

Márjory Fernanda Bussoni

**O PAPEL DO TRÂNSITO DE CÁLCIO E DE
COMPOSTOS DA MATRIZ EXTRACELULAR NO
MODELO DE INSUFICIÊNCIA AÓRTICA AGUDA
EXPERIMENTAL EM RATOS**

Pesquisa apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Câmpus de Botucatu, para prova de Doutorado
do Programa de Fisiopatologia em Clínica Médica

Orientadora: Profa. Dra. *Paula Schmidt Azevedo Gaiolla*

Co-orientador: Prof. Dr. *Marcos F. Minicucci*

Botucatu
2015

Dedicatória

Aos meus PAIS, que estiveram sempre do meu lado, apoiando e incentivando minhas escolhas, não somente no percurso deste trabalho, mas durante toda minha vida.

Agradecimentos

Ao Dr. LUIZ S. MATSUBARA que, inicialmente, orientou-me nesse projeto. Obrigada por todos os ensinamentos, pela confiança na minha capacidade, pelo respeito e humildade, pela amizade e paciência.

À Dra. PAULA S. GAIOLLA que, prontamente, aceitou assumir a continuação desse projeto. Obrigada por sua dedicação, paciência e pelos ensinamentos.

À Dra. BEATRIZ S. MATSUBARA, pela preocupação e contribuição nesse trabalho, pelo respeito e pela amizade

À Dra. MELIZA, que com muita paciência e carinho, realizou os ecocardiogramas.

À Dra. BERTHA, sempre dedicada e acessível, realizou as cirurgias experimentais e análises experimentais.

Aos funcionários do Laboratório Experimental MARIO BRUNO (in memoriam), ELENIZE, CORINA, ROGÉRIO por colaborarem efetivamente para a realização deste trabalho.

À PRISCILA, que com sua experiência e conhecimento, ajudou-nos na continuação das análises experimentais

Aos Professores Dr. LEONARDO ZORNOFF e Dr. SÉRGIO PAIVA, pela atenção e valiosas sugestões prestadas no exame de qualificação.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Médica ALEXANDRE LUIS LOUREIRO, ANA MARIA MENGUE, BRUNO JOSÉ FAJIOLLI, ELISÂNGELA APARECIDA DA SILVA, RENATO BORGES PEREIRA, pela atenção e gentileza com que sempre me ajudaram.

Ao MARIO AUGUSTO DALLAQUA, pela bela editoração da tese.

Aos FUNCIONÁRIOS DA SEÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO, pelo profissionalismo e eficiência em suas atividades.

Meus sinceros agradecimentos e respeito a TODOS vocês. Obrigada por tornarem concreto esse projeto!

Sumário

Resumo.....	1
Abstract	4
1. Introdução	7
2. Casuística e Métodos.....	14
2.1 Animais	15
2.2 Regurgitação aórtica.....	15
2.3 Estudo doppler-ecardiográfico	16
2.4 Análise morfométrica.....	17
2.5 Determinação da atividade de metaloproteinase no miocárdio.....	18
2.6 Determinação da atividade do inibidor tecidual de metaloprotease (TIMP)	19
2.7 Expressão Gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR)	20
2.7.1 Extração do ácido ribonucleico	20
2.7.2 Transcrição reversa do RNA.....	22
2.8 Determinação das proteínas do trânsito de cálcio – Western Blot.....	23
2.8.1 Extração das proteínas miocárdicas	24
2.8.2 Eletroforese em gel.....	24
2.8.3 Transferência e identificação das proteínas	25
2.8.4 Anticorpos primários	26
2.8.5 Anticorpos secundários.....	26
2.9 Métodos estatísticos	26
3. Resultados	28
4. Discussão.....	49
5. Conclusões.....	56
6. Referências Bibliográficas	58

Lista de Abreviaturas e Siglas

IAo: insuficiência aórtica

VE: ventrículo esquerdo

Ryr: receptores rianodínicos

Serca2a: enzima Retículo Sarcoplasmático Cálcio ATPase

MEC: matriz extracelular

TIMP: inibidores tecidual de metaloprotease

MMP2: metaloprotease 2

DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo

DSVE: diâmetro sistólico do VE

PP: espessura da parede posterior

AE: diâmetro do átrio esquerdo

AO: diâmetro da aorta

VSVE: diâmetro da via de saída do ventrículo esquerdo

E: fluxo transmitral precoce

A: fluxo transmitral tardio

VAO: velocidade máxima do fluxo sanguíneo na via de saída do ventrículo esquerdo

VTI: integral tempo-velocidade na saída do ventrículo esquerdo

L: diâmetro longitudinal do ventrículo esquerdo, na posição apical 4-câmaras

I: diâmetro transversal do ventrículo esquerdo, na posição apical 4-câmaras

I/L: índice de esfericidade

iMVE: índice de massa do ventrículo esquerdo

%E: porcentagem de encurtamento do ventrículo esquerdo

E': velocidade de deslocamento do anel mitral durante a diástole

S' mitral: velocidade máxima do anel mitral durante a sístole

RNA: ácido ribonucleico

RNA_m: RNA mensageiro

RT-PCR: Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

cDNA: ácido desoxirribonucléico complementar

GAPH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

VE/PC: razão peso do ventrículo esquerdo e peso corporal

Resumo

Fundamento: Os mecanismos envolvidos na remodelação cardíaca por sobrecarga de volume e o momento que a hipertrofia excêntrica apresenta prejuízo da função cardíaca são pouco conhecidos. **Objetivos:** a) Comparar alterações morfofuncionais, celulares (hipertrofia) e intersticiais (fibrose) em diferentes momentos da evolução da insuficiência aórtica; b) Verificar quais dos seguintes mecanismos estão envolvidos na remodelação cardíaca induzida pela IAo e em qual momento esta alteração acontece: alteração na metaloprotease 2 (MMP2) e do inibidor tecidual de metaloprotease 1 (TIMP1), alterações dos RNAs mensageiros específicos para a codificação das proteínas envolvidas na homeostase do cálcio (Fosfolambam, Ryr e Serca2a), alterações da expressão de proteínas fosfolambam e Serca2a do trânsito de cálcio. **Casuística e Métodos:** Estudo experimental com 64 ratos Wistar machos, 32 animais submetidos à insuficiência aórtica aguda (grupo IAo) e 32 animais a procedimento simulado (grupo Controle). Todos os animais foram seguidos com 1, 4, 8 e 12 semanas através de ecocardiogramas seriados e, após eutanásia, foram analisada morfometria do tecido cardíaco, atividade da MMP2 e TIMP-1, expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real das proteínas do trânsito de cálcio, expressão das proteínas Serca2a e fosfolambam pela técnica Western Blot. A análise estatística foi efetuada pela ANOVA de dois fatores; o pós teste de Holm Sidak; teste t grupo a grupo; Anova de 1 via, complementada por Tukey; correção por Bonferroni; teste de correlação de Spearman e teste de correlação de Pearson. Em todos os casos, o nível de significância adotado foi $p < 0,05$. **Resultados:** Observou-se, na primeira semana, que o peso do VE e a pressão diastólica foi maior no grupo IAo. Na quarta semana, MMP2, TIMP-1, iMVE e fração de colágeno foram maiores no grupo IAo. A área do miócito e DDVE foram maiores no grupo IAo em comparação ao grupo Sham, a partir da oitava semana. Nas semanas 8 e 12 a PP dos animais com IAo foi maior que do grupo sham. A relação 2PP/DDVE não foi diferente entre os dois grupos. O índice de esfericidade foi maior no grupo IAo nos momentos 1, 8 e 12 semanas O grupo IAo apresentou maior diâmetro do átrio esquerdo em relação ao Sham nas quarta e décima segunda semanas. A variável porcentagem de encurtamento foi menor no grupo IAo quando comparado ao grupo Sham, na décima segunda semana. O débito

cardíaco foi maior no grupo IAo em relação Sham e houve aumento com o tempo de evolução nos dois grupos. As expressões relativas dos RNAm da Serca2a, Ryr e fosfolambam não foram diferentes entre os grupos. Não houve diferença entre os grupos na quantificação da proteína Serca2a, já a fosfolambam fosforilada foi maior no grupo Sham, não sendo possível detectar o momento no qual essa diferença ocorreu. **Conclusão:** A anormalidade mais precoce foi no índice de esfericidade. Alterações nas MMP-2 e TIMP-1 aconteceram no mesmo momento em que se observou aumento de fibrose, mas antecederam a dilatação do VE. Houve aumento do AE na quarta semana, sugerindo a presença de disfunção diastólica. É possível que existam alterações no trânsito de cálcio, mas não foi possível identificar o momento. A espessura relativa da parede manteve-se semelhante entre os grupos, mostrando perfil de hipertrofia excêntrica. A última anormalidade observada foi a redução da fração de ejeção.

Abstract

Background: The mechanisms that are involved in cardiac remodeling by volume overload and the moment the eccentric hypertrophy has impaired cardiac function are largely unknown. Objectives: a) to compare morphological, cell (hypertrophy) and interstitial (fibrosis) changes at different times of the evolution of aortic regurgitation (AR); b) to analyze which of the following mechanisms are involved in cardiac remodeling induced by aortic failure and at what moment this change takes place: change in the metalloprotease 2 (MMP 2) and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1); changes of messenger RNAs to code proteins involved in calcium homeostasis (phospholamban, Ryr and SERCA2a), changes in expression of phospholamban and SERCA2a in the calcium transit. **Methods:** Experimental study with 64 male Wistar rats, 32 animals submitted to acute aortic regurgitation (AR group) and 32 animals sham procedure (Sham group). All animals were followed with 1, 4, 8 and 12 weeks by serial echocardiography and after euthanasia, were analyzed morphometry of cardiac tissue, the activity of MMP2 and TIMP-1, gene expression by RT-PCR of calcium homeostasis protein, SERCA2a and phospholamban expression by Western Blotting. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA; the Holm Sidak post test; t test group to group; Anova one way, complemented by Tukey; Bonferroni correction; Spearman correlation test and Pearson's correlation test. In all cases, the significance level was set at $p < 0.05$. **Results:** In the first week it was observed that weight of the LV and diastolic blood pressure were higher in the AR group. In the fourth week, MMP 2, TIMP-1, and collagen fraction were higher in the AR group. The myocyte area and left ventricle diastolic diameter (LVDD) were higher in the AR group compared to the sham group, from the eighth week. At weeks 8 and 12, the wall thickness (WT) was higher in the AR group than the sham group. The relationship $2WT / LVDD$ was not different between the two groups. The sphericity index was higher in the group AR at times 1, 8 and 12 weeks. The AR group had higher left atrial diameter compared to Sham in the fourth and twelfth weeks. The fractional shortening was lower in the AR group compared to the Sham group, the twelfth week. Cardiac output was higher in the AR group compared Sham group and there was increase with the time of evolution in both groups. The expressions of mRNA of SERCA2a,

phospholamban and Ryr were not different between groups. There was no difference between groups in the quantification of SERCA2a protein. However the phosphorylated phospholamban was higher in the sham group, not being able to detect the moment when this difference occurred. **Conclusions:** The earliest abnormality was the sphericity index. Changes in MMP-2 and TIMP-1 occurred at the same time that was observed increase of fibrosis, but prior to LV dilatation. There was increase of the left atrial diameter in the fourth week, suggesting the presence of diastolic dysfunction. There may be changes in calcium transit, but could not identify the moment. There may be changes in calcium transit, but it was not possible to identify this moment. The relative wall thickness remained similar between groups, showing eccentric hypertrophy profile. The last abnormality observed was a reduction in fractional shortening.

1. Introdução

A hipertrofia miocárdica é o principal mecanismo adaptativo às sobrecargas hemodinâmicas crônicas. Estas são caracterizadas por sobrecargas de pressão ou de volume¹. As causas da sobrecarga de pressão são a hipertensão arterial sistêmica, coarctação da aorta, estenose da aorta e hipertensão arterial pulmonar. As sobrecargas de volume são devido às fístulas arteriovenosas, comunicação intra-atrial, insuficiência mitral e insuficiência aórtica. Caracteristicamente, a sobrecarga de volume promove uma hipertrofia de padrão excêntrica enquanto a sobrecarga de pressão está associada à hipertrofia concêntrica.²

A insuficiência aórtica (IAo) é a única doença valvar que cursa com a coexistência de sobrecarga volumétrica e sobrecarga pressórica. A primeira é decorrente do volume regurgitante que aumenta o volume ventricular durante a diástole. A segunda é secundária à ejeção que ocorre com excesso de volume e consequente, aumento da pressão sistólica.¹ Na regurgitação aórtica, a hipertrofia excêntrica, inicialmente sem disfunção cardíaca, permite ao ventrículo esquerdo (VE) aumentar sua capacidade de conter o excesso de volume. Isto é, há aumento da complacência do VE. Como consequência, a pressão de enchimento ventricular permanece em níveis normais e o fluxo diastólico atrioventricular ocorre sem sobrecarga para o átrio esquerdo.^{1,3} Entretanto, pouco se sabe sobre o momento em que o coração, com esta sobrecarga de volume e hipertrofiado, passa de um estado sem disfunção para um estado com disfunção cardíaca.

Embora a hipertrofia cardíaca seja necessária como mecanismo adaptativo às sobrecargas, é também fator de risco para insuficiência cardíaca, configurando maior morbimortalidade àqueles que a apresentam.⁴ Assim, a manutenção da sobrecarga leva à alterações miocárdicas que culminam na falência progressiva da função ventricular esquerda.⁵ De fato, as presenças de hipertrofia concêntrica e excêntrica configuram 40% e 90% de risco para desenvolvimento de insuficiência cardíaca, respectivamente.⁴ O processo fisiopatológico, que leva o coração acometido por sobrecarga pressórica ou volumétrica aos estados de hipertrofia concêntrica ou excêntrica, é denominado remodelação cardíaca. Neste processo existem alterações moleculares, bioquímicas, intersticiais e celulares alterando a forma, tamanho, peso e

geometria cardíaca que, inicialmente, auxiliam o coração a se adaptar a uma agressão. Entretanto, se o insulto ao coração não for controlado, o processo de remodelação promove disfunção ventricular diastólica e sistólica.^{6,7} O fato é que, a presença de hipertrofia cardíaca e outras alterações encontradas no processo de remodelação, podem permanecer assintomáticas por anos e somente serem detectadas em fases mais avançadas, que muitas vezes podem ser irreversíveis.⁸

A hipertrofia concêntrica caracteriza-se, inicialmente, por replicação em paralelo dos sarcômeros de modo a aumentar a espessura de parede, mantendo a tensão parietal próximo ao normal.⁹ Adicionalmente, ocorre aumento do diâmetro dos miócitos, que é acompanhado por ativação de metaloproteases e fibrose intersticial miocárdica. Além disso, ocorrem redução da reserva coronariana, ativação de genes fetais e aumento da apoptose. Conseqüentemente, a manutenção da sobrecarga pressórica, acarretará disfunção miocárdica que, tipicamente, se inicia com disfunção ventricular diastólica.^{2,9,10}

O processo de adaptação que ocorre na sobrecarga de volume é bastante diferente e menos estudado que o processo de adaptação à sobrecarga pressórica. Nessa situação, o aumento da tensão de parede ocorre na diástole, provocando a replicação em série dos sarcômeros, alongamento dos miócitos e aumento do diâmetro da cavidade ventricular. No processo inicial de remodelação, há aumento proporcional da espessura da parede, de modo que a hipertrofia excêntrica é capaz de normalizar a tensão parietal e preservar a função ventricular.¹ No entanto, havendo manutenção da sobrecarga, ocorre aumento progressivo do diâmetro da cavidade, sem o aumento proporcional da espessura da parede miocárdica. A consequência disso é sobrecarga hemodinâmica e falência progressiva do VE.⁵

Utilizando-se um modelo de sobrecarga de volume, Wang et al.¹¹ analisaram as alterações estruturais e hemodinâmicas do coração ao longo de 1, 2, 4, 8 e 16 semanas de evolução após o modelo de fístula aorto-cava. Foram observados três estágios de hipertrofia ventricular durante o seguimento. A hipertrofia ventricular surgiu com duas semanas, sendo acompanhada de aumento rápido da massa ventricular direita e esquerda. Entretanto, entre 2 e 8 semanas não houve alteração do desempenho hemodinâmico. Entre 8 a 16

semanas ocorreu aumento da tensão de parede e os animais do experimento desenvolveram insuficiência cardíaca com prejuízo significativo da função ventricular.

De Stefano et al.¹² acompanharam a evolução da função diastólica e sistólica de ratos Wistar, submetidos à fístula arteriovenosa infra-renal, durante oito semanas. Os autores observaram que, embora o VE com hipertrofia excêntrica apresentasse aumento da sua complacência, os índices de contração e de relaxamento se associaram inversamente ao peso do VE. Isto é, nessa condição experimental, o enchimento diastólico poderia ocorrer com baixas pressões, prevenindo os fenômenos congestivos próprios da insuficiência cardíaca. No entanto, já haveria sinais de disfunção miocárdica, a qual foi proporcional ao grau de hipertrofia.

Plante et al.¹³, em um modelo fistula aorto-cava, observaram, por meio da análise ecocardiográfica de 2 semanas, 6 meses e 12 meses, que ratos Wistar desenvolviam dilatação ventricular progressiva, hipertrofia excêntrica e disfunção sistólica a partir de 6 meses de seguimento, mimetizando a evolução da doença em humanos.

Recentemente, Roscani et al.⁸ estudaram o modelo de insuficiência aórtica após 1, 4, 8 e 16 semanas. Quando comparado dentro do grupo com insuficiência aórtica da 1ª semana, houve aumento do átrio esquerdo na 4ª e 8ª semanas. Houve ainda aumento do diâmetro diastólico do VE nas 8ª e 16ª semanas, quando comparados com a 1ª semana. A fração de encurtamento reduziu na 8ª, assim como o índice de esfericidade. Neste trabalho os autores propõem que o índice de esfericidade é uma forma de se avaliar a função sistólica, já que apresenta boa correlação com fração de encurtamento.

Desta forma, observa-se que o processo de remodelação vai acontecendo gradativamente até que exista comprometimento da função ventricular. Entretanto, os mecanismos envolvidos no processo de remodelação, causado por sobrecarga de volume, são pouco conhecidos. Nesse contexto, metaloproteases, inibidores de metaloproteases e fibrose intersticial são potenciais fatores que podem estar envolvidos com a dilatação e disfunção ventricular. Adicionalmente, faz-se necessário investigar marcadores bioquímicos

precoces de disfunção diastólica ou sistólica, como por exemplo, as proteínas do trânsito de cálcio.

Em relação à matriz extracelular (MEC), sabe-se que esta é composta por proteínas, moléculas sinalizadoras, proteases e células que apresentam papel fundamental para estrutura e função cardíaca. O colágeno tipo I e tipo III da MEC são proteínas fundamentais para a manutenção da organização, alinhamento e orientação das fibras musculares. Adicionalmente, a relação entre colágeno-integrinas-citoesqueleto-miofibrilas auxilia na manutenção da estrutura cardíaca e também na contração muscular. O equilíbrio entre síntese e degradação do colágeno acontece por ação de enzimas dependentes de zinco, chamadas de metaloproteases. Existem mais de 25 metaloproteases divididas em colagenases, gelatinases, estromelisinases e metaloproteases de membrana, dependendo da estrutura da MEC que elas degradam. Outro ponto importante para o equilíbrio entre síntese e degradação de colágeno é a presença de inibidores teciduais de metaloproteases (TIMPs - tissue inhibitor of metaloproteinases). Os TIMPs são proteínas de baixo peso molecular que se ligam às metaloproteases, inibindo sua ação. Entretanto vários estudos mostram que eles podem ter ações independentes das metaloproteases, como por exemplo, anti-apoptótica e anti-inflamatória.¹⁴ O equilíbrio entre TIMPs e metaloproteases são importantes em condições normais ou patológicas de diferentes tecidos.

A atividade colagenolítica também se modifica durante a dilatação ventricular no modelo de sobrecarga de volume levando à redução do colágeno ao redor dos miócitos, que favorece o alongamento e deslizamento de miofilamentos, resultando em perda da geometria da câmara. A redução do colágeno encontrado na hipertrofia excêntrica conta com a participação da ação excessiva de metaloproteases. Dolgilevich et al.¹⁵, em modelo de fístula aorto-cava em ratos, avaliou por meio de ecocardiogramas seriados, a progressão para alteração da geometria ventricular e correlacionou tal evento ao aumento da expressão gênica da atividade da colagenase, corroborando com a hipótese de que o aumento da degradação de colágeno pode ser um pré-requisito para a dilatação ventricular neste modelo. As gelatinases 2 e 9 degradam colágeno fibrilar, proteínas de membrana como o colágeno tipo IV, fibronectina, laminina e

proteoglicanas. Alterações das metaloproteases 2 e 9 já foram descritas nos modelos de sobrecarga de volume sugerindo suas participações na dilatação da cavidade, afinamento da musculatura e na disfunção ventricular.^{16,17}

Considerando os TIMPs, o aumento destes está associado com menor atividade de várias metaloproteases, atenuando efeitos deletérios destas enzimas.¹⁴ Adicionalmente, camundongos *null mice* para TIMP apresentaram intensa dilatação ventricular por não haver inibição de metaloproteases.¹⁸

Em relação ao trânsito de cálcio, pode-se dizer que este é um dos mecanismos envolvidos na disfunção do miocárdio hipertrofiado. A função inadequada de várias proteínas reguladoras dessa homeostase pode afetar profundamente tanto a contração como o relaxamento miocárdico. No coração normal, imediatamente após a despolarização do sarcolema, o cálcio entra na célula por meio dos canais de cálcio. O íon ativa os receptores rianodínicos (Ryr) do retículo sarcoplasmático que libera grande quantidade de cálcio para o citoplasma, para a contração. Imediatamente o cálcio é re-captado pelo retículo sarcoplasmático, por meio da ação da enzima Retículo Sarcoplasmático Cálcio ATPase (Serca2a). A ação da enzima ocorre após a fosforilação da fosfolambam, que tem efeito inibitório sobre a Serca2a.¹⁹

Na hipertrofia miocárdica ou na insuficiência cardíaca, várias dessas proteínas são sintetizadas em quantidade insuficiente ou com função alterada. Entre as alterações, podem ser destacadas a diminuição dos canais de cálcio, dos Ryr e da enzima Serca2a. Também há aumento relativo da fosfolambam. O efeito é redução da oferta de cálcio para a sístole e excesso de cálcio durante a diástole. Como consequência, há diminuição da contratilidade miocárdica e retardo do relaxamento.²⁰

Em resumo, os mecanismos envolvidos na remodelação cardíaca por sobrecarga de volume permanecem por serem elucidados. Alterações como hipertrofia excêntrica podem apresentar fase assintomática, com mecanismos adaptativos, que são fatores de risco para mau prognóstico. Entretanto, os mecanismos envolvidos na dilatação ventricular e disfunção miocárdica na sobrecarga de volume são pouco conhecidos. Adicionalmente, os mecanismos e momento que a hipertrofia excêntrica apresenta prejuízo da função cardíaca são

pouco conhecidos. Sendo assim, as hipóteses deste estudo são a) a dilatação ventricular na IAo aguda está associada a alterações na MEC; b) a disfunção ventricular ocorre em associação com alterações bioquímicas dos miócitos, prejudicando a homeostase do cálcio; c) estas alterações acontecem em determinado momento que pode ser após 1, 4, 8 e 12 semanas após o início da sobrecarga.

Os objetivos do presente estudo foram:

1. Comparar alterações morfofuncionais, celulares (hipertrofia) e intersticiais (fibrose) em diferentes momentos da evolução da insuficiência aórtica.
2. Verificar quais dos seguintes mecanismos estão envolvidos na remodelação cardíaca induzida pela IAo e em qual momento esta alteração acontece:
 - a) Alteração na metaloprotease 2 (MMP2) e do inibidor tecidual de metaloprotease 1 (TIMP1)
 - b) Alterações dos RNAs mensageiros específicos para a codificação das proteínas envolvidas na homeostase do cálcio (Fosfolambam, Ryr e Serca2a).
 - c) Alterações da expressão de proteínas fosfolambam e Serca2a do trânsito de cálcio

2. Casuística e Métodos

2.1 Animais

Foram utilizados 64 ratos Wistar machos para estudo com peso corporal inicial aproximado de 250g provenientes do Biotério Central da Unesp, campus de Botucatu. Os animais foram, aleatoriamente, separados em dois grupos: **Grupo IAO** composto por 32 animais submetidos ao procedimento para indução de insuficiência aórtica aguda e estudados 1 semana (IAO 1), 4 semanas (IAO 4), 8 semanas (IAO 8) e 12 semanas (IAO 12) após a cirurgia de criação de insuficiência aórtica; **Grupo Controle** composto por 32 animais submetidos ao procedimento simulado e estudados após 1 semana (Sham 1), 4 semanas (Sham 4), 8 semanas (Sham 8) e 12 semanas (Sham 12) após a cirurgia simulada.

2.2 Regurgitação aórtica

O modelo de regurgitação aórtica foi realizado utilizando-se uma modificação da técnica descrita por Plante et al.¹³ Sob anestesia com pentobarbital a 4% (0,1ml/Kg), a artéria carótida comum direita foi dissecada e canulada com cateter de policloreto de vinila (0,05mm de diâmetro), preenchido com solução fisiológica heparinizada e o cateter foi avançado até atingir o VE. A seguir, o cateter foi recuado o suficiente para retornar à aorta e ficar bem próximo à valva aórtica. Um fio guia de aço (próprio do cateter de anestesia epidural 0,34mm) foi introduzido através do cateter na carótida de modo a produzir lesões puntiformes repetidas na valva aórtica. O procedimento era finalizado quando não havia mais qualquer resistência ao avanço do fio guia.

O grupo de cirurgia fictícia foi constituído de animais submetidos aos mesmos procedimentos, porém sem a perfuração da valva aórtica. A presença e caracterização qualitativa da gravidade de IAo foram confirmadas por ecocardiograma, uma semana após a cirurgia.

Os animais que não apresentavam IAo de moderada a importante foram excluídos do estudo.

2.3 Estudo Doppler-ecocardiográfico

O estudo foi realizado por meio de doppler-ecocardiografia transtorácica convencional com equipamento Phillips (TDI 5500), seguindo-se a padronização descrita na literatura.²¹

Os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50mg/kg) e cloridrato de xilidino (1mg/kg) por via intramuscular, seguido de tricotomia da região anterior do tórax. Após estes procedimentos, os animais foram posicionados em decúbito dorsal para realização do ecocardiograma. Foram analisadas imagens monodimensionais obtidas com o feixe de ultra-som orientado pela imagem bidimensional, obtida com o transdutor na posição paraesternal eixo menor. A imagem da cavidade ventricular esquerda foi obtida posicionando o cursor do modo M logo abaixo do plano da valva mitral entre os músculos papilares. As imagens da aorta e do átrio esquerdo também foram obtidas na posição paraesternal eixo menor com o cursor do modo-M passando pelas válvulas da valva aórtica. As medidas, em milímetros, do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE), diâmetro sistólico do VE (DSVE), espessura da parede posterior (PP), diâmetro do átrio esquerdo (AE) e diâmetro da aorta (AO) foram realizadas, por meio do cursor do próprio equipamento, durante o exame. Três a cinco ciclos consecutivos foram utilizados para a realização das medidas, obtendo-se a média aritmética em seguida. As imagens dos registros das câmaras ventriculares, modo M, foram arquivadas para eventuais consultas posteriores.

O diâmetro da via de saída do VE (VSVE, cm) foi obtido na janela paraesternal, no modo bidimensional.

Os fluxos diastólicos transmitral e sistólico transvalvar aórtico foram obtidos com o transdutor colocado nas posições apicais quatro e cinco câmaras, respectivamente, permitindo as medidas da onda E (E, cm/s), onda A (A, cm/s), velocidade máxima do fluxo sanguíneo na via de saída do VE (VAO, cm/s) e a integral tempo-velocidade (VTI) na via de saída do VE. A frequência cardíaca foi estimada pelo tempo entre dois batimentos consecutivos. As medidas referentes aos fluxos também foram realizadas diretamente no monitor do ecocardiógrafo, obedecendo a mesma sistemática descrita acima.

A área do átrio esquerdo (cm²) foi obtida a partir da planimetria na janela apical quatro câmaras. As medidas dos eixos maior (L) e menor (l) do VE foram obtidas na janela apical, através do cálculo da maior distância entre o anulo mitral e o ápice do VE na diástole e o diâmetro transversal entre o endocárdio da parede septal e o endocárdio da parede lateral, respectivamente.

A regurgitação aórtica foi considerada significativa quando, no mapeamento de fluxo a cores, observava-se fluxo retrógrado e holodiastólico na porção distal da aorta descendente e o jato regurgitante ocupava mais de 50% do diâmetro da via de saída do VE.²²

As outras variáveis derivadas de cálculos matemáticos, a partir das medidas obtidas estão descritas abaixo:

- 2PP/DDVE
- AE/AO
- %E = [(DDVE - DSVE) / DDVE] x 100 (%), sendo %E a porcentagem de encurtamento do VE
- DC = D²x0,785 VTI x FC, sendo DC - débito cardíaco
- E/A
- l/L = índice de esfericidade
- iMVE = {[(DDVE + 2X PP)³ - DDVE³] X 1,04} / PC, sendo iMVE o índice de massa do ventrículo esquerdo

2.4 Análise morfométrica

Após a eutanásia dos animais, amostras de tecido cardíaco foram fixadas em solução tamponada de formol a 10% por período de 48 horas. Após a fixação, o tecido foi incluso em blocos de parafina, obtendo-se a seguir, cortes histológicos coronais de 4 micras para coloração com Hematoxilina-Eosina e Masson. Cortes histológicos de 6 micras foram corados pelo Picro Sirius red, específico para colágeno, para avaliação do interstício do miocárdio.

Os cortes histológicos corados pelo Hematoxilina-Eosina foram utilizados para análise da área seccional do miócito e para identificação de infiltrado inflamatório, alterações vasculares, intersticiais ou miocárdicas. As

lâminas coradas pelo Picro Sirius red foram utilizadas para a quantificação da fração de colágeno intersticial por meio de vídeo-densitometria. O colágeno perivascular foi excluído da presente análise.

2.5 Determinação da atividade da metaloprotease no miocárdio

A atividade colagenolítica do extrato de tecido cardíaco foi determinada por meio de medida da capacidade de digestão de gelatina presente em gel de poliacrilamida, método este conhecido por zimografia.²³

Os corações foram inicialmente descongelados a temperatura ambiente e, a seguir, 50 mg do tecido foram incubados em tampão 10 mM cacodilato de sódio; 0,15 M NaCl; 10^{-6} M ZnCl; 20 mM CaCl₂; 1,5 mM NaN₃; 0,1% Triton X-100; pH=6,0 na proporção de 20 mg de tecido para 1 ml de tampão. A solução foi mantida em agitação contínua a 4 graus centígrados durante 24 horas. A seguir, o extrato foi coletado, guardado em refrigerador e o tecido incubado com tampão 10 mM cacodilato de sódio, 0,3 M NaCl; 10^{-6} M ZnCl; 20 mM CaCl₂; 1,5 mM NaN₃; 0,1% Triton X-100; pH=5,0, por 24 horas, em agitação contínua e a 4 graus centígrados. Após esse período o extrato foi coletado e adicionado ao primeiro extrato. A quantidade de proteína do concentrado foi determinada pelo método de Bradford e a concentração final ajustada para 1 mg/ml.

A atividade colagenolítica do extrato de tecido cardíaco foi determinada por meio de medida da capacidade de digestão de gelatina presente em gel de poliacrilamida. O gel de poliacrilamida a 7,5% foi preparado com gelatina (Sigma, Bloom 300) na proporção de 1mg/ml, em equipamento Mini-gel da Bio-Rad. O gel, devidamente polimerizado, foi montado em cuba de eletroforese vertical Mini-Protean II (Bio-Rad Laboratories), contendo tampão Tris-Glicina-SDS, pH 8,3. Trinta microlitros do extrato de tecido diluído (1:2) em tampão de amostra 0,06 M Tris; 2% SDS; 10% Glicerol; 0,025% Azul de Bromofenol; pH 6,8, foram aplicados, em cada poço do gel. A eletroforese foi efetuada com voltagem contínua de 80 V, amperagem inicial de 20 mA, durante 2 horas. Após a corrida eletroforética, o gel foi retirado e lavado duas vezes em

solução de Triton X-100, com agitação contínua, em intervalo de 30 minutos. Após a lavagem com Triton X-100, o gel foi incubado com tampão 40 mM Tris; 0,2 M NaCl; 10 mM CaCl₂; pH 7,6, com agitação contínua, durante a noite e à temperatura de 37° C. Terminada a incubação, o gel foi corado em solução de Comassie Blue R-250, durante 30 minutos. A descoloração do gel foi efetuada em banhos sucessivos com solução de ácido acético-etanol-água (10:30:60). Após a descoloração, o gel foi fotografado em equipamento Gel Logic (Carestream - EUA). A determinação do peso molecular foi efetuada pela comparação da migração de bandas de proteínas com padrão conhecido (Standard Molecular Weight - Biorad Laboratories). A determinação da atividade colagenolítica e estimativa do peso molecular foi efetuada por meio de software de análise de imagem Gel-pro 3.1 (Media Cybernatics EUA) que mensura a área de digestão da gelatina em unidade de imagem denominada pixel

2.6 Determinação da atividade do inibidor tecidual de metaloprotease (TIMP) no miocárdio

Para extração da proteína do tecido cardíaco foi adicionado 1,5 ml de tampão de extração (50 mM de tampão fosfato de potássio pH=7,0; 0,3 M sucrose; 0,5 mM de DTT; 1 mM de EDTA pH=8,0; PMSF 0,3 mM; NaF 10 mM; e inibidor de protease 1:100) à 60 mg de tecido cardíaco proveniente do septo interventricular. O material foi homogeneizado por 10 segundos, 2 vezes. O material extraído foi centrifugado por 20 min à 4° C com 12.000 rpm, e o sobrenadante coletado.

A quantidade de proteína do extrato foi determinada pelo método de Bradford e a concentração final ajustada para 1 mg/ml. Nesse extrato proteico foi avaliada a concentração de TIMP-1. Placas de 96 poços (Nunc) foram recobertas com solução contendo anticorpo purificado de captura anti-TIMP-1 de rato (R&D Systems), diluídos em tampão PBS. As placas foram incubadas à temperatura ambiente durante uma noite. Após sucessivas lavagens com solução PBS - Tween 20 (0.05%) foi adicionado 300 µL da solução de bloqueio, constituída de PBS contendo 1% de albumina, com incubação por 2 horas, à temperatura ambiente.

As placas foram novamente lavadas e incubadas por duas horas, à temperatura ambiente, com as amostras e as respectivas curvas de TIMP-1, diluídas na base 2em tampão PBS contendo 1% de albumina.

Decorrido o tempo de incubação, as placas foram lavadas e incubadas com os anticorpos anti-TIMP-1 de rato biotinizados, durante 2 horas, à temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram novamente incubadas com estreptoavidina diluída 1:200em tampão PBS contendo 1% de albumina, durante 20 minutos, à temperatura ambiente. Então, as placas foram lavadas e reveladas com OPD (Sigma). A reação foi interrompida por adição de H₂SO₄ 16% e a leitura realizada em 492 nm.

2.7 Expressão Gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR)

2.7.1 Extração do ácido ribonucléico (RNA)

Fragmentos do tecido cardíaco do ventrículo esquerdo de 6 animais de cada grupo foram coletados, após eutanásia dos animais e congelados em nitrogênio líquido e armazenados em Freezer a -80°C. No ensaio, as amostras congeladas foram homogeneizadas em aparelho Polytron (Ika Ultra Turrax® T25 Basic, Wilmington, NC, USA) após adição de 1 ml de TRIzol® (Invitrogen Brasil, São Paulo) para cada 100 mg de tecido. A amostra homogeneizada foi transferida para um tubo esterilizado de 1,5 mL e incubada à temperatura ambiente durante 5 minutos, para permitir a completa dissociação do complexo núcleo-proteico. Em seguida, adicionou-se clorofórmio (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) na proporção de 0,2 ml/1ml TRIzol® e a amostra foi agitada, manualmente, com vigor, por 15 segundos e incubada por 3 minutos à temperatura ambiente. Após essa segunda incubação, o material foi centrifugado (Eppendorf Centrifuge 5804R, Hamburg, Germany) a 12.000 x g durante 15 minutos a 4°C

A porção aquosa composta de RNA foi transferida para um tubo esterilizado de 1,5 mL. A seguir, adicionou-se álcool isopropílico (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) na proporção de 0,5 ml/1ml de TRIzol® e a amostra foi

agitada manualmente 10 vezes por inversão, incubada por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugada a 12.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Após desprezar o sobrenadante, o precipitado de RNA foi visualizado como um gel esbranquiçado e semitransparente aderido no fundo do tubo (*pellet*). Este foi lavado com álcool etílico 75% (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) na proporção de 1mL/1mL de TRIzol® e centrifugado a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C. Após o álcool etílico ser descartado, o *pellet* foi seco por 10 minutos à temperatura ambiente. O sedimento de RNA foi diluído em 20 µL de água ultrapura e incubado por 10 minutos a 60°C em banho-maria (Fanem 100, São Paulo, Brasil); este procedimento teve como finalidade inativar a possível presença de RNase.

A quantificação do RNA foi realizada com auxílio de espectrofotômetro (NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer Thermo Scientific - Nanodrop Technologies). Foram analisados os valores de absorbância para comprimentos de onda de 230, 260 e 280 nm e calculadas as razões entre as absorbâncias 260/230 e 260/280. As amostras cujas razões foram inferiores a 1,8, foram descartadas por apresentarem contaminação por proteínas. A concentração do RNA foi quantificada de acordo com a relação:

$$[\text{RNA}] = A_{260} \times 40 \times 70, \text{ onde:}$$

[RNA] = concentração de RNA (µg/ml)

A_{260} = Absorbância em densidade óptica em 260 nm

40 = fator de conversão (1 unidade de densidade óptica ≈ 40 µg/ml RNA)

70 = fator de diluição

Para verificar a integridade do RNA, amostra de 1 µL do RNA total foi diluída em 8 µL de água ultrapura e 1 µL de corante (Orange G, Acros Organics, New Jersey, USA), aplicadas em gel de agarose 1% (0,3 g agarose, 30 mL de TAE Buffer 1x, 3 µL de brometo de etídio) e submetida a uma voltagem de 80 mV (Power Pac Basic™ Bio-Rad, Hercules, CA, USA) por 20 minutos. A integridade do RNA foi constatada pela visualização das bandas de RNA ribossômico, 28S e

18S, e ausência de rastros do RNA no gel. As amostras que se mostraram íntegras foram utilizadas como substrato para a transcrição reversa.

2.7.2 Transcrição reversa do RNA (RT)

Transcrição reversa é um processo que converte as moléculas do RNA em ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA). As amostras do RNA do tecido cardíaco foram submetidas à transcrição reversa pela ação da enzima *transcriptase reversa*, utilizando-se o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, CA, USA). Foi adicionado, a cada microlitro de amostra, 10X RT Buffer, 25X dNTP Mix, 10X RT Random Primers, MultiScribe™ Reverse Transcriptase e água nuclease-free em quantidades recomendadas pelo fabricante.

As amostras foram colocadas em termociclador (Mastercycler® Gradient, Eppendorf, Hamburg, Germany) com ciclos programados de 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C, 5 minutos a 85°C e a seguir mantidas a 4°C até retirada do material do termociclador. Ao final, foram adicionados 180 µL de água ultrapura a cada amostra para completar um volume total de 200 µL em cada tubo. O produto da transcrição reversa (cDNA) foi armazenado em freezer numa temperatura de -20°C.

Para avaliar a qualidade da transcrição reversa, foram empregados dois controles: 1) Utilização de uma amostra aleatória a qual foi adicionado todos os componentes do kit, exceto a Transcriptase Reversa e 2) Substituição da amostra por volume igual de água ultrapura.

O PCR em tempo real foi realizado com ensaios prontos contendo sonda TaqMan MGB-FAM (TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems, CA, USA) e primers específicos (TaqMan Gene Expression Assay GEx, Applied Biosystems, CA, USA).

A identificação dos ensaios utilizados para PCR em Tempo Real encontra-se descrita no quadro abaixo:

Gene	Ensaio
Atp2a2 (Serca2a)	Rn00568762_m1
Pln (fosfolambam)	Rn01434045_m1
Ryr2 (receptor rianodínico)	Rn01470303_m1
Ppia (ciclofilina)	Rn00690933_m1

O sistema TaqMan utiliza uma sonda fluorescente que permite a detecção de um produto específico da PCR conforme seu acúmulo durante os ciclos da reação. A sonda é constituída por um corante *reporter* fluorescente na extremidade 5' e um corante *quencher* (silenciador) na extremidade 3'. Enquanto a sonda está intacta, a proximidade do *quencher* reduz bastante a fluorescência emitida pelo corante *reporter* através da transferência de energia por ressonância de fluorescência. A sonda se anela à seqüência antes dos primers e é clivada por meio da atividade da nuclease 5' da Taq DNA polimerase enquanto o *primer* é estendido. A clivagem da sonda separa o corante *reporter* do corante *quencher*, aumentando o sinal da fluorescência emitida pelo corante *reporter*. A fluorescência foi monitorada em tempo real com um aparelho StepOne Plus (Applied Biosystems, CA, USA).

Todas as amostras foram amplificadas em triplicatas. As amostras foram normalizadas pelo controle interno *Ciclofilina* e a quantificação da expressão realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$. O modelo de cálculo referente a quantificação relativa do cDNA para PCR em tempo real foi desenvolvida pela Perkin-Elmer Applied Biosystem e denominada de método delta-delta e foi utilizada no presente trabalho.²⁴

2.8 Determinação das proteínas do trânsito de cálcio - Western Blot

A expressão das proteínas Serca2a e fosfolambam foram realizadas pela técnica Western Blot seguindo as seguintes etapas: extração tecidual de proteínas, eletroforese em gel, transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose, identificação das proteínas por anticorpos específicos e quantificação das bandas por densitometria. A expressão dos peptídeos foi

normalizada pela expressão da proteína constitucional glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).

2.8.1 Extração das proteínas miocárdicas

Inicialmente, fragmentos amostrais (80-100 mg) foram homogeneizados com 1,5 ml de tampão de extração contendo NaCl 100 mM, Triton X-100 1% (v/v), deoxicolato de sódio 0,5% (w/v), SDS 0,1 % (w/v), glicerol 10% (v/v), Tris 10 mM (ph 7,4), EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, ortovanadato de sódio 1 mM, NaF 10 mM e inibidores de proteases (P2714, Sigma- Aldrich). A seguir, o homogenato foi centrifugado por 20 minutos, a 12000 rpm a 4° C, para eliminação de material insolúvel. O sobrenadante foi coletado e separado em alíquotas, que foram armazenadas a -80° C. A concentração de proteína total foi analisada pelo método de Bradford utilizando a curva de BSA Protein Standard como padrão.²⁵

2.8.2 Eletroforese em gel

Após a quantificação da concentração proteica, as amostras cardíacas foram diluídas em tampão Laemmli (Tris - HCL240mM, SDS, 0,8%, glicerol 40%, azul de bromofenol 0,02% e β -mercaptoetanol 200mM) e separadas por eletroforese utilizando sistema Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio - Rad, Hercules, CA, USA). A corrida eletroforética foi realizada em gel bifásico, de empilhamento (Tris - HCL 240mM pH 6,7, poliacrilamida 40%, APS e Temed) e de resolução (Tris - HCL 240mM pH 8,9, poliacrilamida 40%, glicerol, APS e Temed) a 4° C com 50 μ g de proteína total. A concentração do gel de empilhamento utilizada foi de 5% e a concentração do gel de resolução, determinada de acordo com o peso molecular da proteína analisada, foi de 15% para a fosfolambam e 10% para a Serca2a. No primeiro poço do gel foi aplicado um padrão de peso molecular, Kaleidoscope Prestained Standards (Bio - Rad, Hercules, CA, USA). A corrida eletroforética foi efetuada a 30 min a 50 V e 2,5 horas a 120 V (Power

Pac HC 3.0A, Bio - Rad, Hercules, CA, USA) com tampão de corrida (Tris 0,25M, glicina 192 mM e SDS 1%).

2.8.3 Transferência e identificação das proteínas

Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema Mini - Trans Blot (Bio - Rad, Hercules, CA, USA) utilizando-se tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,1%). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação com solução de 5% de leite em pó desnatado, dissolvido em solução basal pH 8,0 (Tris 1M pH 8,0, NaCl 5M e detergente Tween 20) por 120 minutos à temperatura ambiente sob constante agitação. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo primário diluído na solução basal, em agitação constante por 12 horas. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada três vezes em solução basal pH 8,0 e incubada com o anticorpo secundário diluído em solução basal por 1,5 horas em agitação constante. Para remover o excesso de anticorpo secundário, a membrana foi lavada três vezes em solução basal pH 8,0. Por fim, a imunodeteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, USA). As membranas de nitrocelulose foram analisadas no analisador de imagens Carestream Molecular Imaging (Carestream Health, Inc, USA) nos tempos padronizados para cada proteína estudada. Após essa etapa, foram realizados procedimentos para a determinação do GAPDH. As mesmas membranas foram lavadas em solução Stripping por 15 minutos em agitação constante, e então, reiniciado o processo de bloqueio, incubação dos anticorpos para o GAPDH e imunodeteção da mesma forma descrita anteriormente. As análises quantitativas dos blots foram realizadas por programa analisador de imagens.

2.8.4 Anticorpos primários

Os anticorpos primários utilizados no estudo foram:

- Serca2a ATPase rabbit polyclonal IgG (abcam, ab3625). Diluição utilizada 1:1000.
- Fosfolambam mouse monoclonal IgG (Thermo Scientific, MA3-922). Diluição utilizada de 1:500.
- Fosfolambam fosforilada na serina 16 rabbit polyclonal IgG (Badrilla, A0112). Diluição utilizada de 1:5000.
- GAPDH, mouse monoclonal IgG1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 32233). Diluição utilizada 1:10000.

2.8.5 Anticorpos secundários

Os anticorpos primários utilizados no estudo foram:

- Goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 2005).
- Goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 2004).

2.9 Métodos estatísticos

As variáveis contínuas foram expressas pelas médias e seus respectivos desvios padrão. As variáveis de distribuição não normal foram representadas pelas medianas e seus intervalos interquartílicos.

As análises entre os grupos Sham (cirurgia simulada) e experimentais (com IAo), em todos os momentos do estudo, foram efetuadas pela ANOVA de dois fatores. Quando necessário, os dados foram normalizados para realização desta análise. Para esta análise estatística foram considerados o fator 1 como sendo a presença de IAo e fator 2 como sendo o tempo (1,4,8 e 12 semanas). O teste mostra 3 valores de p que correspondem à interação entre

fator 1 e fator 2; diferenças apenas em relação ao fator 1, independentemente do fator 2; e diferenças apenas em relação ao fator 2, independentemente do fator 1. Quando existe interação entre fator 1 e 2, foi realizado o pós teste de Holm Sidak que mostra as diferenças das múltiplas comparações. Quando há diferença no fator 1, neste caso a presença de IAo e na ausência de interação, o teste apenas mostra que todos os animais do grupo IAo, independentemente da semanas de estudo, são diferentes do grupo Sham. Quando há diferença no fator 2, neste caso o tempo e na ausência de interação, o teste mostra que, independentemente de ser do grupo sham ou IAo, a diferença está em algum momento do tempo de IAo. Quando foram observadas diferenças no fator 1 - presença de IAo, na ausência de interação - ou quando os dados não foram passíveis de normalização, as variáveis foram comparadas grupo a grupo com testes t (Sham1XIAo1); (Sham4XIAo4); (Sham8XIAo8);(Sham12XIAo12). Os tempos do grupo Sham e tempos do grupo IAo foram comparados separadamente por Anova de 1 via, complementados por Tukey. Assim, foram 6 comparações diferentes. Por isso, por meio da correção por Bonferroni, o valor de p significativo foi considerado quando, após multiplicação por 6, permanecia abaixo de 0,05.

As associações entre variáveis com distribuição não normal foram avaliadas pelo teste de correlação de Spearman e entre as variáveis de distribuição normal foram analisadas pelo teste de correlação de Pearson.

Foi adotado o nível de significância $p < 0,05$.

3. Resultados

As variáveis morfométricas, de pressão ventricular, de hipertrofia, fibrose e atividade colagenolítica dos grupos Sham e IAo estão mostradas na Tabela 1. O valor de p para o momento da diferença entre os grupos, que não apareceu na Anova de duas vias, encontra-se na tabela 2.

Foram observados, em ambos os grupos, aumento do peso corporal ao longo das semanas. Houve diferença entre os grupos na semana 8, quando o peso do grupo IAo foi maior que o sham. (Figura 1).

Observou-se que o peso do VE no grupo IAo foi maior em relação ao Sham (Figura 2), já na primeira semana (tabela 2) e, com a evolução do tempo, houve aumento significativo do peso do VE em ambos os grupos.

A pressão sistólica máxima alcançada pelo VE não foi diferente ao longo do tempo e entre os grupos IAo e Sham. Já pressão diastólica do VE foi maior no grupo IAo, por uma diferença que ocorreu na primeira semana (tabela 2).

A área do miócito foi maior no grupo IAo em comparação ao grupo Sham, a partir da oitava semana (tabela 2). Adicionalmente, aumentou com o tempo, nos dois grupos (Figura 3). A figura 4 ilustra cortes histológicos da área do miócito corados com Hematoxilina-Eosina.

Em relação à MMP2, observou-se maior atividade no grupo IAo na quarta semana, em comparação com grupo sham (Figura 5 e tabela 2). A figura 6 ilustra a atividade da MMP2 no gel de poliacrilamida.

O TIMP-1 aumentou com o tempo e foi maior no grupo IAo, na quarta semana quando comparado com a quarta semana do sham (Figura 7 e tabela 2).

A fração de colágeno foi maior no grupo IAo em relação ao grupo Sham, a partir da quarta semana. (Figura 8 e tabela 2). A figura 9 mostra a fração de colágeno em cortes histológicos de 6 micras corados pelo Picro Sirius red.

As variáveis ecocardiográficas, analisadas no presente estudo, são apresentadas na tabela 3. O valor de p para variáveis ecocardiográficas mostrando o momento da diferença entre os grupos, que não apareceu na Anova de duas vias, encontra-se na tabela 4.

Foi detectado aumento do DDVE no grupo IAo comparado ao Sham, a partir da oitava semana (Figura 10 e tabela 4).

Houve hipertrofia da parede posterior (PP) do VE no grupo IAo com interação entre os fatores grupo e tempo de evolução (Figura 11). Dentro do grupo IAo, nas semanas 8 e 12, a PP foi maior do que com 1 semana. Nas mesmas semanas, 8 e 12, a PP dos animais com IAo foi maior que do grupo sham nas mesmas semanas, respectivamente (tabela 3).

A relação 2PP/DDVE não foi diferente entre os dois grupos submetidos ao procedimento (tabela 3).

O grupo IAo apresentou maior diâmetro do átrio esquerdo em relação ao Sham nas quarta e décima segunda semanas (Figura 12 e tabela 4).

O grupo IAo apresentou maior índice de massa de VE a partir da quarta semana (tabela 3).

A função diastólica, mensurada pelas relações E/A e E/E', não foi diferente entre os grupos. A análise por Anova mostrou que não houve alterações de E/E' em relação ao grupo e tempo.

A avaliação da função sistólica com doppler tissular pela variável S'mitral, não mostrou diferença entre os grupos. No entanto, a variável porcentagem de encurtamento foi menor no grupo IAo quando comparado ao grupo Sham, na décima segunda semana (Figura 13 e tabela 4). Adicionalmente, houve influência do tempo de acompanhamento em ambos os grupos, sendo que nas semanas 8 e 12 a fração de encurtamento dos dois grupos foi menor que com 4 semanas. O débito cardíaco foi maior no grupo IAo em relação Sham e houve aumento com o tempo de evolução nos dois grupos (Figura 14).

A remodelação da geometria do VE foi mensurada pelo índice de esfericidade, através do ecocardiograma. O índice de esfericidade foi maior no grupo IAo quando comparado com o grupo Sham (Figura 15), nos momentos 1, 8 e 12 semanas (tabela 3). Além disto, houve aumento com o tempo de observação no grupo IAo, de forma que 8 e 12 semanas foram diferentes de 4 semanas e 12 semanas foi diferente de 1 semana. Observou-se associação negativa entre o índice de esfericidade e fração de encurtamento no grupo IAo ($r=-0,477$; $p=0,002$) e associação ausente no grupo Sham (Figura 16).

Na tabela 5 estão representadas as expressões relativas dos RNAm da Serca2a, Ryr e fosfolambam. Não foram detectadas diferenças destas variáveis entre os grupos IAo e Sham. Houve somente diferenças em decorrência do tempo de evolução.

Foram observadas correlações significantes entre as expressões dos RNAm Serca2a e fosfolambam no grupo IAo (tabela 6) e entre Serca2a e fosfolambam e entre Ryr e fosfolambam no grupo Sham. Houve correlação entre o tempo e Serca2a no grupo IAo ($r=0,591$; $p=0,032$). No grupo Sham, houve correlação entre Serca2a e tempo ($r=0,592$; $p=0,047$), entre Ryr e tempo ($r=0,676$; $p=0,014$) e entre fosfolambam e tempo ($r=0,612$; $p=0,034$).

Nas análises de Western Blot, verificamos que não houve diferença entre os grupos na quantificação da proteína Serca2a (Serca2a/GAPDH normalizados; Figura 17). Além disso, as comparações entre os grupos, na mesma semana, não se alteraram (tabela 7). Por outro lado, com relação às análises da proteína fosfolambam, apesar de não haver interação entre os grupos para a variável Fosfolambam Fosforilada/Fosfolambam total, o grupo IAo foi diferente do grupo controle, visto que essa variável foi maior no grupo Sham, independente do tempo (Figura 18). As comparações múltiplas não identificaram qual o momento que esta diferença ocorreu (tabela 7).

A Figura 19 resume os momentos nos quais foram detectadas alterações morfofuncionais, celulares e intersticiais.

Tabela 1. Variáveis morfométricas, pressão arterial, atividade colagenolítica dos grupos de ratos com insuficiência aórtica (IAo) e controles (Sham), estudados 1, 4, 8 e 12 semanas após a cirurgia.

Grupo	Tempo (semanas)	Peso(g)	VE (g)	VE/PC	PS (mmHg)	PD (mmHg)	Área Miócito (μ^2)	MMP2 Ativa/Inativa	TIMP-1	Fração de Colágeno (%)
IAo	1	333±14,0	0,77±0,06**	2,31±0,17	130±18,0	8,10±2,80**	285±13,0	11,2±1,41	10,7±4,93	3,10±0,50
	4	365±14,0	0,90±0,14§	2,47±0,41	100±28,0	4,80±5,40	320±18,0	13,7±1,33§	21,7±8,30§	3,52±0,48§
	8	433±44,0	1,09±0,39	2,31±0,33	113±30,0	5,80±3,40	321±20,0&	12,8±1,20	19,9±8,90	3,86±0,64&
	12	454±35,0	1,09±0,15@	2,40±0,24	96,0±13,0	5,01±3,00	320±28,0@	10,3±1,26	20,8±6,87	3,46±0,70@
Sham	1	333±14,0	0,68±0,02	2,04±0,13	111±10,0	4,00±2,00	267±21,0	9,54±1,41	8,10±2,61	2,49±0,38
	4	380±22,0	0,72±0,04	1,90±0,12	124±25,0	4,50±1,14	303±9,10	9,75±1,41	11,4±4,01	2,61±0,48
	8	396±39,0&	0,82±0,30	2,04±0,57	115±17,0	4,40±2,10	276±17,0	9,52±1,51	14,6±8,19	2,72±0,42
	12	470±35,0	0,88±0,06	1,88±0,13	97,0±8,50	3,90±1,70	273±20,0	14,2±1,51	10,6±3,91	2,31±0,17
Anova	Grupo	ns	P<0,001	ns	ns	P=0,037	P<0,001	ns	<0,001	P<0,001
Duas	Tempo	P<0,001	P=0,01	ns	ns	ns	P<0,001	ns	0,015	ns
Vias	Grupo*Tempo	P=0,037	ns	ns	ns	ns	ns	0,026	ns	ns

VE – peso do ventrículo esquerdo; VE/PC – razão peso do ventrículo esquerdo e peso corporal; PAS – pressão sistólica; PD – pressão diastólica; MMP2 Ativa/Inativa - atividade da metaloprotease 2 (razão das bandas ativas/inativas). Análise estatística efetuada pela Anova de duas vias, considerando-se os fatores grupo IAo e Sham) e Tempo (1, 4, 8 e 12 semanas após o procedimento cirúrgico. ns - não significante. Nível de significância $p < 0,05$. Dados apresentados em média±desvio padrão.

*: diferentes de 1 semana com IAo

&: diferentes de 8 semanas Sham

@: diferentes de 12 semanas Sham

#: diferente de 4 semanas com IAo

** : diferente de 1 semana Sham.

§: diferente 4 semanas Sham

Tabela 2. Apresentação do valor de p corrigido por Bonferroni para comparação entre os grupos Sham e IAO nas semanas 1, 4, 8 e 12, quando houve diferença entre os grupos, mas não houve interação entre os fatores.

Variável	1 semana	4 semanas	8 semanas	12 semanas
VE (g)	p=0,006	p=0,012	p=0,09	p=0,012
PD (mmHg)	p=0,048	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Área do Miócito (μ^2)	p>0,05	p>0,05	p=0,0012	p=0,006
mmp ativa/ inativa	p>0,05	p=0,03	p>0,05	p>0,05
TIMP-1	p>0,05	p=0,036	p>0,05	p>0,05
Fração de Colágeno (%)	p>0,05	p=0,0078	p=0,0014	p=0,012

VE – peso do ventrículo esquerdo; PD – pressão diastólica; mmp 2 Ativa/Inativa - atividade da metaloprotease 2 (razão das bandas ativas/inativa)

Tabela 3. Médias e desvios padrão de variáveis ecocardiográficas dos grupos de ratos com insuficiência aórtica (IAo) e controles (Sham), estudados 1, 4, 8 e 12 semanas após a cirurgia.

Grupo	Tempo (sem)	DDVE (mm)	PP (mm)	2PP/DDVE	AE (mm)	iMVE	E/A	S' Mitral (cm/s)	E/E' Mitral	IE	E (%)	DC (ml/m)
IAo	1	7,70±0,34	1,30±0,25	0,17±0,04	4,69±0,51	82,5±8,72	1,55±0,43	5,12±0,83	0,23±0,07	0,71±0,05**	50,0±6,00	135±48,0
	4	8,34±1,12	1,51±0,26	0,18±0,04	5,05±0,74 [§]	116±7,80* [#]	1,35±0,52	5,20±1,03	0,34±0,12	0,65±0,09	52,0±1,0	117±65,0
	8	8,77±1,16 ^{&}	1,78±0,20* ^{&}	0,22±0,08	5,18±1,41	123±7,40* ^{&}	1,28±0,42	5,54±0,93	0,38±0,08	0,78±0,10* ^{&}	38,0±7,00	157±37,0
	12	8,60±1,02 [@]	1,69±0,26* [@]	0,20±0,03	5,45±0,73 [@]	113±7,43* [@]	1,53±0,17	5,52±1,15	0,31±0,08	0,81±0,06* ^{#@}	39,0±6,00 [@]	158±36,0
Sham	1	7,14±0,66	1,34±0,12	0,19±0,002	4,21±0,76	85,5±8,72	1,50±0,41	5,37±1,68	0,31±0,10	0,61±0,07	51,0±9,00	90,0±12,0
	4	7,06±0,52	1,37±0,10	0,19±0,03	3,81±0,39	76,1±8,72	1,80±0,17	5,00±0,53	0,29±0,04	0,62±0,05	54,0±6,00	84,0±29,0
	8	7,11±1,24	1,34±0,13	0,19±0,04	4,24±0,35	69,5±9,32	1,56±0,23	5,37±0,74	0,31±0,07	0,65±0,10	56,0±12,0	93,0±27,0
	12	7,59±0,23	1,41±0,15	0,18±0,02	3,98±0,67	83,4±8,72	1,27±0,46	5,50±0,83	0,28±0,08	0,59±0,10	54,0±10,0	121±40,0
Anova	Grupo	P<0,001	P<0,001	ns	P<0,001	P<0,001	ns	ns	ns	P<0,001	P=0,001	P<0,001
Duas	Tempo	ns	P=0,015	ns	ns	ns	ns	ns	P=0,05	P=0,01	P=0,002	P=0,031
Vias	Grupo*Tempo	ns	P=0,008	ns	ns	0,013	ns	ns	ns	P=0,003	ns	ns

DDVE – diâmetro do ventrículo esquerdo no final da diástole; PP – espessura da parede posterior; 2PP/VEd – relação parede posterior e diâmetro do VE; AE – diâmetro do átrio esquerdo; iMVE – índice de massa do ventrículo esquerdo; E/A – razão fluxo transmitral precoce e tardio; S' Mitral – velocidade máxima do anel mitral, durante a sístole, obtido pelo doppler tecidual; E/E' Mitral - relação entre o fluxo transmitral precoce e velocidade de deslocamento do anel mitral durante a diástole; IE. – índice de esfericidade dado pela relação entre o diâmetro maior e menor do ventrículo esquerdo, durante a diástole, %E – porcentagem de encurtamento do VE; DC – débito cardíaco. Análise estatística efetuada pela Anova de duas vias, considerando-se os fatores grupo IAo e Sham) e Tempo (1, 4, 8 e 12 semanas após o procedimento cirúrgico). ns – não significante. Nível de significância p<0,05.

*: diferentes de 1 semana com IAo

&: diferentes de 8 semanas Sham

@: diferentes de 12 semanas Sham

#: diferente de 4 semanas com IAo

** : diferente de 1 semana Sham.

Tabela 4. Apresentação do valor de p corrigido por Bonferroni para comparação entre os grupos Sham e IAo nas semanas 1, 4, 8 e 12.

Variável	1 semana	4 semanas	8 semanas	12 semanas
AE	p>0,05	p=0,004	p>0,05	p=0,003
DDVE	p>0,05	p>0,05	p=0,004	p=0,05
E %	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p=0,006

AE – diâmetro do átrio esquerdo; DDVE – diâmetro do ventrículo esquerdo no final da diástole; E % - porcentagem de encurtamento

Tabela 5. Médias e desvios padrão das expressões relativas do RNAm do tecido cardíaco dos grupos de ratos com insuficiência aórtica (IAo) e controles (Sham), estudados 1, 4, 8 e 12 semanas após a cirurgia.

Grupo	Tempo (sem)	Serca2a	Ryr	Fosfolambam
IAo	1	0,81±0,28	1,12±0,38	0,86±0,36
	4	1,18±0,54	1,27±0,67	0,87±0,49
	8	1,15±0,21	0,92±0,21	1,03±0,29
	12	1,73±0,78	1,24±0,32	1,35±0,39
Sham	1	0,91±0,11	0,86±0,19	0,88±0,19
	4	1,68±0,93	1,49±0,54	1,09±0,50
	8	0,92±0,36	1,49±0,54	0,95±0,30
	12	1,45±0,42	1,91±0,55	1,48±0,39
Anova	Grupo	ns	ns	ns
Duas	Tempo	P=0,003	P=0,012	P=0,004
Vias	Grupo*Tempo	ns	ns	ns

Ryr: canal rianodínico. Análise estatística efetuada pela Anova de duas vias, considerando-se os fatores grupo IAo e Sham) e Tempo (1, 4, 8 e 12 semanas) após o procedimento cirúrgico. ns – não significante.

Nível de significância p<0,05.

Tabela 6. Correlação entre RNAm da Serca, canais rianodínicos e fosfolambam no grupo IAo e Sham

	Correlação	R	P
IAO	Serca2a / Ryr	0,45	0,09
	Serca2a/Fosf	0,70	0,0005
	Fosf/Ryr	0,38	0,23
Sham	Serca2a / Ryr	0,51	0,06
	Serca2a/Fosf	0,59	0,01
	Fosf/Ryr	0,53	0,04

Ryr: canal rianodínico; Fosf: fosfolambam

Tabela 7. Medianas e intervalos interquartilicos da quantificação das proteínas reguladoras do trânsito de cálcio do tecido cardíaco normalizadas dos grupos de ratos com insuficiência aórtica (IAo) e controles (Sham), estudados 1, 4, 8 e 12 semanas após a cirurgia

Grupo	Tempo (sem)	Serca2a/GAPDH normalizados	Fosf fosforilada/fosf total normalizadas
IAo	1	1,60 (0,88;5,09)	1,14 (0,28;1,85)
	4	0,69 (0,4;1,1)	0,07 (0,02;0,3)
	8	0,81±0,49	0,03 (0,02;0,04)
	12	2,4 (1,26;6,79) ^{##*}	1,00 (0,38;1,76)
Sham	1	1,32 (0,35;5,83)	4,11 (0,99;6,73)
	4	0,98 (0,45;1,1)	0,66(0,42;1,13)
	8	0,85±0,44	0,04 (0,02;0,14)
	12	5,67 (1,65;9,6) ^{& α}	0,87 (0,65;1,32)
Anova	Grupo	-	P= 0,012
Duas	Tempo	-	P= <0,001
Vias	Grupo*Tempo	-	P= 0,146

Fosf: fosfolambam; GAPH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

- *: diferentes de 1 semana com IAo
- &: diferentes de 8 semanas Sham
- #: diferente de 4 semanas com IAo
- ": diferente de 8 semanas IAo
- α: diferente de 4 semanas sham

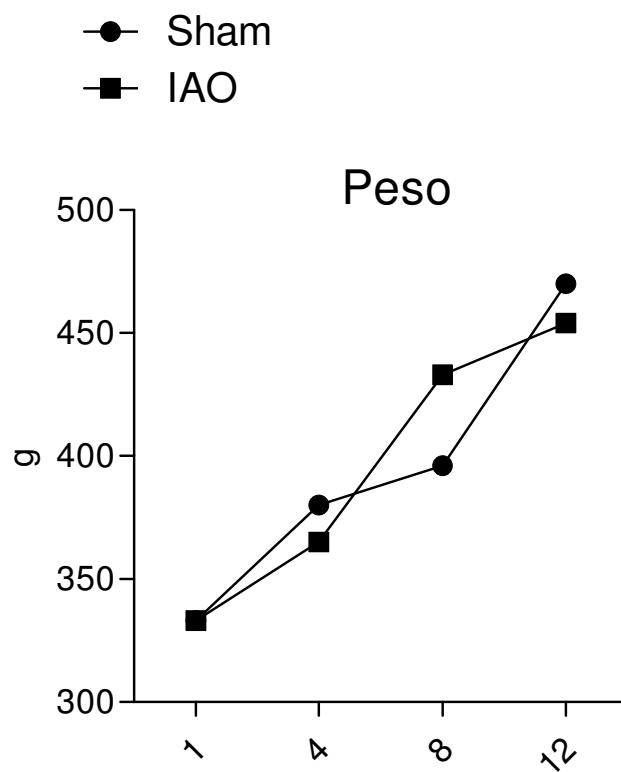


Figura 1. Média do peso corporal dos ratos com Insuficiência aórtica (IAo) e Controles (Sham), observados em 1, 4, 8 e 12 semanas.

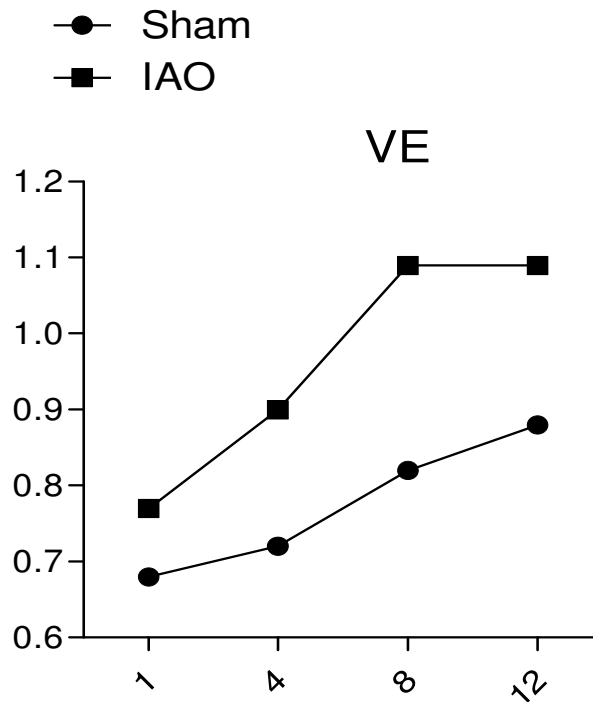


Figura 2. Evolução do peso do ventrículo esquerdo (VE) nos grupos IAo e Sham durante 1 a 12 semanas de evolução

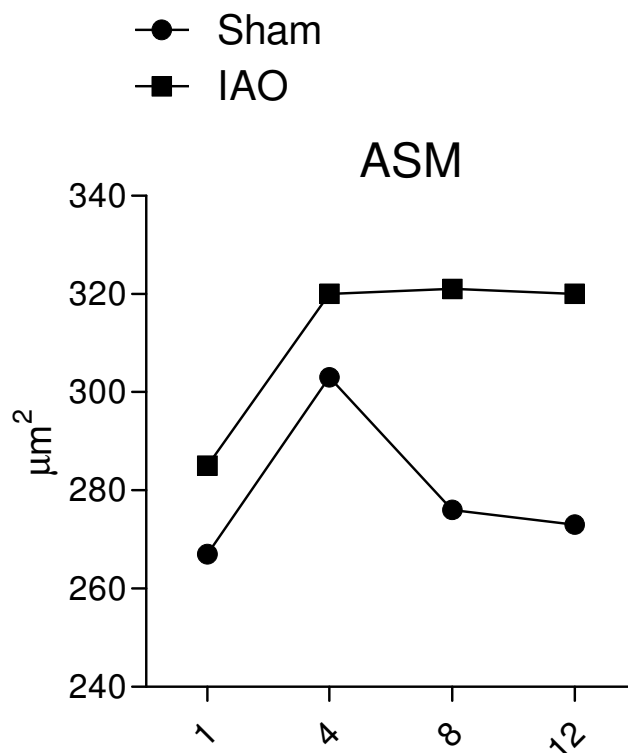


Figura 3. Média da área seccional do miócito (ASM) nos grupos IAo e Sham observados em 1, 4, 8 e 12 semanas após a indução de insuficiência aórtica e cirurgia simulada.

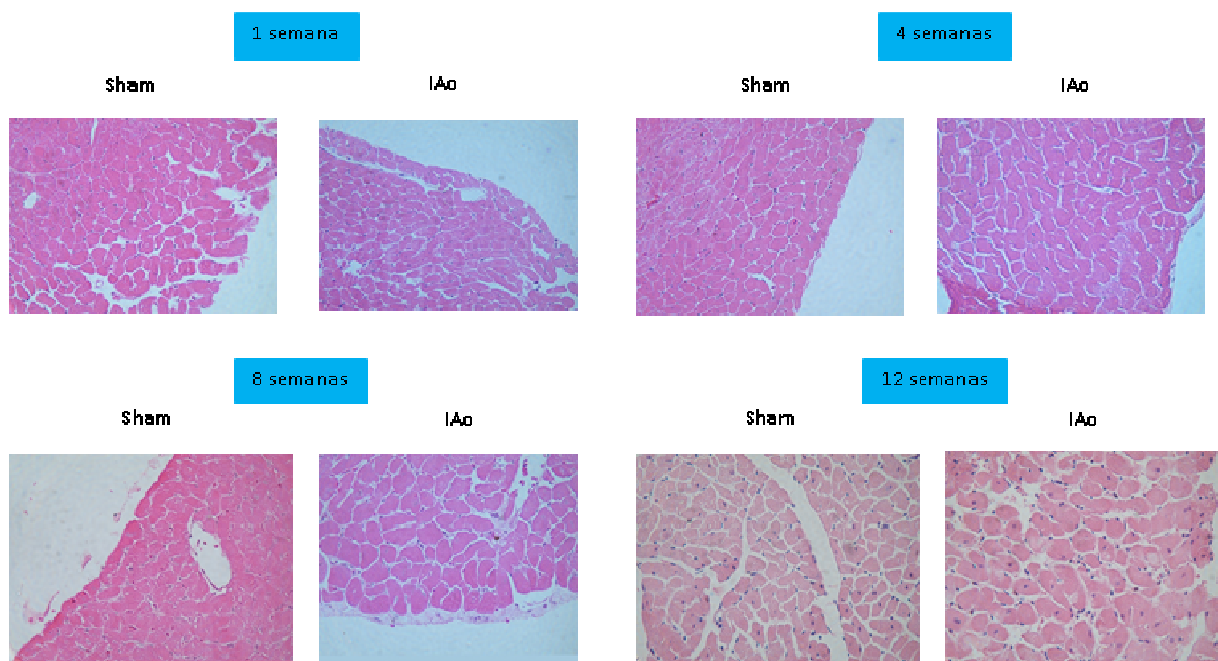


Figura 4. Área do miócito em cortes histológicos de 4 micras corados com Hematoxilina-Eosina nos grupos IAo e Sham.

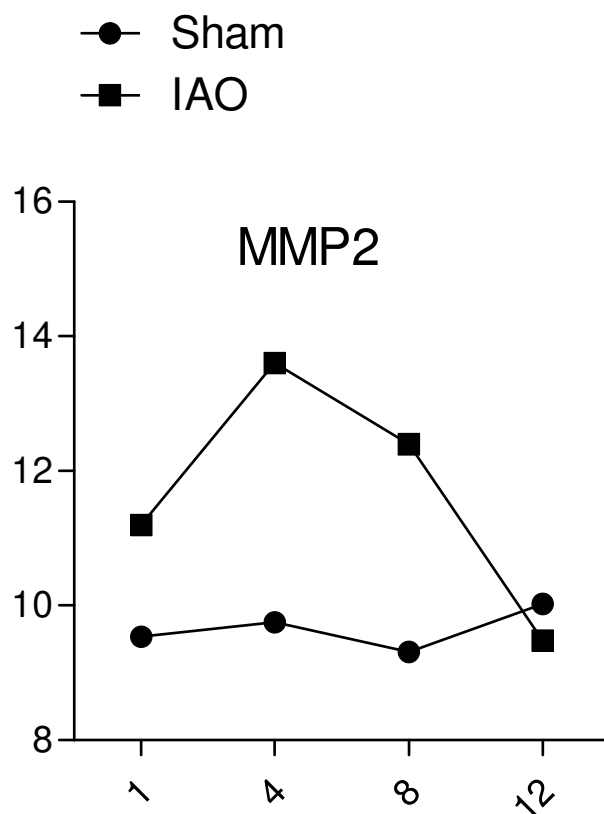


Figura 5. Média da atividade de metaloprotease 2 (MMP2) nos grupos IAo e Sham observados em 1, 4, 8 e 12 semanas após a indução de insuficiência aórtica e cirurgia simulada.

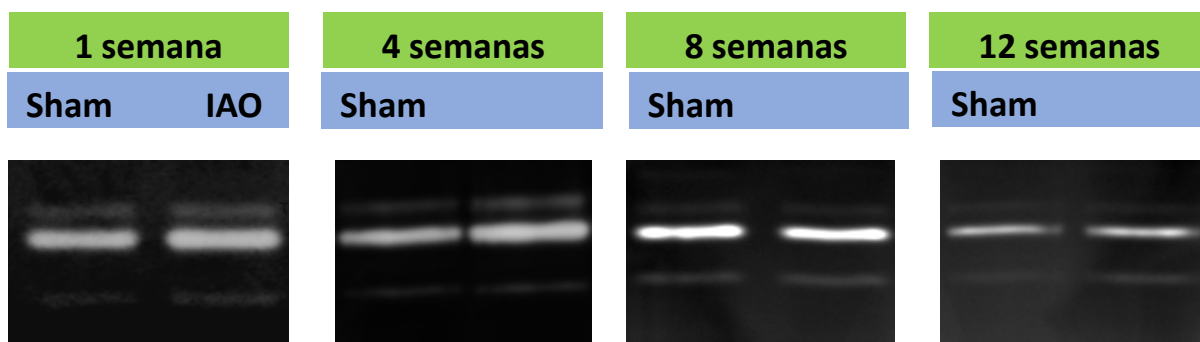


Figura 6. Atividade de metaloprotease 2 em gel de poliacrilamida nos grupos IAo e Sham.

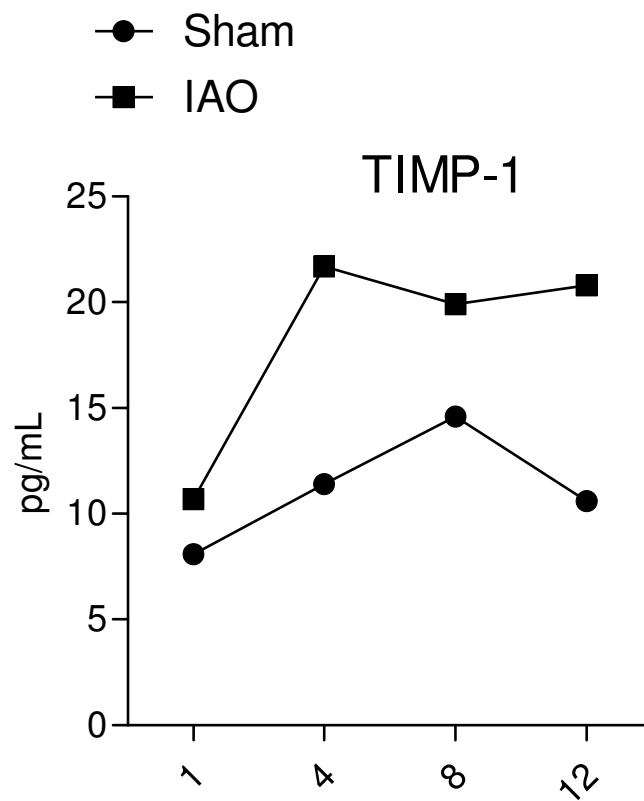


Figura 7. Média da atividade do TIMP 1 nos grupos IAo e Sham observados em 1, 4, 8 e 12 semanas após a indução de insuficiência aórtica e cirurgia simulada.

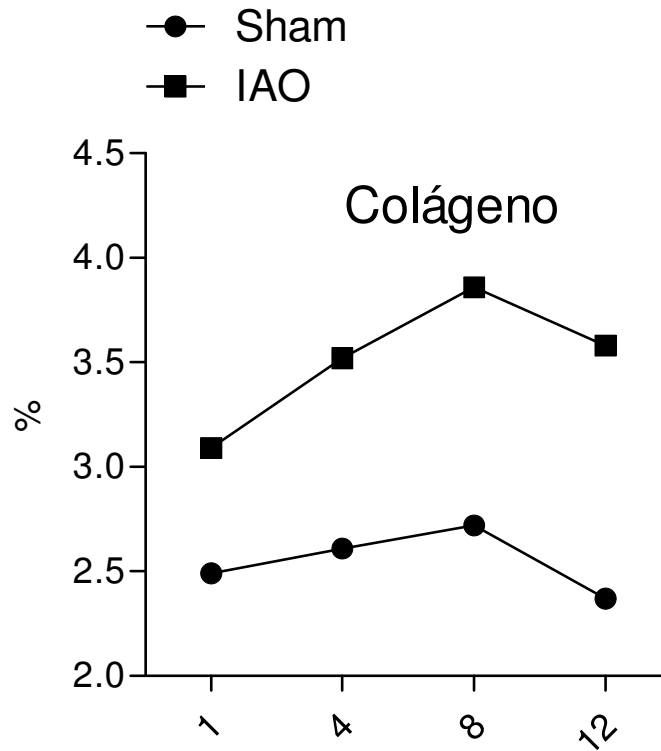


Figura 8. Média da porcentagem de colágeno nos grupos IAo e Sham observados em 1, 4, 8 e 12 semanas após a indução de insuficiência aórtica e cirurgia simulada.

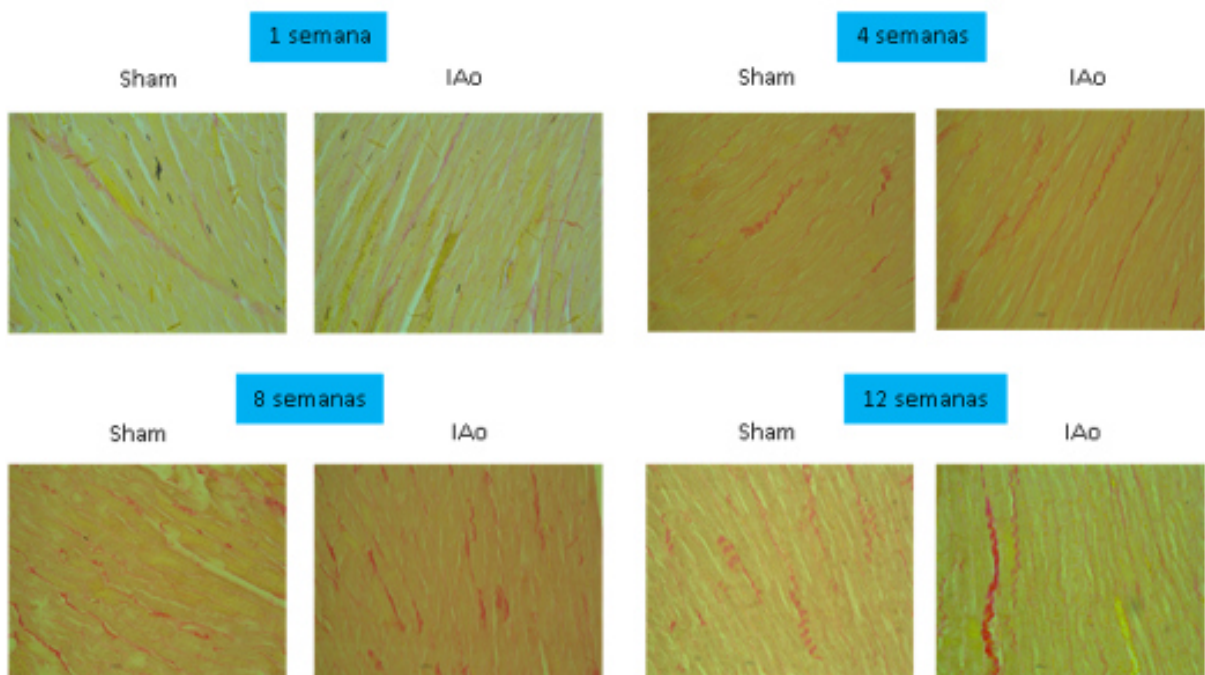


Figura 9. Fração de colágeno em cortes histológicos de 6 micras corados pelo Picro Sirius red nos grupos IAo e Sham.

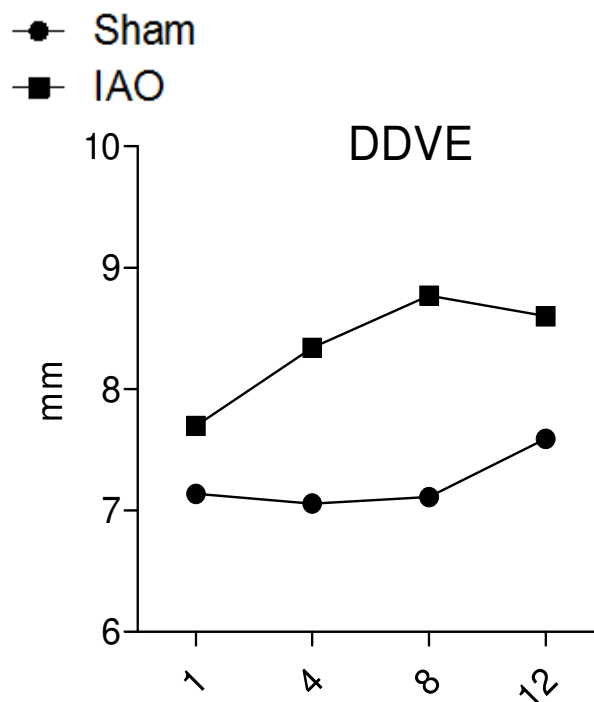


Figura 10. Média do diâmetro do ventrículo esquerdo no final da diástole (DDVE) nos grupos IAO e Sham observados em 1, 4, 8 e 12 semanas após a indução de insuficiência aórtica e cirurgia simulada.

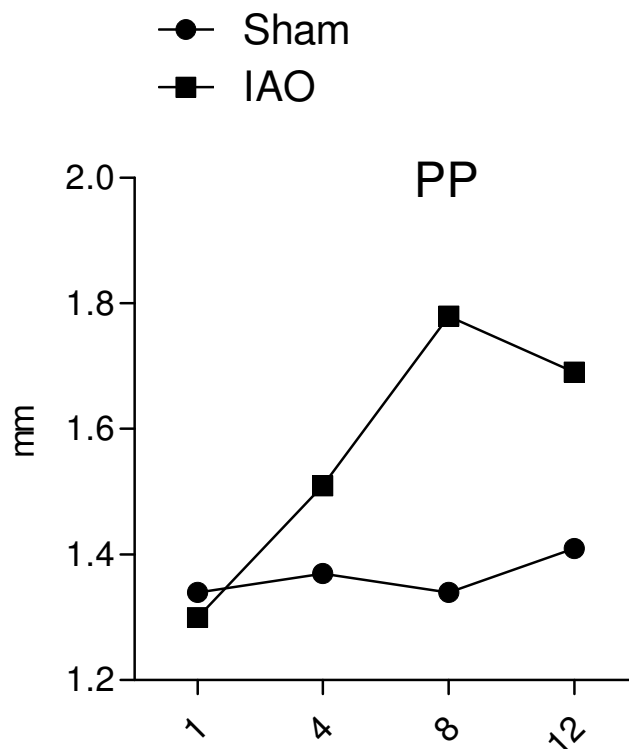


Figura 11. Média da medida da espessura da parede posterior (PP) do VE nos grupos IAO e Sham observados em 1, 4, 8 e 12 semanas após a indução de Insuficiência aórtica e cirurgia simulada

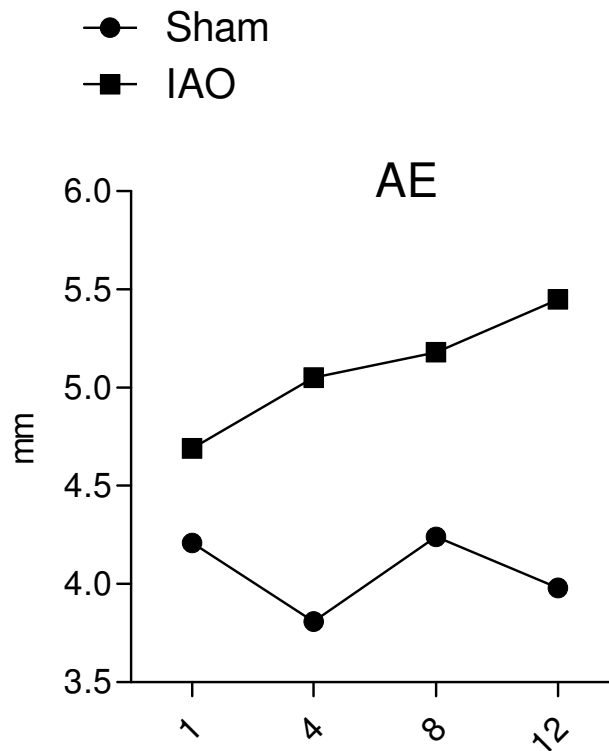


Figura 12. Evolução do diâmetro do átrio esquerdo (AE) nos grupos IAo e Sham durante 1 a 12 semanas de evolução.

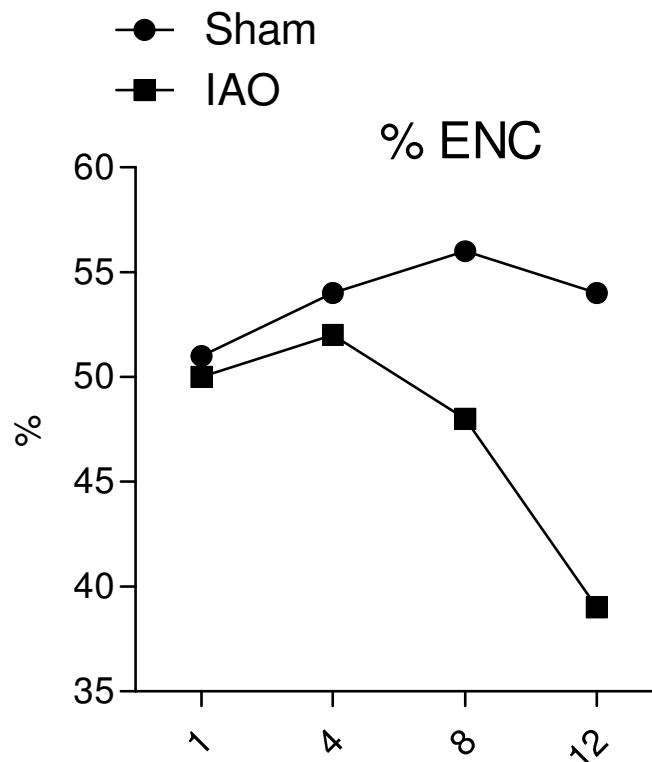


Figura 13. Média da Porcentagem de Encurtamento (% ENC) nos grupos IAo e Sham observados em 1, 4, 8 e 12 semanas após a indução de Insuficiência aortica e cirurgia simulada.

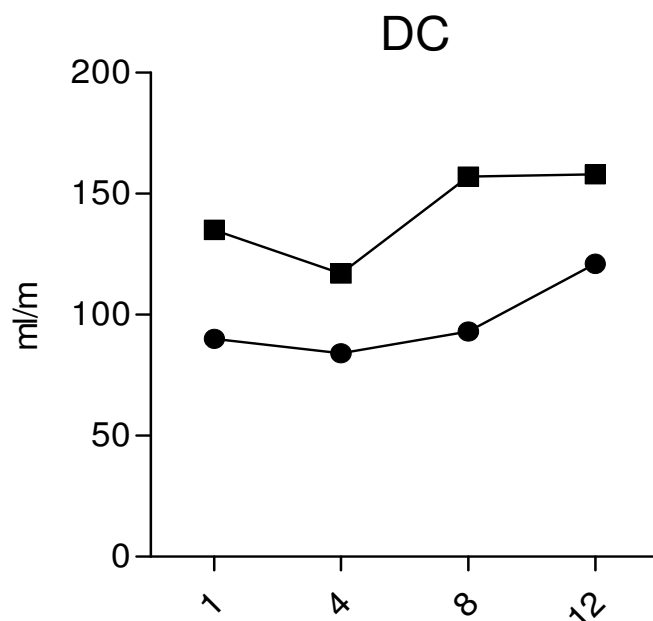


Figura 14. Média do débito cardíaco (DC) nos grupos IAo e Sham observados em 1, 4, 8 e 12 semanas após a indução de Insuficiência aórtica e cirurgia simulada.

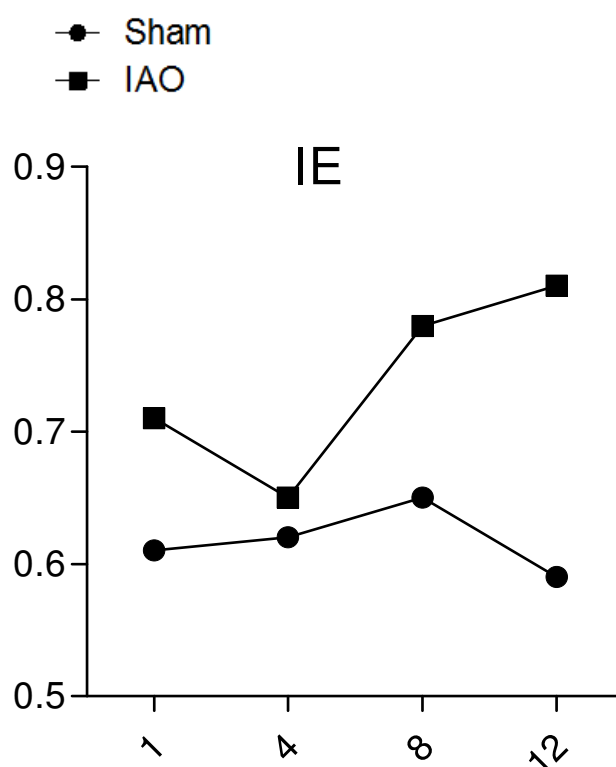
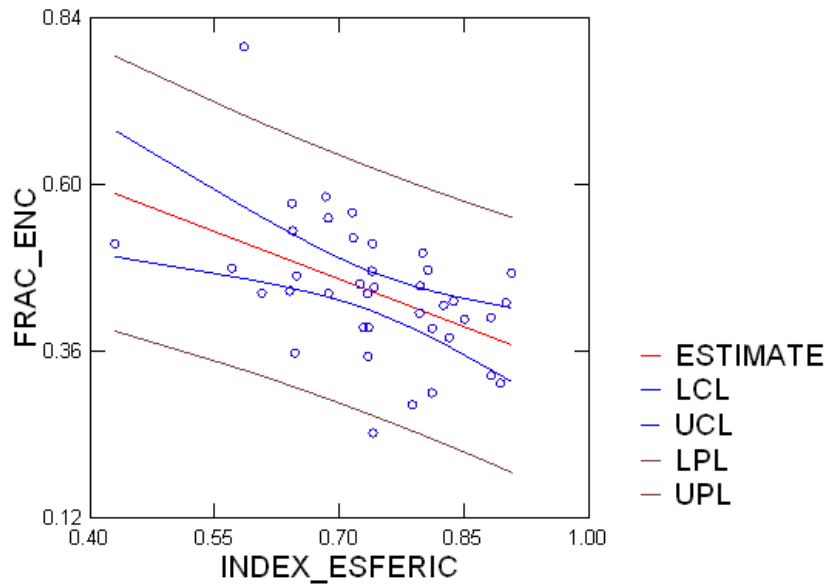


Figura 15. Média do índice de esfericidade (IE) nos grupos IAo e Sham observados em 1, 4, 8 e 12 semanas após a indução de insuficiência aórtica e cirurgia simulada

Confidence Interval and Prediction Interval



Confidence Interval and Prediction Interval

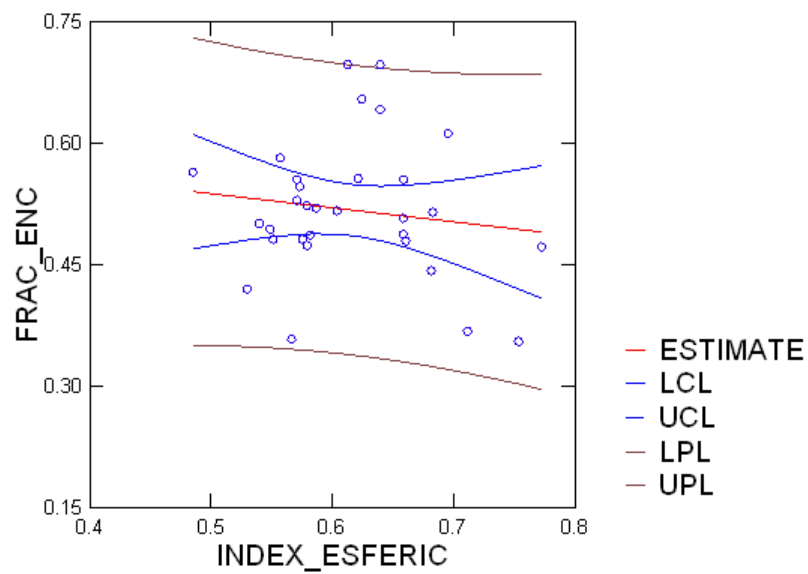


Figura 16. Gráficos de correlação linear de Pearson entre as variáveis fração de encurtamento e índice de esfericidade dos grupos IAo ($r=-0,477$; $p=0,002$) e Sham ($r=0,136$; $p=0,466$), superior e inferior, respectivamente.

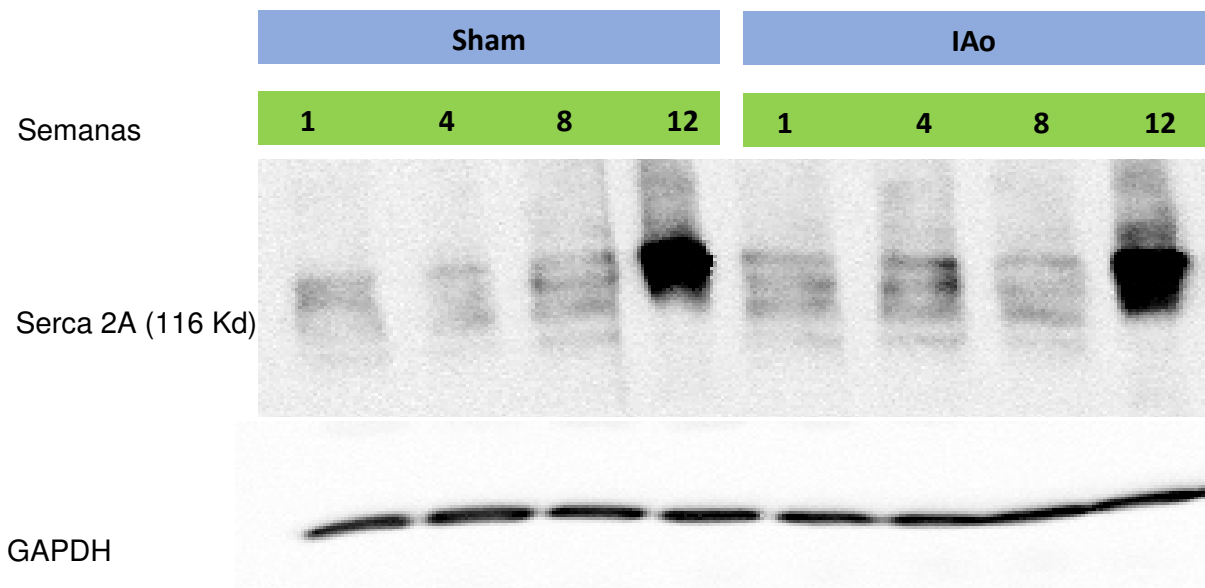


Figura 17. Quantificação da proteína Serca2a nos grupos IAo e Sham pelo método Wersten Blott.

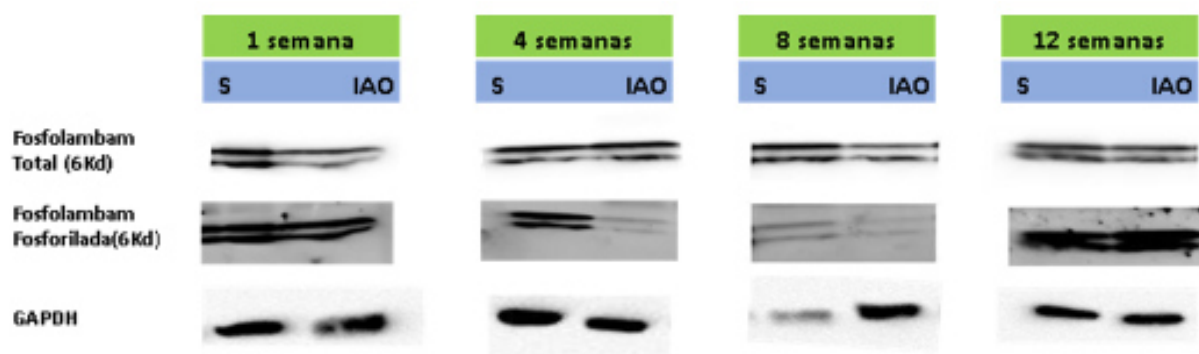


Figura 18. Quantificação da proteína fosfolambam nos grupos IAo e Sham pelo método Wersten Blott.

Figura 19. Resumo dos momentos das principais alterações do grupo submetido à insuficiência aórtica

Tempo (semanas)	↑ Índice de Esfericidade	↑ VE (g)	↑ iMVE	↑ AE (mm)	↑ Atividade mmp2 ativa/inativa	↑ TIMP	↑ Fração de Colágeno	↑ PP	↑ Área do miócito (μ^2)	↑ DDVE (mm)	↓ %E
1	Red	Black									
4		Black	Orange	Blue	Yellow	Green	Purple				
8	Red		Orange				Purple	Dark Blue	Light Orange	Dark Green	
12	Red	Black	Orange	Blue			Purple	Dark Blue	Light Orange	Dark Green	Grey

↑ - aumento do/da; ↓ - diminuição da; AE – diâmetro do AE; DDVE – diâmetro do ventrículo esquerdo no final da diástole; VE - massa do ventrículo esquerdo; iMVE - índice de massa do ventrículo esquerdo; PP – espessura da parede posterior, %E: porcentagem de encurtamento do ventrículo esquerdo

4. Discussão

O processo de remodelação cardíaca induzido pela sobrecarga de volume é muito menos conhecido que o mesmo processo, decorrente da sobrecarga pressórica. Por exemplo, medicações como inibidor de enzima conversora da angiotensina, betabloqueadores e bloqueadores de aldosterona parecem não ter impacto em retardar o processo remodelação em modelos experimentais de sobrecarga de volume. Este fato sugere, que diferentemente da sobrecarga de pressão, outros mecanismos, que não o sistema renina angiotensina aldosterona, estejam envolvidos na evolução da hipertrofia excêntrica, na dilatação ventricular e na posterior disfunção sistólica, que ocorre na sobrecarga de volume. Adicionalmente, a hipertrofia excêntrica passa por longo período assintomática, sendo que seu tratamento com troca valvar é indicado em formas avançadas da doença.^{26,27,28}

Portanto, faz-se importante estudar mecanismos fisiopatológicos e alterações morfofuncionais ao longo do tempo de evolução da sobrecarga de volume.^{26,29} Dessa forma, foi escolhido o modelo de insuficiência aórtica, que é caracterizada como uma condição particular, pois o VE é exposto à sobrecarga de volume e pressão. Assim, coube a este trabalho a intenção de gerar hipóteses para futuras pesquisas que envolvam propostas de terapias medicamentosas e diferentes momentos para indicação da troca valvar.

Para tanto, o presente estudo avaliou, por meio de ecocardiografia, alterações morfofuncionais cardíacas, induzidas pela IAo experimental, em ratos acompanhados por 1, 4, 8 e 12 semanas, após o procedimento. Além do estudo morfofuncional, foram avaliadas hipertrofia, fibrose, atividade de MMP2, TIMP-1 e expressão gênica e de proteínas envolvidas no trânsito de cálcio.

Esse estudo mostrou que, agudamente, na primeira semana após cirurgia de IAo, houve aumento da pressão diastólica de VE, não acompanhada de aumento da pressão sistólica. Após a quarta semana a pressão diastólica manteve-se em nível semelhante entre os grupos (Figura 3), mostrando que, por uma inadaptação ventricular momentânea, ocorre a insuficiência cardíaca aguda após a criação da insuficiência aórtica. O quadro agudo reverte-se na quarta semana de evolução e a pressão diastólica final se mantém em níveis normais até o final de experimento. Resultado similar foi anteriormente obtido por Liu et al.³⁰ Portanto,

a insuficiência aórtica aguda promove, precocemente, a insuficiência cardíaca que é espontaneamente revertida e o coração se adapta a nova condição de sobrecarga de volume.

Em relação às alterações morfofuncionais, avaliadas pelo peso do VE e ecocardiografia transtorácica, aconteceram na seguinte sequência: índice de esfericidade, peso do VE, AE, PP, DDVE e por fim alteração da função.

Logo na primeira semana após IAO observou-se alteração no índice de esfericidade (relação entre o eixo maior e eixo menor da câmara ventricular esquerda no final da diástole), devido à regurgitação aórtica aguda instalada. A sobrecarga de volume promove tensão uniforme e em todas as direções do VE, que favorece a mudança do VE para forma mais esférica.⁸ Assim, na primeira semana após IAO, observou-se aumento no índice de esfericidade e, nas semanas subsequentes, houve recuperação da geometria. Entretanto, a partir da oitava semana, a remodelação geométrica é progressiva e a forma elíptica da câmara ventricular esquerda progressivamente torna-se esférica em resposta a sobrecarga crônica de volume.

O peso do VE mostrou-se aumentado desde a primeira semana. A partir da quarta semana após IAO, houve aumento do índice de massa do VE na ausência de alteração da espessura relativa da parede posterior (ERP), avaliada pela razão entre (2PP/DDVE).

Em seguida, na oitava semana, houve aumento da PP e DDVE sem diferenças em relação à ERP.

Os diferentes padrões de hipertrofia são:

- Normal: iMVE e ERP normais
- Remodelação concêntrica: iMVE normal e ERP aumentada
- Hipertrofia excêntrica: iMVE aumentada e ERP normal
- Hipertrofia concêntrica: iMVE e ERP aumentadas.

Assim, a partir da quarta semana, pode-se afirmar que os ratos submetidos a IAO apresentaram hipertrofia miocárdica excêntrica como principal mecanismo adaptativo à sobrecarga crônica de volume. Nesta condição, é suposto que os miócitos apresentem crescimento longitudinal, favorecendo a dilatação da cavidade. Porém, baseado na lei de La Place, a tensão na parede do VE é

equivalente à pressão diastólica X raio da cavidade/ espessura da parede.^{31,32} Então, neste modelo, o ventrículo submetido à sobrecarga de volume, apresentou aumento do raio da cavidade. Para normalizar a tensão é necessário tentar aumentar a espessura da parede. Neste estudo, houve aumento da área seccional dos miócitos, avaliada pela histologia do tecido cardíaco, alteração que pode ser explicada pela tentativa de aumentar a espessura e manter a tensão da parede do VE.^{31,32} Adicionalmente, o modelo de insuficiência aórtica impõe sobrecarga, não apenas de volume, mas também de pressão.

No mesmo momento, na quarta semana, houve aumento do átrio esquerdo (AE) em relação ao grupo sham. Entretanto, dentro do grupo IAo não houve diferença entre o tamanho do AE nos diferentes momentos estudados. Estes resultados mostram que a discussão sobre disfunção diastólica na IAo é controverso. Roscani et al.⁸ sugeriram que este não é um modelo que implique em disfunção diastólica, pois a dilatação do VE aumenta a complacência ventricular e mantém a pressão de enchimento adequada. Por outro lado, Enache et al.³², observaram aumento do volume do AE em indivíduos com IAo assintomática e sem disfunção sistólica, quando comparado com o grupo controle. Em estudos clínicos prévios, a avaliação ecocardiográfica de pacientes com insuficiência aórtica mostram que eles apresentam disfunção diastólica, provavelmente resultante de alterações no relaxamento, elasticidade, volume residual e tamanho do VE.^{33,34}

Por fim, a fração de ejeção tornou-se reduzida na décima segunda semana, corroborando com a ideia de que a sequência de alterações morfológicas precedem a disfunção sistólica. Entretanto, no presente estudo não avaliamos sintomatologia de insuficiência cardíaca. O índice de esfericidade, assim como em outros trabalhos, apresentou correlação negativa com a fração de ejeção no grupo IAo, sugerindo que este poderia ser um índice mais precoce para detecção de disfunção sistólica. Diante dos resultados, em acordo com a literatura, ao lado da hipertrofia ventricular, a alteração geométrica é um mecanismo adaptativo para diminuição da tensão parietal e preservação da função cardíaca.³⁵ No entanto, a esferilização do ventrículo, com o tempo de evolução, é progressiva, assim como a piora da função sistólica do VE mensurada pela porcentagem de

encurtamento. A relação inversa entre o índice de esfericidade e fração de encurtamento está na figura 16.

Interessantemente, o débito cardíaco aumentou progressivamente com a evolução da IAo, possivelmente devido ao aumento do volume do VE pela sobrecarga de volume. Pode ser que mantenha-se neste patamar até o surgimento de sintomas da disfunção cardíaca. Portanto, na IAo, o débito cardíaco não seria um bom parâmetro de medida da disfunção sistólica.

Em relação aos mecanismos potencialmente envolvidos nas alterações morfofuncionais causadas pela sobrecarga de volume, podemos destacar as alterações da matriz extracelular (MEC). A MEC apresenta arquitetura complexa, composta por rede de colágeno, proteoglicanas, glicosaminoglicanas, entre outras moléculas bioativas. A função da MEC compreende a manutenção da estrutura, arquitetura e orientação das fibras musculares, bem como auxiliar na contração.³⁶ As metaloproteases e os inibidores de metaloproteases (TIMPs) apresentam papel crucial na remodelação da MEC.³⁶ Adicionalmente, as metaloproteases possuem papel relevante na remodelação cardíaca nos modelos de sobrecarga de volume.^{37,38} No presente estudo, a ativação da MMP2 aconteceu na quarta semana após IAo, juntamente com o aparecimento da hipertrofia excêntrica. Portanto a MMP2 pode ter contribuído com a degradação do colágeno e aumento da câmara ventricular. Entretanto, na tentativa de compensar esse remodelamento cardíaco, houve aumento da TIMP 1 nesse mesmo período, que provavelmente conteve uma dilatação excessiva induzida pela sobrecarga de volume.¹⁸ Adicionalmente, é possível que outras metaloproteases também estejam envolvidas nesse processo, já que o TIMP-1 é inibidor de outras enzimas diferentes de metaloprotease-2.¹⁸ Sobre a deposição de colágeno, em modelos de sobrecarga de volume pura, existe redução da deposição de colágeno.²⁵ Entretanto, o modelo de IAo impõe sobrecarga de pressão e volume, o que pode justificar a maior porcentagem de colágeno intersticial que apareceu após a quarta semana.³⁹ Da mesma forma, Mazzo et al.¹⁶ observaram fibrose na primeira semana após realização de fistula aorto-cava em ratos, principalmente na região subendocárdica, local este de menor fluxo miocárdico. Outro exemplo, após 4 e 8 semanas de cirurgia de fistula aorto-cava em ratos, Guido et al.⁴⁰ encontraram

fibrose intersticial e subendocárdica devido à queda de pressão de perfusão coronariana e aumento das pressões ventriculares. Portanto, é possível que, juntamente com a degradação do colágeno, tenha-se iniciado o processo de fibrose, para que os efeitos da dilatação ventricular não causassem alterações precoces da função cardíaca.

Outros mecanismos potencialmente relacionados com disfunção diastólica ou sistólica são alterações no trânsito da canal de cálcio. Neste trabalho, as concentrações relativas dos RNAm para a Serca2a, fosfolambam e Ryr não foram diferentes entre os grupos IAo e Sham. Observamos associação entre concentrações relativas dos RNAm da Serca2a e fosfolambam nos grupos IAo e Sham. Houve tendência de associação entre Ryr e Serca2a, principalmente no grupo Sham. Houve associação entre Ryr e fosfolambam no grupo Sham. No grupo IAo, as ausências do aumento progressivo de fosfolambam e Ryr e de associação entre Serca2a e Ryr e entre Ryr e fosfolambam, podem significar que a presença de sobrecarga de volume ocasiona a perda de interação entre as proteínas reguladoras da homeostase do cálcio, o que poderia favorecer a disfunção do processo de acoplamento do cálcio no mecanismo de excitação-contracção, que precederia o surgimento da insuficiência cardíaca.^{30,34,41}

Embora não tenhamos encontrado diferenças entre os grupos nas expressões do RNAm das proteínas do trânsito de cálcio, verificamos que a concentração de fosfolambam fosforilada foi menor no grupo IAo. Sabendo que níveis adequados de fosfolambam são fundamentais na função cardíaca⁴², é possível que a redução de sua concentração fosforilada tenha reduzido a função da serca2a, contribuindo no remodelamento ventricular e piora da função diastólica a partir da quarta semana, através do aumento do diâmetro do átrio esquerdo.

Em resumo, os dados obtidos no estudo nos mostram que:

- Na primeira semana após IAo houve aumento do índice de esfericidade, mostrando que o coração adquire forma esférica precocemente.
- Na quarta semana após IAo, observa-se hipertrofia excêntrica com ativação de MMP2. Nesse mesmo período, ocorre aumento da TIMP-1 e fração de

colágeno, na tentativa de conter uma dilatação excessiva induzida pela sobrecarga de volume.

- A atividade compensatória de TIMP-1 junto com aumento da fração de colágeno não foram suficientes para impedir que, na oitava semana após IAo, ocorresse aumentos da esfericidade ventricular e diâmetro diastólico do VE.
- Ainda na oitava semana, há aumento da área dos miócitos, seguido de aumento da espessura da parede posterior como forma de manter a tensão parietal próxima do normal para que não ocorra prejuízo da função cardíaca.
- Na semana 12 após IAo, a sobrecarga crônica de volume ocasiona prejuízo da função cardíaca, observada pela redução da porcentagem de encurtamento.
- É possível que a redução da fosfolambam fosforilada no grupo IAo também esteja envolvida no processo de remodelamento ventricular e tenha contribuído na piora da função diastólica observada pelo aumento do diâmetro do átrio esquerdo.

5. Conclusões

Verificamos, com 1 semana após IAO, que as primeiras alterações morfofuncionais causadas pela sobrecarga de volume foram alteração da geometria ventricular para forma esférica e aumento da massa do VE. Em seguida, na quarta semana de evolução, observou-se de aumento do diâmetro do átrio esquerdo e da fração de colágeno. Neste mesmo período houve ativação da MMP-2 e TIMP-1, que precederam os aumentos da espessura da parede posterior, da área seccional do miócito e do diâmetro diastólico do VE, ocorridos na oitava semana, mostrando que estes mecanismos podem ter participado da dilatação e hipertrofia ventricular. É possível que haja participação de alterações do trânsito de cálcio, porém não foi possível detectar o momento exato. E, por fim, na décima segunda semana, observou-se redução da função cardíaca pela diminuição da porcentagem de encurtamento.

6. Referências Bibliográficas

1. Carabello BA. Progress in mitral and aortic regurgitation. *Prog Cardiovasc Dis.* 2001;43(6):457-75.
2. Matsubara LS, Narikawa S, Ferreira AL, Paiva SA, Zornoff LM, Matsubara BB. Myocardial remodeling in chronic pressure or volume overload in the rat heart. *Arq Bras Cardiol.* 2006;86(2):126-30.
3. Wisenbaugh T, Spann JF, Carabello BA. Differences in myocardial performance and load between patients with similar amounts of chronic aortic versus chronic mitral regurgitation. *J Am Coll Cardiol.* 1984;3(4):916-23.
4. Velagaleti RS, Gona P, Pencina MJ, Aragam J, Wang TJ, Levy D, et al. Left ventricular hypertrophy patterns and incidence of heart failure with preserved versus reduced ejection fraction. *Am J Cardiol.* 2014;113(1):117-22
5. Fischl SJ, Golin R, Herman MV. Cardiac shape and function in aortic valve disease: physiology and clinical implication. *Am J Cardiol.* 1977;39:170-76.
6. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling - concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35(3):569-82.
7. Matsubara LS, Narikawa S, Ferreira AL, Paiva SA, Zornoff LM, Matsubara BB. Myocardial remodeling in chronic pressure or volume overload in the rat heart. *Arq Bras Cardiol.* 2006;86(2):126-30.
8. Roscani MG, Polegato BF, Minamoto SET, Lousada APM, Minicucci MF, Azevedo P, et al. Left ventricular sphericity index predicts systolic dysfunction in rats with experimental aortic regurgitation. *J Appl Physiol.* 2014;116(10):1259-62.
9. Wisenbaugh T, Spann JF, Carabello BA. Differences in myocardial performance and load between patients with similar amounts of chronic aortic versus chronic mitral regurgitation. *J Am Coll Cardiol.* 1984,3(4):916-23.

10. Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev.* 1999;79(1):215-62.
11. Wang X, Ren B, Liu S, Sentex E, Tappia PS, Dhalla NS. Characterization of cardiac hypertrophy and heart failure due to volume overload in the rat. *J Appl Physiol.* 2003;94(2):752-63.
12. De Stefano LM, Matsubara LS, Matsubara BB. Myocardial dysfunction with increased ventricular compliance in volume overload hypertrophy. *Eur J Heart Fail.* 2006;8(8):784-9.
13. Plante E, Couet J, Gaudreau M, Dumas MP, Drolet MC, Arsenault M. Left ventricular response to sustained volume overload from chronic aortic valve regurgitation in rats. *J Card Fail.* 2003;9(2):128-40.
14. Lambert E, Dassé E, Haye B, Petitfrère E. TIPMs as multifacial proteins. *Crit Ver Oncol Hematol.* 2004;49(3):187-98.
15. Dolgilevich SM, Siri FM, Atlas SA, Eng C. Changes in collagenase and collagen gene expression after induction of aortocaval fistula in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;281(1):H207-14.
16. Mazzo FR, de Carvalho Frimm C, Moretti AI, Guido MC, Kroike MK. Acute aortocaval fistula: role of low perfusion pressure and subendocardial remodeling on left ventricular function. *Int J Exp Pathol.* 2013;94(3):178-87.
17. Kolpakov MA, Seggat R, Rafiq K, Xi H, Marquies KB, Libonati JR, et al. Pleiotropic effects of neutrophils on myocyte apoptosis and left ventricular remodeling during early volume overload. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;47(5):634-45.
18. Janssens S, Lijnen HR. What has been learned about the cardiovascular effects of matrix metalloproteinases from mouse models? *Cardiovasc Research.* 2006;69:585-94.

19. Assayag P, Charlemagne D, de Leiris J, Boucher F, Valere PE, Lortet S, et al. Senescent heart compared with pressure overload-induced hypertrophy. *Hypertension*. 1997;29:15-21
20. Minamisawa S, Hoshijima M, Chu G, Ward CA, Frank K, Gu Y, et al. Chronic phospholamban-sarcoplasmic reticulum calcium ATPase interaction is the critical calcium cycling defect in dilated cardiomyopathy. *Cell*. 1999 Oct 29;99(3):313-22.
21. Sanh DJ, De Maria A, Kisslo J, Weyman A. Recommendations regarding quantitation in M mode echocardiography: Results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation*. 1978;58:1072-83.
22. Plante E, Lachance D, Champetier S, Drolet MD, Roussel E, Arsenault M, et al. Benefits of long-term beta-blockade in experimental chronic aortic regurgitation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;294:H1888-95.
23. Tyagi SC, Matsubara L, Weber KT. Direct extraction and estimation of collagenase(s) activity by zymography in microquantities of rat myocardium and uterus. *Clin Biochem*. 1993 Jun;26(3):191-8.
24. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):2002-7.
25. Bradford MM. 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.
26. Barnes J, Dell'Italia LJ. The multiple mechanistic faces of a pure volume overload: implications for therapy. *Am J Med Sci*. 2014;348:337-46.
27. Bonow RO. Aortic Regurgitation. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*. 2000;2(2):125-32.
28. Magid NM, Opio G, Wallerson DC, Young MS, Borer JS. Heart failure due to chronic experimental aortic regurgitation. *Am J Physiol*. 1994;267:H556-62.

29. Nishimura RA, Otto CM, Bonow RO, Carabello BA, Erwin JP3rd, Guyton RA, et al. 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with valvular heart disease: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines. *Circulation*. 2014;129:2440-92.
30. Liu Z, Hilbelink DR, Crockett WB, Gerdes AM. Regional changes in hemodynamics and cardiac myocyte size in rats with aortocaval fistulas. Developing and established hypertrophy. *Circ Res*. 1991;69(1):52-8.
31. Gaasch WH, Zile MR. Left ventricular structural remodeling in health and disease: with emphasis on volume, mass, and geometry. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58:1733-40.
32. Savinova OV, Gerdes AM. Myocyte changes in heart failure. *Heart Fail Clin*. 2012;8:1-6.
33. Enache R, Popescu BA, Piazza R, Muraru D, Călin A, Beladan CC, et al. Left ventricular shape and mass impact torsional dynamics in asymptomatic patients with chronic aortic regurgitation and normal left ventricular ejection fraction. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2015;31:1315-26.
34. Lamb HJ, Beyerbacht HP, de Roos A, van der Laase A, Vliegen HW, Leuyes F, et al. Left ventricular remodeling early after aortic valve replacement: differential effects on diastolic function in aortic valve stenosis and aortic regurgitation. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40:2182-8.
35. Gaasch WH, Delorey DE, St John Sutton MG, Zile MR. Patterns of structural and functional remodeling of the left ventricle in chronic heart failure. *Am J Cardiol*. 2008;102(4):459-62.
36. Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev*. 2007;87:1285-342.

37. Janicki JS, Brower GL, Gardner JD, Chancey AL, Stewart JA, Jr. The dynamic interaction between matrix metalloproteinase activity and adverse myocardial remodeling. *Heart Fail Rev.* 2004;9(1):33-42.
38. Truter SL, Catanzaro DF, Supino PG, Gupta A, Carter J, Herrold EM, et al. Differential expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors and extracellular matrix remodeling in aortic regurgitant hearts. *Cardiology.* 2009;113(3):161-8.
39. Carabello BA. Concentric versus eccentric remodeling. *J Card Fail.* 2002;8:S258-63.
40. Guido MC, Koike MK, Frimm CC. Low coronary perfusion pressure is associated with endocardial fibrosis in a rat model of volume overload cardiac hypertrophy. *Rev Hosp Clín Fac Med S Paulo.* 2004;59(4):228-35.
41. Koss KL, Kranias EG. Phospholamban: A Prominent Regulator of Myocardial Contractility. *Circulation Research.* 1996;79(6):1059-63.
42. Zhao W, Song Q, Kranias EG. The critical role of phospholamban in cardiac function. *Hellenic J Cardiol.* 2004;45:208-17.