede com dimensões normais ou reduzidas da cavidade ventricular. Segundo vários autores^{7,26}, os animais começam a desenvolver insuficiência cardíaca a partir de 21 semanas após a indução da estenose aórtica. Assim, seria esperado o encontro de hipertrofia excêntrica no último período de estudo. Como somente 25% de nossos ratos apresentaram quadro de insuficiência cardíaca após as 21 semanas de evolução, é provável que a avaliação final tenha sido realizada enquanto a maioria dos animais se encontrava em fase compensada da hipertrofia ventricular esquerda e, portanto, ainda na fase de hipertrofia concêntrica. Entretanto, o aumento do peso do ventrículo direito no último período de avaliação mostra que já poderia estar ocorrendo a transição da fase de hipertrofia ventricular esquerda compensada para a fase de insuficiência cardíaca.

A análise histológica do miocárdio confirmou os achados de outros autores^{7,26} que também não encontraram, após 21 semanas de indução da estenose aórtica, lesões teciduais relevantes, tais como necrose de miócitos, áreas extensas de fibrose miocárdica ou peri-arterite. Em nosso estudo observamos, além da hipertrofia das células miocitárias, a presença de remodelação vascular caracterizada por hipertrofia da camada média das artérias intramiocárdicas, que era discreta nos primeiros momentos de avaliação, tornando-se evidente a partir de 12 semanas de evolução. O espessamento da camada média das artérias é habitualmente encontrado em humanos com hipertensão arterial sistêmica⁴⁰. Esse achado pode ser decorrente de hipertrofia e/ou hiperplasia de células da musculatura lisa, aumento do conteúdo de água e/ou colágeno da parede vascular e espessamento da membrana basal⁴⁰.

Embora este modelo não seja associado com severa fibrose⁷, a concentração miocárdica de hidroxiprolina foi maior nos grupos EAo a partir de 6 semanas e aumentou progressivamente durante a evolução do processo hipertrófico. No presente estudo, não realizamos a quantificação morfométrica do conteúdo de colágeno e, portanto, não pudemos diferenciar o aumento como sendo de colágeno intersticial e/ou perivascular. Weinberg e cols.²⁶, utilizando a coloração *picrosirius red*, verificaram a presença de moderado aumento no colágeno intersticial e perivascular 21 semanas após a indução da estenose aórtica.

A análise da função sistólica do ventrículo esquerdo

mostrou que na fase inicial do processo hipertrófico o encurtamento está aumentado. Com o tempo, ocorreu depressão da função contrátil da câmara, evidenciada pelo aumento progressivo de DSVE e pela redução de ΔD , sendo que esses índices foram significativamente diferentes entre os períodos de 6 e 21 semanas após a estenose aórtica. Assim, no modelo é possível detectar as três fases da evolução da função sistólica durante o processo hipertrófico: inicialmente, a presença do desempenho supranormal, que é seguido por desempenho cardíaco inalterado e, finalmente, por depressão da capacidade contrátil do coração. Resultados semelhantes foram observados por outros autores que também avaliaram, seqüencialmente, a função cardíaca por ecocardiograma^{7,22}.

O comprometimento da função diastólica pôde ser detectado a partir de 12 semanas de evolução pela relação E/A, que foi significativamente maior nos grupos EAo que nos respectivos C. Após esse período, não se observou variação adicional nos valores dessa relação. Entretanto, o aumento do diâmetro do AE, constatado a partir da 6ª semana, mostra que a disfunção diastólica pode ter ocorrido mais precocemente. Resultados semelhantes foram observados durante estudo seriado da função do ventrículo esquerdo por ecocardiografia²². O aumento de E/A reflete alteração do enchimento ventricular de padrão restritivo. Atualmente, este modelo de enchimento tem sido atribuído, em grande parte, à elevação da pressão atrial esquerda e também ao aumento da rigidez passiva da câmara ventricular, que pode ser decorrente de aumento da espessura da parede e/ou de fibrose intersticial²².

Em resumo, a indução de estenose aórtica supralvar em ratos jovens promove o desenvolvimento precoce de hipertrofia ventricular esquerda concêntrica com função cardíaca supranormal inicialmente, seguida por disfunção diastólica a partir de 12 semanas de evolução. A redução do desempenho ventricular sistólico somente ocorre em período mais tardio, após 21 semanas da indução da EAo. As alterações da função cardíaca são acompanhadas por fibrose miocárdica e por lesões histológicas pouco expressivas. Estas características mostram que o modelo é adequado e potencialmente útil para estudos sobre fisiopatologia e tratamento da hipertrofia cardíaca por sobrecarga pressórica crônica, tanto na fase compensada como durante a transição para a insuficiência cardíaca.

Agradecimentos

À valiosa assistência técnica de Vitor Marcos de Souza, José Carlos Georgette e Mário Augusto Dallaqua e ao apoio da CNPQ/PIBIC.

Referências

1. Cicogna AC, Okoshi MP, Okoshi K. História natural da remodelação miocárdica: da agressão aos sintomas. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 2000; 10:8-16.
2. Olivetti G, Cigola E, Maestri R, Lagrasta C, Corradi D, Quaini F. Recent advances in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res* 2000; 45:68-75.
3. Kaplan NM. Systemic hypertension: mechanisms and diagnosis. In: Braunwald E, Zipes DP, Libby P, eds. *Heart Disease. A Textbook of Cardiovascular Medicine*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001:941-71.
4. Okoshi MP, Matsubara LS, Franco M, Cicogna AC, Matsubara BB. Myocyte necrosis is the basis for fibrosis in renovascular hypertensive rats. *Braz J Med Biol Res* 1997; 30:1135-44.
5. Rossi MA, Peres LC. Effect of captopril on the prevention and regression of myocardial cell hypertrophy and interstitial fibrosis in pressure overload cardiac hypertrophy. *Am Heart J* 1992; 124:700-9.
6. Rodrigues MAM, Bregagnollo EA, Montenegro MR, Tucci PJF. Coronary vascular and myocardial lesions due to experimental constriction of the abdominal aorta. *Int J Cardiol* 1992; 35:253-7.
7. Weinberg EO, Schoen FJ, George D, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition prolongs survival and modifies the transition to heart failure in rats with pressure overload hypertrophy due to ascending aortic stenosis. *Circulation* 1994; 90:1410-22.
8. Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 1963; 27:282-93.
9. Bing OHL, Brooks WW, Robinson KG, et al. The spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from compensated left ventricular hypertrophy to failure. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27:383-96.
10. Brooks WW, Bing OHL, Robinson KG, Slawsky MT, Chaletsky DM, Conrad CH. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on myocardial fibrosis and function in hypertrophied and failing myocardium from the spontaneously hypertensive rat. *Circulation* 1997; 96:4002-10.
11. Cicogna AC, Robinson KG, Conrad CH, et al. Direct effects of colchicine on myocardial function. Studies in hypertrophied and failing spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1999; 33:60-5.
12. Cicogna AC, Padovani CR, Okoshi K, Aragon FF, Okoshi MP. Myocardial function during chronic food restriction in isolated hypertrophied cardiac muscle. *Am J Med Sci* 2000; 320:244-8.
13. Hirsch AT, Talsnec CE, Schunkert H, Paul M, Dzau VT. Tissue specific activation of cardiac angiotensin converting enzyme in experimental heart failure. *Circ Res* 1991; 69:475-82.
14. Kabour A, Henegar JR, Devineni VR, Janicki JS. Prevention of angiotensin II induced myocyte necrosis and coronary vascular damage by lisinopril and losartan in the rat. *Cardiovasc Res* 1995; 29:543-8.
15. Ratajska A, Campbell SE, Sun Y, Weber KT. Angiotensin II-associated cardiac myocyte necrosis: role of adrenal catecholamines. *Cardiovasc Res* 1994; 28:684-90.
16. Trippodo NC, Frohlich ED. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension: man and rat. *Circ Res* 1981; 48:309-19.
17. Cicogna AC, Padovani CR, Georgette JC, Aragon FF, Okoshi MP. Efeito da restrição protéico-calórica sobre a função mecânica dos músculos cardíacos hipertrofiados. *Arq Bras Cardiol* 1999; 72:431-5.
18. Cicogna AC, Robinson KG, Conrad CH, Squire R, Okoshi MP, Bing OHL. Participação do estado contrátil e do relaxamento miocárdico na disfunção ventricular durante a transição hipertrofia-falência cardíaca. *Arq Bras Cardiol* 1997; 69:381-4.
19. Schunkert H, Dzau VJ, Tang SS, Hirsch AT, Apstein CS, Lorell BH. Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy. Effects on coronary resistance, contractility, and relaxation. *J Clin Invest* 1990; 86:1913-20.
20. Feldman AM, Weinberg EO, Ray PE, Lorell BH. Selective changes in cardiac gene expression during compensated hypertrophy and the transition to cardiac decompensation in rats with chronic aortic banding. *Circ Res* 1993; 73:184-92.
21. Bruckschlegel G, Holmer SR, Jandeleit K, et al. Blockade of the renin-angiotensin system in cardiac pressure-overload hypertrophy in rats. *Hypertension* 1995; 25:250-9.
22. Litwin SE, Katz SE, Weinberg EO, Lorell BH, Aurigemma GP, Douglas PS. 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.
23. Turcuni M, Rupp H. Development of pressure overload induced cardiac hypertrophy is unaffected by long-term treatment with losartan. *Mol Cell Biochem* 1998; 188:225-33.
24. Condorelli G, Morisco C, Stassi G, et al. Increased cardiomyocyte apoptosis and changes in proapoptotic and antiapoptotic genes bax and bcl-2 during left ventricular adaptations to chronic pressure overload in the rat. *Circulation* 1999; 99:3071-8.
25. Schunkert H, Orzechowski HD, Bocker W, Meier R, Riegger GAJ, Paul M. The cardiac endothelin system in established pressure overload left ventricular hypertrophy. *J Mol Med* 1999; 77:623-30.
26. Weinberg EO, Lee MA, Weigner M, et al. Angiotensin AT1 receptor inhibition: effects on hypertrophic remodeling and ACE expression in rats with pressure-overload hypertrophy due to ascending aortic stenosis. *Circulation* 1997; 95:1592-600.
27. Gonçalves G, Okoshi K, Okoshi MP, et al. Efeito da inibição da enzima de conversão da angiotensina sobre a hipertrofia ventricular esquerda induzida por sobrecarga pressórica. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 1998; 8:2.
28. Bregagnollo EA, Okoshi K, Okoshi MP, Padovani CR, Cicogna AC. Efeitos do lisinopril sobre as características da hipertrofia ventricular esquerda na vigência de sobrecarga pressórica persistente. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 2001; 11:32.
29. Zierhut W, Zimmer H-G, Gerdes AM. Effect of angiotensin converting enzyme inhibition on pressure-induced left ventricular hypertrophy in rats. *Circ Res* 1991; 69:609-17.
30. Böcker W, Hupf H, Grimm D, Kurzidim K, Schunkert H. Effects of indapamide in rats with pressure overload left ventricular hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36:481-6.
31. Grimm D, Huber M, Jabusch HC, et al. Extracellular matrix proteins in cardiac fibroblasts derived from rat hearts with chronic pressure overload: effects of beta-receptor blockade. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33:487-501.
32. Switzer BR. Determination of hydroxyproline in tissue. *J Nutr Biochem* 1991; 2:229-321.
33. Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Franco M, Cicogna AC. Myocardial fibrosis rather than hypertrophy induces diastolic dysfunction in renovascular hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1997; 75:1328-34.
34. Matsubara LS, Bojikian BB, Okoshi MP, Cicogna AC, Janicki JS. Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function. *Am J Physiol* 2000; 279:1534-9.
35. Okoshi MP, Okoshi K, Dal Pai V, Dal Pai-Silva M, Matsubara LS, Cicogna AC. Mechanical, biochemical, and morphological changes in the heart from chronic food restricted rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2001; 79:754-60.
36. Okoshi K. Estrutura e Função do Coração de Ratos Normotensos e Hipertensos Submetidos à Restrição da Ingestão Alimentar: Estudo In Vivo Pelo Ecocardiograma e In Vitro do Coração Isolado. Botucatu: UNESP, 2000:106p.
37. Simone G, Devereux R, Camargo M, 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.
38. 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.
39. Conrad CH, Brooks WW, Robinson KG, Bing OHL. Impaired myocardial function in spontaneously hypertensive rats with heart failure. *Am J Physiol* 1991; 260:H136-45.
40. Schwartzkopf B, Motz W, Frenzel H, Vogt M, Knauer S, Strauer BE. Structural and functional alterations of the intramyocardial coronary arterioles in patients with arterial hypertension. *Circulation* 1993; 88:993-1003.