

# Análise da atividade da enzima conversora da angiotensina na hipertrofia aguda do ventrículo direito em modelo experimental de estenose endovascular ajustável do tronco pulmonar

Renato Rocha RABELLO\*, Renato Samy ASSAD\*, José Eduardo KRIEGER\*,  
Renata CARMONA\*, Maria Cristina ABDUCH\*, Sérgio Almeida de OLIVEIRA\*

RBCCV 44205-563

Rabello R R, Assad R S, Krieger J E, Carmona R, Abduch M C, Oliveira S A - Análise da atividade da enzima conversora da angiotensina na hipertrofia aguda do ventrículo direito em modelo experimental de estenose endovascular ajustável do tronco pulmonar. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2001; **16**(4): 364-75.

**RESUMO: Introdução:** A bandagem do tronco pulmonar (TP) tem sido aplicada para treinamento do ventrículo esquerdo (VE) em pacientes portadores de transposição das grandes artérias (TGA) com septo íntegro. Este procedimento, além de apresentar alta morbi-mortalidade, pode ocasionar alterações da função ventricular a longo prazo. Com o objetivo de analisar a hipertrofia aguda do ventrículo direito (VD), foi implantado um cateter balão no TP de seis cabritos jovens.

**Material e Métodos:** A sobrecarga sistólica foi aplicada através de insuflações progressivas do balão, durante 96 horas. Esta hipertrofia foi acompanhada por medidas hemodinâmicas diárias, através de cateteres implantados na aorta, VD e TP, além de ecocardiogramas seriados a cada 24 horas, com medidas das espessuras do septo interventricular e dos ventrículos. Ao final das 96 horas, os animais foram mortos para remoção dos corações. Os ventrículos e o septo foram pesados separadamente. Foram colhidas biópsias musculares de cada câmara para análise da atividade da enzima conversora da angiotensina (ECA). Oito cabritos (idade e peso semelhantes) foram utilizados como controle para os pesos dos ventrículos e para a atividade da ECA.

**Resultados:** Observou-se um aumento do gradiente VD/TP ( $p=0,001$ ), com conseqüente aumento da razão VD/VE ( $p=0,005$ ) durante o tempo de sobrecarga sistólica. Ao fim do protocolo, a parede livre do VD apresentou aumento de espessura ( $p=0,002$ ) e, conseqüentemente, um aumento do peso indexado ( $p=0,002$ ). A análise da atividade da ECA revelou aumento somente no músculo do VD hipertrofiado ( $p=0,002$ ).

**Conclusão:** O cateter balão foi eficiente em induzir a hipertrofia aguda do VD através do protocolo utilizado. Conseqüentemente, um aumento expressivo da atividade da ECA está associado ao processo de hipertrofia miocárdica induzida por sobrecarga pressórica.

**DESCRITORES:** Hipertrofia ventricular direita, fisiopatologia. Hipertrofia ventricular direita, enzimologia. Transposição dos grandes vasos. Procedimentos cirúrgicos cardíacos, métodos.

Trabalho realizado nas Divisões de Experimentação e de Biologia Molecular do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil.

Apresentado ao 28º Congresso Nacional de Cirurgia Cardíaca. Ouro Preto, MG, 5 a 7 de abril de 2001.

\*Do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Endereço para correspondência: Renato Rabello. Hospital Vera Cruz. Av. Barbacena, 653. Belo Horizonte, MG, Brasil. CEP: 30190-130. Tel.: (31)3286-2629/3292-6558. e.mail: presidencia@hvc.com.br.

## INTRODUÇÃO

O tratamento cirúrgico ideal para a transposição das grandes artérias (TGA) é a correção anatômica, através da cirurgia de Jatene<sup>(1)</sup>. Nos casos de TGA com septo funcionalmente íntegro, esta operação deve ser realizada no período neonatal, quando o ventrículo esquerdo (VE) ainda se apresenta preparado para suportar a pressão sistêmica no pós-operatório da cirurgia de Jatene<sup>(1-3)</sup>.

Após as primeiras semanas de vida, ocorre a queda progressiva da resistência vascular pulmonar, gerando baixas pressões no VE. Isto acarreta importante perda de massa muscular do ventrículo, o que dificulta a correção anatômica nesta fase<sup>(4-8)</sup>.

Com o avanço da biologia molecular nos anos 80, foi demonstrado que o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca está associado à mudança na expressão genética dos cardiomiócitos e das proteínas contráteis fetais<sup>(9-11)</sup>. Tais alterações genéticas adaptativas da actina, miosina e tropomiosina dos miócitos cardíacos já se encontram presentes com 48 horas de sobrecarga sistólica do ventrículo<sup>(12-13)</sup>.

Baseados nestes estudos da biologia molecular do miócito cardíaco, JONAS et al.<sup>(14)</sup> introduziram o conceito de preparo rápido do VE, em 1989, demonstrando que a cirurgia de bandagem pulmonar associada a um *shunt* sistêmico-pulmonar era capaz de induzir uma hipertrofia adequada do VE, em um período médio de 9 dias, realizando, então, a correção anatômica a seguir. Estes autores obtiveram bons resultados iniciais, porém, não reprodutíveis em outros centros, por apresentar alta morbimortalidade<sup>(15)</sup>.

Outro problema foi a disfunção ventricular esquerda observada no acompanhamento tardio destes pacientes, contrastando com a função ventricular normal dos pacientes operados no primeiro mês de vida, sem a necessidade do preparo rápido do VE<sup>(16)</sup>. Além disto, outros estudos demonstraram que a hipertrofia induzida por sobrecarga pressórica aguda também pode levar a focos de necrose celular no miocárdio hipertrofiado<sup>(17-19)</sup>, e a conseqüente disfunção ventricular tardia<sup>(20)</sup>.

A idéia de se realizar uma bandagem pulmonar, com estresse sistólico variável e manipulável, sem a necessidade de *shunt* sistêmico-pulmonar, poderia minorar as complicações pós-operatórias desta primeira fase<sup>(21-24)</sup>.

Um conhecimento mais preciso das bases moleculares que atuam na hipertrofia cardíaca é necessário para que possamos compreender melhor as alterações ocorridas durante este processo, possibilitando a indução de uma hipertrofia o mais fisiológica possível, no sentido de se preservar a função ventricular no futuro.

Para isto, será necessário que consigamos obter um marcador biológico confiável, que nos auxilie a acompanhar o processo hipertrofico, identificando o melhor momento para realização da correção anatômica.

Tendo em vista a importância do sistema renina angiotensina no processo de hipertrofia miocárdica, poderíamos supor que a análise da atividade da enzima conversora de angiotensina (**ECA**) nos tecidos cardíacos submetidos a sobrecarga pressórica variável seria um importante marcador molecular do processo hipertrofico em evolução.

O objetivo deste estudo foi de analisar a atividade da ECA na hipertrofia miocárdica, observada nos tecidos cardíacos de cabritos, submetidos a 96 horas de sobrecarga sistólica progressiva do ventrículo direito (VD) e a possível relação entre os parâmetros hemodinâmicos e a atividade da ECA.

## MATERIAL E MÉTODOS

Seis cabritos, com idade entre 30 e 60 dias e peso médio de 7,6kg (5,7 a 9,9 kg), foram selecionados para estudo da hipertrofia do VD induzida por estresse sistólico variável.

Outros oito cabritos, de idade e peso semelhantes (média = 7,7kg), foram selecionados como grupo controle para análise do VD em condições fisiológicas.

### *Anestesia e Procedimento Cirúrgico*

Os animais foram mantidos em jejum por 24 horas. Após a indução anestésica com Quetamina (50mg/kg intramuscular), foi obtida uma linha de infusão venosa através da veia jugular.

A seguir, a anestesia foi mantida com Nembutal (5 a 10mg/kg endovenoso) e Quetamina (1mg/kg endovenoso) em bolus. Os animais foram então intubados e mantidos em ventilação mecânica (ventilador Harvard 708 South Natick, MA, EUA), com oxigênio a 100% e volume corrente de 10 a 15ml/kg.

Os animais foram posicionados em decúbito lateral direito e preparados para procedimento estéril. Através de uma toracotomia esquerda (4º espaço intercostal), a via de saída do VD foi exposta, bem como o tronco pulmonar (TP) e aorta torácica descendente. Foram então implantados três cateteres (intracath 17G) em VD, TP e aorta torácica descendente, respectivamente. Os cateteres foram fixados com suturas em bolsa de polipropileno 5-0 e exteriorizados através da parede torácica, próximos à coluna vertebral e fixados à pele. A seguir, estes cateteres foram testados (permeabilidade e

curvas de pressão) e mantidos heparinizados. As pressões foram medidas através de sistema de software ACQKnowledge 3.01 (Biopac Systems, Inc., Goleta, CA, EUA). Posteriormente, outra sutura em bolsa (polipropileno 6-0) foi feita na via de saída VD para introdução do cateter balão. O balão foi posicionado acima da valva pulmonar, sendo o cateter também exteriorizado próximo aos outros e mantidas heparinizadas suas vias proximal e distal (Figura 1). Após fechamento do tórax com drenagem em selo d'água, a recuperação anestésica completa do animal foi obtida em maca especial (InCor-FMUSP) para quadrúpedes.

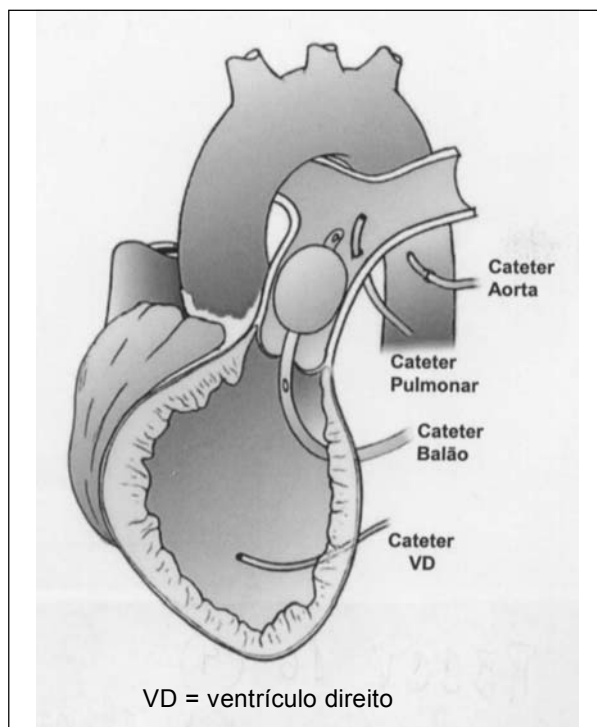


Fig. 1- Ilustração esquemática do posicionamento dos cateteres utilizados no experimento.

Após extubação, o dreno de tórax foi retirado para posterior encaminhamento do animal ao biotério. Todos os animais receberam antibioticoterapia profilática, iniciada antes da operação e mantida até a data do óbito (Cefazolina 500mg endovenoso, de 12/12h e Gentamicina 10mg intramuscular, de 12/12h). Foram também administrados digitálicos (0,5mg/kg/dia endovenoso) e Lique mine (2.500U subcutâneo de 12/12h).

#### Protocolo de Insuflação do Balão

Após período variável de convalescença, iniciou-se o protocolo de insuflação do balão para a indução do estresse sistólico progressivo do VD.

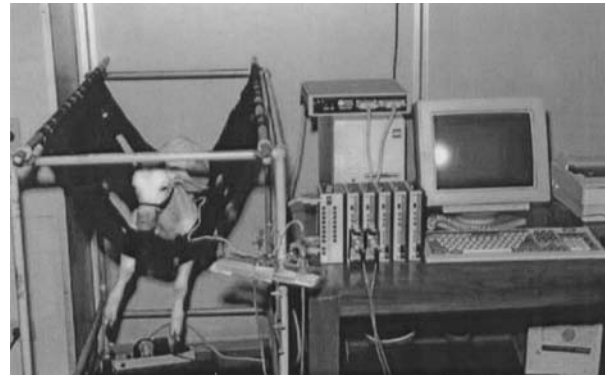


Fig. 2 - Animal em maca especial durante o protocolo de medidas de pressões.

Com o animal consciente e imobilizado em maca especial, procedemos à leitura das pressões basais de VD, TP e aorta, com o balão completamente desinsuflado (Figura 2). Após a leitura das pressões basais, iniciamos a insuflação progressiva do balão com água destilada, objetivando alcançar uma pressão em VD de aproximadamente 70% da pressão sistólica sistêmica, desde que não provocasse uma queda superior a 10% na mesma, conforme sugerido por DIAS et al.<sup>(23)</sup> e CANEO et al.<sup>(24)</sup>. Caso o animal apresentasse sinais clínicos de hipóxia importante, como agitação, dificuldade respiratória ou arritmias, o volume do balão era reduzido para um valor tolerável pelo animal e mantido assim por 24 horas. Os animais permaneceram com a sobrecarga sistólica do VD por um período de 96 horas, com insuflações progressivas do balão no limite máximo tolerado, a cada 24 horas.

O gradiente pressórico entre o VD e o TP era calculado através da subtração entre suas pressões sistólicas. A relação das pressões sistólicas entre VD e VE era obtida através da razão entre pressão sistólica do VD e da aorta torácica.

Este procedimento era repetido diariamente, sendo medidas as pressões de VD, TP e aorta e então comparadas às do dia anterior. O volume de água do balão era aspirado e comparado com o injetado previamente, para avaliar possível perda. Novamente, o balão era insuflado, procurando-se atingir os parâmetros desejados.

#### Ecocardiografia

Todos os animais deste estudo, incluindo os do grupo controle, foram submetidos à avaliação ecocardiográfica no pré-operatório, utilizando-se o aparelho Ultramark 4 (Advanced Technology Laboratories, Bothell, WA, EUA) pelo mesmo profissional, para confirmar o VD hipotrófico em relação ao VE.

Após o início do protocolo de insuflação do balão, o exame ecocardiográfico foi realizado a cada 24 horas, até o óbito dos animais.

Foram observadas as espessuras das paredes livres de VD, VE e septal, além da presença de efusões nas cavidades pleuro-pericárdicas. As medidas de espessura das paredes ventriculares e septal foram feitas através do corte para-esternal transverso, em modo M. O Doppler contínuo foi utilizado para avaliar o gradiente VD/TP provocado pelo balão. Foram utilizados transdutores de 2,5 e 5 mHz, apropriados para o tamanho do animal.

#### *Coleta de Material para Biologia Molecular*

Após cumprido o tempo de sobrecarga sistólica progressiva, os animais foram mortos, de acordo com os princípios de cuidados de animais de laboratório. Após estabelecimento de plano anestésico profundo, procedeu-se à heparinização sistêmica e injeção de solução de cloreto de potássio endovenoso até que ocorresse parada cardíaca. Neste momento, foram colhidas amostras do VD, VE, septo interventricular, átrio direito (AD) e átrio esquerdo (AE), imediatamente acondicionados em recipientes plásticos já identificados e armazenados em nitrogênio líquido (-160°C), até serem transportados ao Laboratório de Biologia Molecular, onde os fragmentos foram pesados e armazenados em freezer especial (Forma Scientific -80° C).

#### *Pesagem dos Tecidos Cardíacos*

O coração foi, então, extraído do tórax, para separação das paredes ventriculares e septo, de acordo com a técnica de FULTON et al.<sup>(25)</sup>. A gordura epicárdica foi cuidadosamente ressecada. A aorta e TP foram separados dos ventrículos ao nível das valvas semilunares. Os tecidos valvulares foram cuidadosamente removidos e os átrios direito e esquerdo identificados e separados. A parede livre do VD foi separada, cortando-se junto ao septo, paralelo ao trajeto das artérias interventricular anterior e posterior. O mesmo procedimento foi realizado para separar a parede livre do VE da parede septal. A seguir, VD, VE, septo e átrios foram pesados em balança de precisão (METTLER AE-200, Mettler-Toledo AG, Greifensee, Suíça), considerando-se até centésimos de grama. Devido aos diversos tamanhos dos animais, os pesos dos ventrículos foram normalizados através da indexação dos dados de peso das massas musculares cardíacas pelo respectivo peso corporal do animal, conforme sugestão de BISHOP & COLE<sup>(26)</sup>. Foram, então, denominados de pesos indexados e expressos em g/kg.

O mesmo protocolo de óbito, retirada e pesagem das peças foi realizado nos oito animais que constituíram o grupo controle, os quais não receberam qualquer medicação antes do seu sacrifício.

#### *Determinação da Atividade da ECA*

Procedeu-se, então, à pesquisa de alterações moleculares provenientes da hipertrofia induzida nestes corações.

Foi realizada a dosagem da atividade da **ECA** em cada fragmento isoladamente (AD, AE, VD, VE, septo) de todos os animais, para se identificar as alterações da atividade da enzima ocorridas nestas amostras.

Para determinarmos a atividade da **ECA**, os tecidos foram homogeneizados em tampão borato 0,4 M contendo NaCl 0,9 M e sacarose 0,34 M (pH = 7,2), na proporção de 1g de tecido para 10ml de tampão. Os homogeneizados foram centrifugados (Sorvall RT 7 Centrifuge, Du Pont Company, Biotechnology Systems Division, New Town, CT, E.U.A.) por 10 minutos, a 3000 RPM, 4°C e o sobrenadante foi utilizado para ensaio fluorimétrico na medida de atividade da **ECA**, conforme descrito a seguir.

Parte do sobrenadante (20 ml) foi incubada com 480 ml de Hippuril – Histidil – leucina (Hip-His-Leu) 5mM em tampão borato, por 60 minutos. O tempo de incubação e a quantidade de proteína adicionada ao meio de reação foram escolhidos após a padronização da metodologia, de modo a assegurar a linearidade da formação do produto. A reação foi interrompida pela adição, sob agitação, de 1,2 ml de solução de NaOH 0,34N. A seguir, acrescentou-se, sob agitação e protegido da luz, 100 ml da solução de o-phtaldialdeído (2% em metanol) e, após 10 minutos em temperatura ambiente, esta reação foi paralisada pela adição de 200 ml de HCl 3N. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 3000 RPM (Sorvall RT 7 Centrifuge, E.U.A.), durante 10 minutos e à temperatura ambiente. O sobrenadante foi submetido à leitura da intensidade de fluorescência no espectrofluorímetro Aminco-Bowman Série 2 (SLM, Instruments Inc., Rochester, NY, EUA), que permite a passagem de luz em comprimento de onda 365 nm para excitação e 495 nm para emissão. Todas as amostras foram ensaiadas em triplicatas, sendo que a fluorescência intrínseca da amostra foi corrigida através de brancos, onde o material enzimático era adicionado logo após a reação ser paralisada com NaOH 0,34 M, mantendo as demais etapas do ensaio inalteradas. Para cada ensaio, foi feita uma curva padrão, relacionando a intensidade da fluorescência com quantidades determinadas do produto (Histidil-Leucina). A atividade específica foi expressa em nMol His-leu/min/mg de proteína para os tecidos.

A concentração de proteína de cada amostra foi determinada pelo método de BRADFORD<sup>(27)</sup>, utilizando albumina sérica bovina como padrão.

### Análise Estatística

Inicialmente, as variáveis foram analisadas descritivamente. Esta análise foi feita através da observação dos valores mínimos e máximos, e do cálculo de médias e desvios-padrão, medianas, percentil 25 e 75.

A comparação dos momentos avaliados para: pressões sistólicas da aorta, razão VD/VE, gradiente VD/TP gerado pelo cateter balão, e a espessura do músculo cardíaco do VD medidos pelo ecocardiograma, no mesmo grupo foi realizada utilizando-se o teste não-paramétrico de Friedman<sup>(28)</sup>, seguido das comparações múltiplas.

A comparação das espessuras de VE e septo, avaliadas somente nos momentos 0 e 96 horas, foi realizada através do teste não-paramétrico de Wilcoxon.

Devido ao número de casos deste protocolo, a comparação dos pesos do VD, VE e septo, além da atividade da ECA nos diversos tecidos cardíacos, foi realizada utilizando-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney<sup>(29)</sup>. A análise da relação entre a atividade da ECA no VD com o seu respectivo peso, com a razão VD/VE e com o gradiente VD/TP foi realizada através de coeficiente de correlação de Spearman.

O nível de significância utilizado para os testes foi de 5%.

### RESULTADOS

Em nenhum animal, foi observada migração ou rotura do balão. Houve perda mínima variável do volume injetado no balão durante o período de estudo. Para se atingir os parâmetros preconizados, o volume de água injetado no balão foi progressivamente maior ao longo do protocolo.

Em dois animais, foi observada síncope pós ajuste do balão, durante o transporte para o biotério, por provável deslocamento do balão e possível oclusão do TP. Nestes casos, foi necessária a desinsuflação total do balão para recuperação dos animais e posterior re-insuflação.

### Medidas Hemodinâmicas

A razão das pressões sistólicas entre o VD e VE e suas respectivas medidas estão descritas na Tabela 1. Foi observado um aumento progressivo desta razão até 72 horas de sobrecarga sistólica. É interessante observar um aumento mais expressivo da razão VD/VE no momento entre 48 e 72 horas e discreta queda desta razão com 96 horas. Houve diferença significativa entre os momentos avaliados ( $p=0,005$ ). Na comparação dos momentos 2 a 2, foi observada diferença significativa entre os momentos basal e 72 horas ( $p=0,023$ ) e entre os momentos 24 e 48 horas ( $p=0,049$ ). Os demais momentos não tiveram diferenças significativas.

Quanto ao gradiente VD/TP, há diferença significativa entre os momentos avaliados, conforme consta na Tabela 2 e no Gráfico 1 ( $p=0,001$ ). Há diferença significativa entre o basal e os momentos: 48 horas ( $p=0,028$ ), 72 horas ( $p<0,013$ ) e 96 horas ( $p<0,013$ ), não se observando diferença significativa entre os momentos basal e 24 horas.

### Achados Ecocardiográficos

A contratilidade do VE manteve-se preservada durante todo o protocolo, apesar de serem encontradas efusões pleurais moderadas, principalmente à esquerda (em todos os animais) e pericárdicas (em dois animais, #1 e #3). O VD apresentou-se dilatado e hipocinético em dois animais (#2 e #3), 48 horas após o início da sobrecarga sistólica. Os exames posteriores destes animais revelaram a

TABELA 1

	Média ± DP	Mínimo	Máximo	RAZÃO DAS PRESSÕES VD/VE		
				25	Mediana	75
BASAL	35,33 ± 14,02	20,00	60,00	26,00	31,50	45,75
24 HORAS	41,33 ± 9,09	33,00	59,00	36,00	39,00	45,50
48 HORAS	49,83 ± 13,96	35,00	76,00	41,75	46,50	57,25
72 HORAS	58,83 ± 10,03	44,00	71,00	48,50	61,50	66,50
96 HORAS	57,67 ± 7,45	48,00	66,00	48,75	60,00	63,75

Teste de Friedman:  $p=0,05$ . VD = ventrículo direito, VE = ventrículo esquerdo, DP = desvio padrão. n = 6. Medidas: %

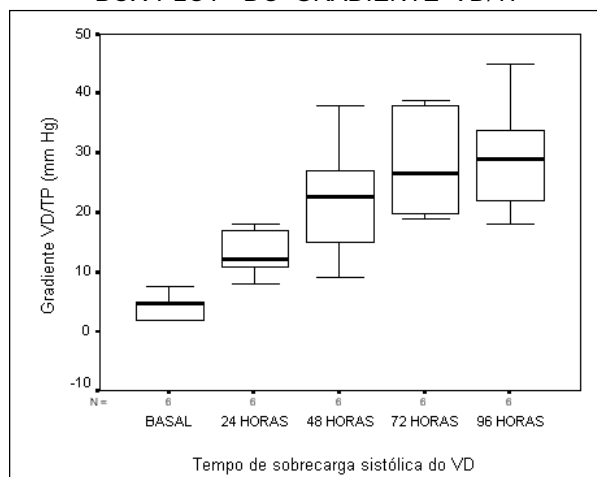
**TABELA 2**

GRADIENTE VD/TP

	Média ± DP	Mínimo	Máximo	Percentis		
				25	Mediana	75
BASAL	4,25 ± 2,10	2,00	7,50	2,00	4,50	5,63
24 HORAS	13,00 ± 3,85	8,00	18,00	10,25	12,00	17,25
48 HORAS	22,33 ± 10,03	9,00	38,00	13,50	22,50	29,75
72 HORAS	28,17 ± 8,89	19,00	39,00	19,75	26,50	38,25
96 HORAS	29,50 ± 9,50	18,00	45,00	21,00	29,00	36,75

Teste de Friedman:  $p=0,001$ . VD = ventrículo direito, TP = troncopulmonar, DP = desvio padrão  
Medidas: mmHg.  $n = 6$

**GRÁFICO 1**  
"BOX-PLOT" DO GRADIENTE VD/TP



recuperação da função sistólica do VD. O início do aumento da espessura do VD foi observado pelo ecocardiograma após 48 horas de sobrecarga sistólica. A espessura muscular adquirida pelo VD durante as 96 horas do protocolo foi significativa-

mente maior que a condição basal ( $p=0,024$ ). A Tabela 3 mostra os dados iniciais e finais de espessura do VD, VE e septo. Observamos que houve equalização da espessura muscular do VD submetido a 96 horas de sobrecarga sistólica com a do septo e do VE, o que retrata a hipertrofia aguda do VD. Não houve aumento significativo da espessura de VE ( $p=0,317$ ) nem do septo ( $p=0,317$ ). Entretanto, esta equalização das espessuras musculares não ocorreu no animal # 1, apesar de ter havido aumento da massa muscular do VD (de 2mm para 3mm). É interessante observar que o animal # 1 foi o único a apresentar aumento da espessura do VE e septo durante o período de treinamento. Por outro lado, podemos notar que a espessura da parede livre do VD do animal #5 suplantou a do VE após 96 horas de sobrecarga sistólica do VD (de 3mm para 6mm, VE = 5mm).

*Peso dos Ventriculos*

O peso do VD do grupo treinado foi significativamente maior que o do grupo controle ( $1,92 \pm 0,15g/kg$  contra  $1,12 \pm 0,22g/kg$ , respectivamente,  $p=0,001$ ). Este ganho de massa muscular durante

**TABELA 3**

ESPESSURAS SEPTAL E DAS PAREDES LIVRES DE VD E VE OBTIDAS PELO ECOCARDIOGRAMA

		Média ± DP	Valor p	Mínimo	Máximo	Percentis		
						25	Mediana	75
VD	BASAL	2,83 ± 0,41	0,024	2,00	3,00	2,75	3,00	3,00
	96 HORAS	4,83 ± 0,98		3,00	6,00	4,50	5,00	5,25
VE	BASAL	4,83 ± 0,41	0,317*	4,00	5,00	4,75	5,00	5,00
	96 HORAS	5,00 ± 0,00		5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
SEPTO	BASAL	4,83 ± 0,41	0,317*	4,00	5,00	4,75	5,00	5,00
	96 HORAS	5,00 ± 0,00		5,00	5,00	5,00	5,00	5,00

$n = 6$ . VD = ventrículo direito, VE = ventrículo esquerdo, DP = desvio padrão. Medidas: mm. \* Teste de Wilcoxon

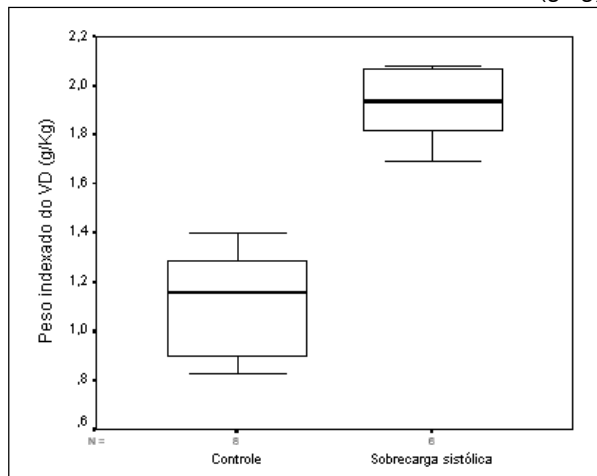
o processo de hipertrofia aguda do VD foi de 71,4% em relação ao grupo controle, como demonstrado no Gráfico 3. Quanto aos pesos dos ventrículos esquerdos, não houve diferença significativa ( $p=0,651$ ) entre os grupos controle ( $2,14 \pm 0,51$  g/kg) e sobrecarga sistólica ( $2,18 \pm 0,16$  g/kg). O peso dos septos do grupo controle ( $1,47 \pm 0,28$  g/kg) também não diferiram significativamente ( $p=0,897$ ) do grupo de sobrecarga sistólica ( $1,47 \pm 0,32$  g/kg).

#### Análise da Atividade da ECA

A atividade tecidual da **ECA** nas diferentes câmaras cardíacas foi determinada nos dois grupos.

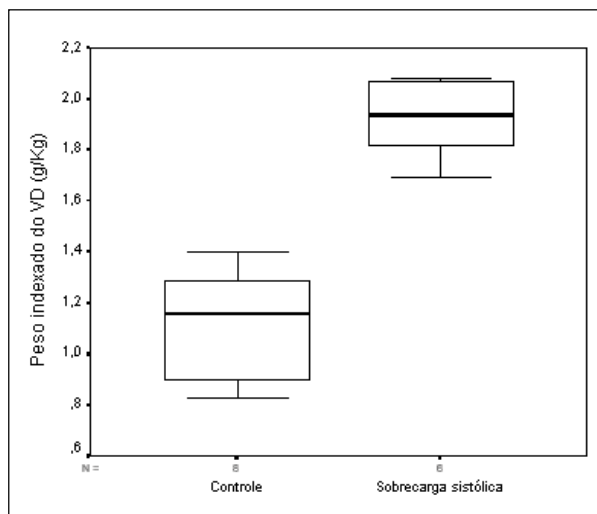
**GRÁFICO 2**

“BOX-PLOT” DO PESO INDEXADO DO VD (g/kg)



**GRÁFICO 3**

“BOX-PLOT” DA ATIVIDADE DA ECA NO VD (MANN-WHITNEY)

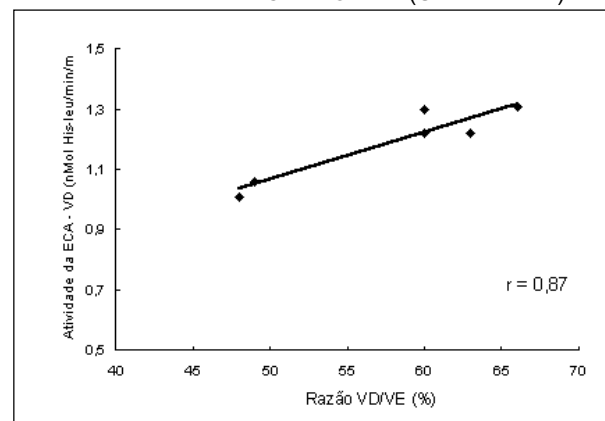


A Tabela 4 mostra as medidas descritivas da **ECA** nos diferentes tecidos cardíacos. No grupo submetido a sobrecarga sistólica variável, foi observado um aumento significativo dos níveis da **ECA** no VD de 50,6% (de  $0,79 \pm 0,11$  nmol para  $1,19 \pm 0,12$  nmol,  $p=0,002$ , Gráfico 4). Em contraste, não houve variação estatisticamente significativa nas amostras dos músculos de AD, AE, VE e septo. É interessante salientar um nível mais elevado da **ECA** nos átrios em relação aos ventrículos, tanto nos animais do grupo controle, quanto naqueles treinados.

No grupo submetido a sobrecarga sistólica variável, foram analisadas as possíveis relações entre a atividade da **ECA** e os parâmetros hemodinâmicos. A razão VD/VE apresentou uma importante correlação com a atividade da **ECA** ( $r=0,87$  – Gráfico 5), seguida pela correlação do gradiente VD/TP ( $r=0,64$ ).

**GRÁFICO 4**

RELAÇÃO ENTRE A RAZÃO VD/VE E A ATIVIDADE DA **ECA** NO VD (SPEARMAN)



**GRÁFICO 5**

RELAÇÃO ENTRE O GRADIENTE VD/TP E A ATIVIDADE DA **ECA** NO VD (SPEARMAN)

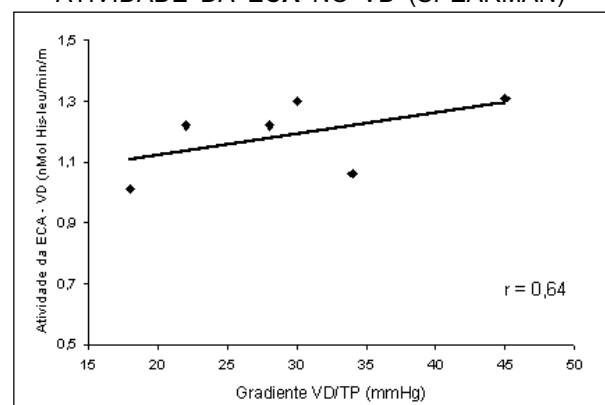


TABELA 4

		ATIVIDADE DA ECA NOS MÚSCULOS CARDÍACOS						
		n	Média ± DP	Mínimo	Máximo	Percentis		
						25	Mediana	75
<b>AD</b>	Controle	5	2,20 ± 0,72	1,01	2,97	1,66	2,34	2,67
	Treinados	5	1,73 ± 0,49	1,05	2,37	1,27	1,83	2,14
<b>AE</b>	Controle	5	2,84 ± 1,34	0,89	3,91	1,45	3,53	3,89
	Treinados	5	2,24 ± 0,46	1,69	2,65	1,75	2,47	2,62
<b>VE</b>	Controle	8	0,72 ± 0,41	0,43	1,69	0,47	0,63	0,71
	Treinados	6	0,65 ± 0,25	0,46	1,12	0,48	0,55	0,82
<b>VD</b>	Controle	8	0,79 ± 0,11	0,62	0,94	0,70	0,81	0,89
	Treinados	6	1,19 ± 0,12	1,01	1,31	1,05	1,22	1,30
<b>septo</b>	Controle	4	0,78 ± 0,17	0,57	0,91	0,64	0,81	0,91
	Treinados	5	0,83 ± 0,18	0,71	1,15	0,73	0,78	0,78

Medidas: nmols. DP: desvio padrão. AD: átrio direito. AE: átrio esquerdo

## COMENTÁRIOS

Este estudo demonstra claramente que a hipertrofia do VD de cabritos desencadeada por 96 horas de sobrecarga sistólica variável está associada a um aumento significativo da atividade da **ECA**. Fica patente também uma forte correlação entre este aumento da atividade da **ECA** com o aumento das razões VD/VE, e, de modo menos expressivo, com o aumento do gradiente VD/TP.

Estas informações são importantes, pois demonstra-se, pela primeira vez alteração de um marcador molecular associado ao desenvolvimento de hipertrofia aguda do ventrículo subpulmonar de cabritos, submetido a sobrecarga sistólica variável.

A presença de fatores de crescimento autócrinos e parácrinos tem sido proposta como um dos mecanismos importantes na patogênese da hipertrofia da sobrecarga pressórica<sup>(30)</sup>. O estresse mecânico estimula a produção ou a secreção de fatores do crescimento, que mediarão a resposta de crescimento celular, tais como a angiotensina-II (**ANG-II**), **endotelina I**, **IGF-I** e **PDGF**, que estariam diferentemente envolvidos neste processo, dependendo do tipo de tecido envolvido.

Entretanto, o mecanismo pelo qual este estímulo é sentido e transformado em sinais intracelulares de regulação genética, induzindo à hipertrofia miocárdica, ainda é pouco conhecido.

Existem várias evidências sugerindo que a **ANG-II** seja um dos fatores críticos na mediação da hipertrofia cardíaca por sobrecarga pressórica. Por

exemplo, foi demonstrado em ratos submetidos à bandagem aórtica, nos quais o tratamento com inibidores da **ECA** preveniu ou mesmo regrediu a hipertrofia do ventrículo esquerdo (**VE**)<sup>(31-32)</sup>. Este mecanismo corresponderia à inibição da expressão do gene **c-fos**, inibição da ativação da **MAP** quinase, inibição do aumento da síntese proteica e inibição da re-expressão dos genes fetais, como **FAN** e **actina** esquelética.

Foi demonstrado que o estresse mecânico de miócitos neonatais de ratos, em cultura livre de soro, causa um aumento de mais de cem vezes na concentração de **ANG-II** no meio de cultura<sup>(33)</sup>.

Outra evidência interessante da importância da **ANG-II** nos processos de hipertrofia, foi observada em cultura de miócitos cardíacos de ratos neonatais, na qual a aplicação de **ANG-II** exógena causa hipertrofia dos miócitos e resposta mitogênica dos fibroblastos cardíacos<sup>(34-35)</sup>. Esta resposta é idêntica à causada por estresse mecânico, indicando que a **ANG-II** produzida localmente é suficiente para induzir a hipertrofia miocárdica.

A análise da atividade da **ECA** tecidual nas diversas câmaras cardíacas foi o principal objetivo deste trabalho. Conforme esperado, observamos que, no coração normal, os níveis da **ECA** nos músculos cardíacos são baixos, sendo mais pronunciados nos átrios<sup>(36)</sup>. Como a **ANG-II** está diretamente relacionada ao processo de hipertrofia miocárdica, formulamos a hipótese de que encontraríamos um nível elevado de **ECA** nas amostras do VD submetido a sobrecarga sistólica variável. Nossos resultados confirmaram esta hipótese. Não



houve variação significativa nas amostras de AD, AE e VE do grupo submetido a sobrecarga sistólica variável com relação ao controle.

Este aumento da atividade da **ECA** no VD do grupo submetido a 96 horas de sobrecarga sistólica variável é consistente com a idéia de que os acontecimentos descritos acima estariam ocorrendo nos miócitos destes ventrículos.

Tanto a razão de pressões VD/VE, como o gradiente VD/TP apresentaram um aumento significativo a partir de 48 horas de sobrecarga sistólica, provavelmente devido à melhor adaptação do ventrículo após este período, conforme sugerido por BOUTIN et al.<sup>(37)</sup>.

O expressivo aumento de 71,4% da massa muscular dos ventrículos submetidos a 96 horas de sobrecarga sistólica variável em nosso protocolo está de acordo com os achados de DIAS et al.<sup>(23)</sup> e CANÊO et al.<sup>(24)</sup>. Em nosso protocolo, o conteúdo de água no miocárdio não foi avaliado. Entretanto, estes autores demonstraram que esta hipertrofia muscular se deve primariamente a um ganho de massa, e não ao edema tecidual.

Os achados ecocardiográficos apontam para uma disfunção sistólica transitória do VD manifestada após 48 horas de sobrecarga sistólica variável, revertida no fim do protocolo. Este dado está de acordo com os resultados obtidos por BOUTIN et al.<sup>(37)</sup>, de que existe um período de adaptação do ventrículo à sobrecarga, juntamente com o início do processo de hipertrofia, no qual os valores de medidas da parede do VD praticamente equalizaram com as medidas do VE e septo. O maior ganho de massa muscular foi observado após 48 horas de bandagem do TP, com diminuição progressiva até estar próximo de zero no sétimo dia.

Estes autores também demonstraram que evolução clínica tardia dos pacientes submetidos ao preparo rápido do VE para a cirurgia de Jatene mostra uma contratilidade abaixo da normalidade destes ventrículos num percentual significativo (25%), contrastando com a função ventricular normal dos pacientes operados no primeiro mês de vida, sem a necessidade do preparo rápido do VE.

Da mesma forma, MAVROUDIS et al.<sup>(38)</sup> reportam a dificuldade na correção anatômica de pacientes submetidos a cirurgia de Mustard anteriormente. Estes autores enfatizam a disfunção ventricular esquerda que ocorre após a bandagem, comprovada por ecocardiograma transesofágico realizado na sala de operações.

Estes dados sugerem fortemente que a sobrecarga sistólica aguda imposta ao VE, capaz de induzir a hipertrofia rápida, causa danos irreversíveis a estes ventrículos.

Mais recentemente, foi proposta a realização da correção anatômica em um único tempo, sem preparo ventricular, com bons resultados, mesmo naqueles pacientes que já apresentavam queda importante da espessura de VE (3 mm) e razão de pressões pulmonar e sistêmica entre 0,2 e 0,5<sup>(39-40)</sup>.

Na verdade, a fisiopatologia envolvida neste procedimento é a mesma que ocorre no preparo rápido do VE, uma vez que a bandagem pulmonar, ou a pressão sistêmica vão provocar o mesmo estímulo hipertrófico no VE. A disfunção do VE poderá ocorrer a longo prazo, provavelmente relacionada ao grau de estresse sistólico abrupto imposto a este ventrículo durante seu retreinamento.

CARROLL et al.<sup>(41)</sup> encontraram infiltrado inflamatório intenso no miocárdio de porcos submetidos a bandagem pulmonar após 7 horas de sobrecarga sistólica. A necrose miocárdica em graus variáveis também já foi demonstrada em corações submetidos a estresse sistólico agudo, provavelmente por deficiência relativa de oxigênio no miocárdio hipertrófico<sup>(28)</sup>.

Outro fator importante é a relação da hipertrofia cardíaca com fluxo coronariano. Existe um consenso que a hipertrofia do VE induzida por sobrecarga pressórica, resulta em diminuição da reserva de fluxo coronariano (número de vasos arteriais / unidade de volume)<sup>(42)</sup>. Já nos estudos da hipertrofia do VD, foi comprovado um remodelamento da árvore coronariana, com aumento do número de vasos e diminuição da resistência ao fluxo intracoronariano<sup>(43)</sup>. Entretanto, não foi ainda esclarecido se esta diferença acontece devido à hipertensão imposta às artérias coronárias nos modelos de hipertrofia de VE. Porém, é interessante observar que, nos corações com **TGA**, o VE está conectado à artéria pulmonar; assim sendo, a bandagem pulmonar não implica em hipertensão do sistema coronariano, fato este não avaliado em estudos experimentais, pela impossibilidade de se criar um modelo similar. Pode ser que este detalhe seja importante na compreensão dos fenômenos ocorridos na hipertrofia induzida nestes corações. Estes fatos se tornam importantes na compreensão da disfunção ventricular observada nos pacientes submetidos ao preparo rápido do VE.

É interessante observar que a administração de hormônio tireoideano nos corações submetidos a sobrecarga pressórica inibe somente a transformação da **a-MHC** para a **b-MHC**, não interferindo com a atividade da **a-actina esquelética** e da **b-tropomiosina**. Isto nos leva a pensar se não seria a **b-MHC** responsável pela piora da contratilidade miocárdica nestes ventrículos, uma vez que o hipertireoidismo está associado à hipertrofia miocárdica e ao aumento da contratilidade.

WONG et al.<sup>(44)</sup> demonstraram experimentalmente a indução de hipertrofia ventricular sem alterações de contratilidade miocárdica utilizando tiroxina ou clenbuterol ( $\beta_2$ -agonista adrenérgico) associados à bandagem pulmonar, quando comparados ao grupo submetido apenas à bandagem pulmonar. Este estudo comprova a importância da presença da **b-MHC** como causadora de disfunção ventricular nestes corações.

Assim sendo, a idéia de se realizar a bandagem pulmonar de maneira progressiva, e reversível a qualquer momento, se torna muito atraente, uma vez que o ventrículo tem a chance de se adaptar a sobrecargas cada vez maiores, sem um forte impacto pressórico inicial.

Em nosso estudo, utilizamos o método de cateter balão por acreditar que sua utilização breve e de possível implantação percutânea favorecem sua aplicação clínica. O preparo ventricular sem a necessidade de intervenção cirúrgica minimizaria o risco destes pacientes, já em estado grave. Devemos lembrar, que nosso modelo experimental não apresenta as mesmas condições clínicas de

baixa saturação de oxigênio arterial como nos pacientes com TGA e septo íntegro, que normalmente já apresentam hipoxemia acentuada e poderiam não tolerar a insuflação do balão no TP, sem a presença de um *shunt* sistêmico-pulmonar. Porém, caso isto ocorresse, o balão poderia ser desinsuflado, o *shunt* realizado e, então, novamente se iniciaria o protocolo de insuflação do balão.

## CONCLUSÕES

**A sobrecarga sistólica variável imposta ao VD de cabritos, durante 96 horas, através do cateter balão induziu à hipertrofia ventricular. Esta resposta hipertrófica está associada a um aumento da atividade da ECA no VD. Foi observada uma importante correlação entre o aumento da ECA e a razão de pressões VD/VE. Estes dados são consistentes com a hipótese de que a atividade da ECA é um importante marcador molecular da hipertrofia miocárdica.**

RBCCV 44205-563

---

Rabello R R, Assad R S, Krieger J E, Carmona R, Abduch M C, Oliveira S A - Evaluation of angiotensin converting enzyme activity in acute right ventricular hypertrophy in an experimental model of adjustable endovascular stenosis of the pulmonary trunk. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2001; **16**(4): 364-75.

**ABSTRACT: Introduction:** The pulmonary trunk (PT) banding has been used to promote rapid left ventricular (LV) hypertrophy in patients with transposition of the great vessels (TGV) with intact septum, treated after the neonatal period. This procedure carries a high morbidity and mortality rates. Genetic alterations of the cardiomyocytes resulting from acute hypertrophy have not been evaluated in models of variable systolic overload of the subpulmonary ventricle. In order to evaluate the activity of angiotensin converting enzyme (ACE) in acute right ventricular (RV) hypertrophy, a balloon catheter was implanted in the PT of six young goats.

**Material and Methods:** Systolic overload was carried out throughout progressive balloon insufflations for a period of 96 hours. Hypertrophy was followed by daily hemodynamic and echocardiographic evaluations. At the end of the 96 hours, the animals were killed to harvest the heart. The ventricles and septum were weighted separately. Samples of each cardiac muscle were collected for ACE analysis. Eight goats (with similar age and weight) were used as control for weight and ACE activity.

**Results:** At the end of the protocol, the following parameters were increased: RV/PT gradient ( $p=0.001$ ), RV to LV ratio ( $p=0.005$ ), thickness of the free wall of RV ( $p=0.002$ ) and RV weight ( $p=0.002$ ). The evaluation of ACE activity showed an increase only in the hypertrophied RV muscle ( $p=0.002$ ), indicating a high correlation with the increase in the RV to LV ratio ( $r=0.87$ ).

**Conclusion:** The progressive systolic overload in the RV of goats induces ventricular hypertrophy. This hypertrophy is related to a significant increase in ACE activity, an important molecular marker of this process.

**DESCRIPTORS:** Hypertrophy right ventricle, physiopathology. Hypertrophy right ventricle, enzymology. Transposition of great vessels. Cardiac surgical procedures, methods.

---

AGRADECIMENTOS: Agradecemos ao técnico de laboratório Nelson Correa Júnior, pela valiosa colaboração durante a realização do protocolo.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Jatene A D, Fontes V F, Paulista P P, Souza L C, Neger F, Galantier M; Souza J E - Successful anatomic correction of transposition of the great vessels: a preliminary report. *Arq Bras Cardiol* 1975; **28**: 461-4.
- 2 Ross D, Rickards A, Somerville J - Transposition of the great arteries: logical anatomical arterial correction. *Br Med J* 1976; **1**(6018): 1109-11.
- 3 Pacifico A D, Stewart R W, Barger L M Jr. - Repair of transposition of the great arteries with ventricular septal defect by an arterial switch operation. *Circulation* 1983; **68**(3 Pt 2): II49-55.
- 4 Aubert J, Pannetier A, Couvelly J P, Unal D, Rouault F, Delarue A - Transposition of the great arteries: new technique for anatomical correction. *Br Heart J* 1978; **40**: 204-8.
- 5 Idriss F S, Goldstein I R, Grana L; French D; Potts W J - A new technique for complete correction of transposition of the great vessels. *Circulation* 1961; **24**: 5-11.
- 6 Baño-Rodrigo A, Quero-Jiménez M, Moreno-Granado F, Gamallo- Amat C - Wall thickness of ventricular chambers in transposition of the great arteries: surgical implications. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1980; **79**: 592-7.
- 7 Major W K Jr., Matsuda H, Subramanian S - Failure of the Jatene procedure in a patient with D-transposition and intact ventricular septum. *Ann Thorac Surg* 1976; **22**: 386-8.
- 8 Huhta J C, Edwards W D, Feldt R H, Puga F J - Left ventricular wall thickness in complete transposition of the great arteries. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1982; **84**: 97-101.
- 9 Nair K G, Cutilletta A F, Zak R, Koide T, Rabinowitz M - Biochemical correlates of cardiac hypertrophy. I. Experimental model; changes in heart weight, RNA content, and nuclear RNA polymerase activity. *Circ Res* 1968; **23**: 451-62.
- 10 Imamura M, Schluchter M, Fouad-Tarazi F M - Remodeling of left ventricular after banding of ascending aorta in the rat. *Cardiovasc Res* 1990; **24**: 641-6.
- 11 Izumo S, Lompre A M, Matsuoka R et al. - Myosin heavy chain messenger RNA and protein isoform transitions during cardiac hypertrophy. Interaction between hemodynamic and thyroid hormone – induced signals. *J Clin Invest* 1987; **79**: 970-7.
- 12 Izumo S, Nadal-Guinard B, Mahdavi V - Proto-oncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 339-43.
- 13 Rozich J D, Barnes M A, Schmid P G, Zile M R, McDermott P J, Cooper G 4th - Load effects on gene expression during cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 1995; **27**: 485-99.
- 14 Jonas R A, Giglia T M, Sanders S P et al. - Rapid, two-stage arterial switch for transposition of the great arteries and intact ventricular septum beyond the neonatal period. *Circulation* 1989; **80**(3 Pt 1): I203-8.
- 15 Bosisio I B J - Avaliação do desempenho do ventrículo esquerdo na operação de Jatene em transposição das grandes artérias com septo ventricular íntegro preparo rápido. [Tese. Doutorado] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 1997.
- 16 Boutin C, Wernovsky G, Sanders S P, Jonas R A, Castañeda A R, Colan S D - Rapid two-stage arterial switch operation: evaluation of left ventricular systolic mechanics late after in acute pressure overload stimulus in infancy. *Circulation* 1994; **90**:1294-303.
- 17 Bishop S P & Melsen L R - Myocardial necrosis, fibrosis, and DNA synthesis in experimental cardiac hypertrophy induced by sudden pressure overload. *Circ Res* 1976; **39**: 238-45.
- 18 Siehl D L, Gordon E E, Kira Y, Chua B H L, Morgan H E - Protein degradation in the hypertrophic heart. In: Glaumann H & Ballard F J, eds. *Lysosomes: their role in protein breakdown*. London, Academic, 1987.
- 19 Zimmer H G, Ibel H, Gerlach E - Significance of the hexose monophosphate shunt in experimentally induced cardiac hypertrophy. *Basic Res Cardiol* 1980; **75**: 207-13.
- 20 Takahashi Y, Nakano S, Shimazaki Y et al. - Echocardiographic comparison of postoperative left ventricular contractile state between one and two-stage arterial switch operation for simple transposition of the great arteries. *Circulation* 1991; **84** (5 Suppl.): III180-6.
- 21 Assad R S, Cardarelli M, Abduch M C D, Aiello V D, Maizato M, Jatene A D - Bandagem reversível do tronco pulmonar: modelo experimental para preparo rápido do ventrículo pulmonar. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 1998; **13**: 239-48.
- 22 Assad R S, Cardarelli M, Abduch M C D et al. - Reversible pulmonary artery banding with balloon catheter: assessment of rapid pulmonary ventricular hypertrophy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; **120**: 66-72.
- 23 Dias C A, Assad R S, Caneo L F et al. - Modelo experimental de bandagem ajustável do tronco pulmonar: novo dispositivo para preparo rápido do ventrículo. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2000; **15**: 328-37.

- 24 Canêo L F, Dias C A, Assad R S et al. - Preparo do ventrículo subpulmonar através de dois modelos ajustáveis de estenose do tronco pulmonar: estudo experimental. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2001; **16**: 35-48.
- 25 Fulton R M, Hutchinson E C, Jones A M - Ventricular weight in cardiac hypertrophy. *Br Heart J* 1952; **14**: 413-20.
- 26 Bishop S P & Cole C R - Production of externally controlled progressive pulmonic stenosis in the dog. *J Appl Physiol* 1969; **26**: 659-63.
- 27 Bradford M M - A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**: 248-54.
- 28 Hollander M & Wolfe D A - *Nonparametrics statistical methods*. New York: John Wiley & Sons, 1973:138-51.
- 29 Siegel S - *Estatística não-paramétrica*. New York: McGraw-Hill, 1975:131-44.
- 30 Vandenberg H H - Mechanical forces and their second messengers in stimulating cell growth in vitro. *Am J Physiol* 1992; **262**(3 Pt 2): R350-5.
- 31 Bruckschlegel G, Holmer S R, Jandeleit K et al. - Blockade of the renin-angiotensin system in cardiac pressure-overload hypertrophy in rats. *Hypertension* 1995; **25**: 250-9.
- 32 Kojima M, Shiojima I, Yamazaki T et al. - Angiotensin II receptor antagonist TCV-116 induces regression of hypertensive left ventricular hypertrophy in vivo and inhibits the intracellular signaling pathway of stretch-mediated cardiomyocyte hypertrophy in vitro. *Circulation* 1994; **89**: 2204-11.
- 33 Sadoshima J, Xu Y, Slayter H S, Izumo S - Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell* 1993; **75**: 977-84.
- 34 Sadoshima J & Izumo S - Molecular characterization of angiotensin II induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts: a critical role of the ATI receptor subtype. *Circ Res* 1993; **73**: 413-23.
- 35 Schorb W, Booz G W, Dostal D E, Conrad K M, Chang K C, Baker K M - Angiotensin II is mitogenic in neonatal rat cardiac fibroblasts. *Circ Res* 1993; **72**: 1245-54.
- 36 Zhuo J, Allen A M, Yamada H, Sun Y, Mendelsohn F A O - The cardiac renin angiotensin system. In: Lindpaintner K & Ganten D, eds. *Localization and properties of the angiotensin - converting enzyme and angiotensin receptors in the heart*. New York: Futura Publishing, 1994.
- 37 Boutin C, Jonas R A, Sanders S P, Wernovsky G, Mone S M, Colan S D - Rapid two-stage arterial switch operation: acquisition of left ventricular mass after pulmonary artery banding in infants with transposition of the great arteries. *Circulation* 1994; **90**: 1304-9.
- 38 Mavroudis C & Backer C L - Arterial switch after failed atrial baffle procedures for transposition of the great arteries. *Ann Thorac Surg* 2000; **69**: 851-7.
- 39 Däbritz S, Engelhardt W, von Bernuth G, Messmer B J - Trial of pulmonary artery banding: a diagnostic criterion for 'one-stage' arterial switch in simple transposition of the great arteries beyond the neonatal period. *Eur J Cardiothoracic Surg* 1997; **11**:112-6.
- 40 Davis A M, Wilkinson J L, Karl T R, Mee R B - Transposition of the great arteries with intact ventricular septum: arterial switch repair in patients 21 days of age or older. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; **106**: 111-5.
- 41 Carroll S M, Nimmo L E, Knoepfler P S, White F C, Bloor C M - Gene expression in a swine model of right ventricular hypertrophy: intracellular adhesion molecule, vascular endothelial growth factor and plasminogen activators are upregulated during pressure overload. *J Mol Cell Cardiol* 1995; **27**: 1427-41.
- 42 White F C, Nakatani Y, Nimmo L, Bloor C M - Compensatory angiogenesis during progressive right ventricular hypertrophy. *Am J Cardiovasc Pathol* 1992; **4**: 51-68.
- 43 Kassab G S, Imoto K, White F C, Rider C A, Fung Y C, Bloor C M - Coronary arterial tree remodeling in right ventricular hypertrophy. *Am J Physiol* 1993; **265**(1 Pt 2): H366-75.
- 44 Wong K, Boheler R, Bishop J, Petrou M, Yacoub M H - Clenbuterol induces cardiac hypertrophy with normal functional, morphological and molecular features. *Cardiovasc Research* 1998; **37**: 115-22.