

Elenize Jamas Pereira

**Remodelação Miocárdica e
função ventricular em ratos
espontaneamente hipertensos
observados durante o
envelhecimento**

Tese apresentada à Faculdade
Medicina de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista "Júlio de Mesquita
Filho", Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutor em
Fisiopatologia em Clínica Médica.

**Botucatu
2008**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
Bibliotecária responsável: Selma Maria de Jesus

Pereira, Elenize Jamas.

Remodelação miocárdica e função ventricular em ratos espontaneamente hipertensos observados durante o envelhecimento / Elenize Jamas Pereira. – Botucatu : [s.n.], 2008.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2008.

Orientador: Luiz Shiguero Matsubara

Assunto CAPES: 40102041

1. Hipertensão - Fisiopatologia - Estudos experimentais. 2. Coração – Hipertrofia.

CDD 616.132061

Palavras chave: Colágeno; Expressão dos transportadores de cálcio; Função ventricular; Hipertrofia cardíaca; Remodelação cardíaca.

Trabalho realizado no Laboratório Experimental do
Departamento de Clínica Médica, UNESP, Botucatu.

*“A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério.
É esta a emoção fundamental que está na raiz de toda a ciência e arte.”*

Albert Einstein

*Dedico este trabalho aos meus pais, Manoel e Clarice, que
me proporcionaram as maiores oportunidades da vida*

Ao meu esposo Orlando pelo incansável apoio

Ao Filipe, fruto de nosso amor.

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”

Fernando Pessoa

Agradecimento Especial

Meus agradecimentos ao meu orientador, professor Dr. Luiz Shiguero Matsubara, pela oportunidade oferecida de enriquecer meu conhecimento, com suas argumentações científicas e sugestões, por todo empenho, sabedoria, compreensão e, acima de tudo, exigência. Gostaria de ratificar a sua competência, participação com discussões, correções, e principalmente pelo bom convívio que fizemos com que concluíssemos este trabalho.

Esta tese é o resultado de trabalho em conjunto, da cooperação e da amizade de muitas pessoas. Por isto, muito obrigada a todos aqueles cujo apoio e amizade fizeram a diferença.

Camila Renata Corrêa-Camacho

Corina Correa

José Carlos Georgete

José Ap.Souza

Mário Batista Bruno

Rogério Monteiro

Sandra A. Fábio

Sueli Clara

Vitor Marcos de Souza

Loreta Casquel

Marta Regina Sarzi

Prof. Dra. Ana Lúcia Ferreira

Prof. Dr. Antonio Carlos Cicogna

Prof. Dra. Beatriz B. Matsubara

Prof. Dra. Marina P. Okoshi

Prof. Dr. Leonardo M. Zornoff

Prof. Dr. Sérgio Rupp Paiva

Há muito mais a quem agradecer... A todos aqueles que, embora não nomeados me brindaram com seus inestimáveis apoios em distintos momentos e por suas presenças afetivas, meu muito obrigada!

Agradecimientos

Ao meu marido Orlando Junior, por sua extensa paciência, pelo seu amor, por sempre estar disposto a me ajudar em qualquer situação e principalmente pelo seu apoio que me conforta e me deixa mais forte para superar meus desafios.

Ao meu filho Filipe, pela sua existência e pelo seu sorriso e ao Guilherme meu sobrinho querido.

Aos meus pais, Clarice e Manoel, que me deram não somente a vida, mas principalmente a minha educação e condições de estudo e sempre me estimularam a dar este grande passo. Estas duas pessoas com muita sabedoria, discernimento, bom senso e dedicação estiveram ao meu lado me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória. Obrigada por serem meus pais, profissionais corretos e competentes, fonte de inspiração, apoio e ensino diário.

Aos meus familiares que sempre me deram amor e força, valorizando meus potenciais.

Aos meus irmãos Eliandro e Eliriane, pelo apoio, alegria e afeto e cunhadas que sempre torceram por mim, Clélia, Marilu, Marília, Marise e Marilda.

Agradeço afetosamente à amiga Sueli Clara pela formatação e dedicação comigo e com a tese. Com certeza amiga sem essa cumplicidade e carinho, teria sido mais difícil. Minha muitíssima obrigada.

Existem pessoas que se tornaram especiais pela maneira de ser ou de agir, mas pela profundidade com que atingem nossos sentimentos, muito obrigada Ana Paula, sua ajuda foi fundamental.

Aos coordenadores do Programa de Pós-Graduação: Célia Regina Nogueira e Luiz Shiguero Matsubara pela oportunidade de crescimento, aprendizado, realização profissional e pessoal e pela confiança em mim

depositada.

Em especial pelos colegas de pós-graduação: Ana Paula, Loreta, André Leopoldo, André Nascimento, Paula, Silvio, Dijon, Olga, Renata, Sandro, Aline, Cris, Rosangela, Lidiane, Paula Gaiolla, Marcos Minicucci e novatos, pela alegre convivência e sugestões e alguns destes foram essenciais no desenvolvimento deste trabalho. À vocês muito obrigada!

Aos funcionários da secretária de pós-graduação, Regina, Janete, Nathanael, Selma, Lílian, Andréa e Ana Mengue, pelo extremo profissionalismo, competência e simpatia a mim dispensado, meus sinceros agradecimentos.

As funcionárias da Biblioteca, pela orientação prestada e confecção da ficha catalográfica.

Ao Departamento de Clínica, e funcionários pelo apoio.

A Fapesp, pelo apoio financeiro.

E finalmente a Deus por sempre me iluminar, sustentar e me guiar...

Resumo

A hipertensão arterial sistêmica é uma das principais causas de hipertrofia ventricular. Dados clínicos e experimentais mostram que a hipertrofia ventricular é fator independente de risco cardiovascular associado à maior morbidade. Isto se deve à remodelação cardíaca em resposta a sobrecarga de pressão. Na remodelação cardíaca é observada a hipertrofia ventricular, alteração na matriz extracelular evidenciada por aumento no colágeno intersticial, alteração nos vasos arteriais caracterizada por hipertrofia da camada média da parede vascular e alteração na geometria ventricular. A remodelação ventricular é a causa de disfunção cardíaca que culmina no surgimento da insuficiência cardíaca congestiva.

Considerando-se que a hipertensão arterial é importante causa de comprometimento cardiovascular, assim como o envelhecimento é fator que pode levar à insuficiência cardíaca, a nossa hipótese de trabalho é de que a hipertensão arterial é fator aditivo ao envelhecimento para a remodelação cardíaca e disfunção ventricular.

O objetivo do trabalho foi avaliar a função cardíaca e a homeostase do cálcio em ratos hipertensos durante o envelhecimento.

Foram estudados ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e ratos controles não hipertensos (WKY) com idade de 30 semanas (SHR30, n=09 e WKY30, n=10), 45 semanas (n=7) e SHR 45 (n=8), 60 semanas WKY60 (n=8) e SHR 60 (n=11) e 90 semanas WKY90 (n=10) e SRH 90 (n=17).

A função cardíaca foi avaliada por meio de coração isolado pela técnica de Langerdorff e as seguintes variáveis foram consideradas: V_0 – volume do coração para pressão diastólica de 0mmHg, VE/V_0 – relação entre peso do ventrículo esquerdo (VE) e V_0 como índices de geometria ventricular. A função sistólica foi avaliada

pelas variáveis $+dp/dt$, relação pressão-volume sistólica (RPVsist) e relação stress-strain sistólica (R-SSist).

A função diastólica foi analisada pelas variáveis $-dp/dt$, complacência ventricular (ΔV_{20}), derivada da relação pressão-volume diastólica e obtida com volume diastólico necessário para obter pressão diastólica de 20mmHG. A rigidez passiva diastólica ($Stress_{20}$), foi obtida a partir da relação “stress-strain” diastólica e mensurada como estresse diastólico para Strain de 20%.

A remodelação cardíaca foi verificada através de dados de peso do ventrículo esquerdo (VE), fração de colágeno intersticial (CVF) e área seccional do miócito (ASM).

A homeostase do cálcio foi estudada por meio de quantificação da expressão do RNA mensageiro no miócito, das proteínas reguladoras do trânsito de cálcio, Serca 2a, fosfolambam e receptores dos canais rianodínicos (RyR).

Nos animais hipertensos houve diminuição da câmara ventricular mensurada pelo V_0 (μL) com o aumento da idade e o efeito oposto ocorreu nos animais não hipertensos. Observou-se hipertrofia concêntrica, mensurada pela variável VE/V_0 , nos animais hipertensos e este dado foi maior nos animais idosos.

A função sistólica, avaliada pela variável $+dp/dt$ (mmHg/s), mostrou melhor desempenho do coração hipertrofiado em comparação ao controle WKY e houve queda do desempenho nos ratos idosos, independente da cepa. No entanto, ao avaliarmos a função sistólica pela variável R Pv sist, observamos que a função ventricular do VE está melhor na cepa. O mesmo ocorreu com a variável RSSis. Ambas as variáveis mostraram que há diminuição da função com envelhecimento. Assim, a velocidade de geração de força é maior no

coração hipertrofiado, porém esta hipertrofia não significa necessariamente melhor função sistólica. As relações PV sist e SS sist mostraram que a câmara ventricular e o músculo cardíaco dos corações não hipertrofiados apresentaram melhores funções sistólicas que o coração hipertrofiado. Estes resultados mostram a dificuldade em caracterizar a função sistólica e a utilização de vários índices é uma tentativa de obter dados que reflitam a verdadeira função contrátil independente da massa e da geometria ventricular.

Esta dificuldade também é expressa na caracterização da função diastólica e no trabalho utilizamos a velocidade máxima de queda da pressão na unidade de tempo, que mostrou ser maior nos corações de ratos hipertensos em relação ao controle. Não houve alteração desta variável em decorrência do envelhecimento. A medida de complacência (ΔV_{20}) não mostrou diferença entre as cepas, exceto para a idade de 45 semanas e houve aumento nas idades mais avançadas em ambas as cepas

A rigidez passiva miocárdica mensurada pelo stress_{20} foi maior nos ratos hipertensos SHR e houve aumento progressivo e linear nos ratos com a idade em ambas as cepas. A maior rigidez passiva no grupo SHR, em parte, pode ser atribuída ao aumento do colágeno intersticial medido pelo CVF e pela menor expressão do RNAm para Serca 2a. Entretanto, a CVF e o Serca 2a não modificaram com o aumento da idade, na cepa SHR. Assim, no coração hipertrofiado, a alteração de função diastólica com a idade não foi circunstanciada à presença maior de fibrose e tampouco à homeostase do cálcio. Outros fenômenos associados ao envelhecimento devem ter papel na gênese da disfunção diastólica do envelhecimento em corações hipertrofiados. Em corações da cepa WKY não hipertensos, observou-se que a queda progressiva de expressão do RNAm para a Serca 2a e este fato deve ter contribuído para maior disfunção diastólica.

Em ambas as cepas de animais não houve modificação na expressão do RNAm dos receptores rianodínicos e de fosfolambam, demonstrando que estas proteínas, participantes da homeostase do cálcio, não estão alterada no envelhecimento, associados ou não com hipertrofia ventricular. Em conclusão, a remodelação cardíaca nos ratos hipertensos foi caracterizada pela hipertrofia concêntrica e aumento do colágeno intersticial. Na amostra estudada verificou-se diminuição de função sistólica e diastólica com a idade e não houve evidência de deterioração da função cardíaca pela associação da hipertrofia ventricular com o envelhecimento e a expressão do Serca 2a diminuiu com o envelhecimento em animais não hipertensos e tem permanecido inalterado nos animais hipertensos. A homeostase do cálcio não foi dependente da expressão de receptores de canais rianodínicos e tampouco do fosfolambam que não modificaram com a idade e hipertrofia.

Abstract

The hypertension is a major cause of ventricular hypertrophy. Clinical and experimental data showed that ventricular hypertrophy is independent factor for cardiovascular risk associated with higher morbidity. This is due to cardiac remodeling in response to pressure overload. Ventricular hypertrophy increase interstitial collagen, vascular media layer hypertrophy of wall and change in ventricular geometry is observed in cardiac remodeling. The ventricular remodeling is the cause of cardiac dysfunction that culminates in congestive heart failure.

Considering that hypertension is a major cause of cardiovascular disease and the aging is factor that can lead to heart failure, we hypothesized that hypertension and aging have an additive effect on cardiac remodeling and ventricular dysfunction.

The objective was to assess the ventricular function and measure the mRNA of protein evolved calcium homeostasis in hypertensive rats during aging.

We studied spontaneously hypertensive rats (SHR) and non hypertensive controls rats (WKY) aged 30 weeks (SHR30, n = 09 in WKY30, n = 10), 45 weeks (n = 7) and SHR 45 (n = 8) , 60 weeks WKY60 (n = 8) and SHR 60 (n = 11) and 90 weeks WKY90 (n = 10) and SRH 90 (n = 17).

Cardiac function was studied in isolated beating heart according to Langerdorff technique and the following variables were considered: V_0 - volume of the heart to diastolic pressure of 0mmHg, VE/V_0 - relationship between the left ventricle weight (LV) and V_0 as an index of ventricular geometry. The systolic function was evaluated by; $+ dp/dt$, systolic pressure-volume relationship (RPVsist) and systolic stress-strain relationship (R-SSist). The diastolic function was examined by: $- dp/dt$, ventricular compliance (ΔV_{20}), measured as diastolic volume

necessary to increase diastolic pressure from 0 to 20mmHG and passive stiffness (Stress₂₀), measured as stress corresponding to strain 20%.

The cardiac remodeling was evaluated by left ventricular weight, collagen volume fraction (CVF) and the myocyte sectional area (ASM).

The calcium homeostasis has been studied by quantification of Serca 2a, phospholamban and ryanodine receptor mRNA from cardiac tissue of both strains at different ages.

Aged hypertensive rats showed a diminished ventricular volume measured by V_0 (μ L), and opposite effect occurred in non-hypertensive rats. There was concentric hypertrophy, measured by the variable VE/V_0 , in hypertensive animals, and it was increased in elderly animals.

The systolic function, evaluated by $+ dp / dt$ (mmHg / s), showed better performance of the hypertrophic heart compared to the control WKY and there was a fall in performance with aging, regardless of the strain. However, the systolic function analysed by RPV_{sist} (mmHg / mL) showed a better ventricular function in WKY. A similar result was observed with RSS_{sist} . Both variables showed decreased function with aging. Therefore, the force generation velocity is higher in hypertrophic heart. However, this hypertrophy does not necessarily mean better systolic function. Systolic Pressure-volume and stress-strain relationship showed that non-hypertrophic ventricular chamber and cardiac muscle had better systolic functions than hypertrophic heart. These results show the difficulty in characterizing the systolic function and the use of various indices is an attempt to obtain data that reflect the true contractile function independent of ventricular mass and geometry.

This difficulty also occurs in studying diastolic function. At work we use the maximum velocity of the pressure decay, which showed to be increased in the hearts of hypertensive rats compared to the control.

The ventricular compliance (ΔV_{20}) showed no difference between the strains except for the age of 45 weeks and there was an increase in old age in both strains.

The passive myocardial stiffness measured by stress₂₀ was higher in hypertensive rats SHR and there was progressive and linear increase with the age in both strains. Higher passive stiffness in the SHR group, in part, can be attributed to the increased interstitial collagen measured by the and the lower expression of the mRNA for Serca 2a. However, the Cx43 and Serca 2a did not change with age, in the SHR strain. Therefore, in aged heart, of heart hypertrophied, the alteration in diastolic function with age was not explained by fibrosis or mRNA expression of calcium homeostasis regulatory protein. In hearts of the WKY strain, the progressive decay of expression of mRNA for Serca 2a, might have contributed to diastolic dysfunction in group.

In both strains there was no change in the mRNA expression of ryanodine and phospholamban receptors, showing that these proteins, are not altered in aging. In conclusion the cardiac remodeling in hypertensive rats was characterized by concentric hypertrophy and increased interstitial collagen. In the study, it was observed decrease of systolic and diastolic function with age and there was no evidence of deterioration in cardiac function with the association of ventricular hypertrophy and aging. The expression of Serca 2a decreases with aging in non-hypertensive rats and remain unchanged in hypertensive animals. The calcium homeostasis was not dependent of the expression of ryanodine receptor or phospholamban and both did not change with age and hypertrophy.

Sumário

<i>Introdução</i>	01
1.1. Hipertensão Arterial e Remodelação Miocárdica.....	02
1.2. Função Cardíaca e Envelhecimento.....	03
1.3. Remodelação Cardíaca – Aspectos Morfológicos.....	05
1.4. Expressão dos Transportadores de Ca ²⁺ no envelhecimento.....	06
<i>Objetivos</i>	09
<i>Métodos</i>	11
Grupos experimentais.....	12
Estudo da função ventricular em coração isolado: preparação de Langendorff.....	12
Estudo Morfológico.....	14
Avaliação da expressão gênica da Fosfolambam (PLB), Receptores rianodínicos (RyR), Serca 2a e Ciclofilina por Reação em Cadeia da Polimerase após Transcrição Reversa semi-quantitativo (RT - PCR)	15
Extração de RNA com TRIzol.....	15
Gel analítico de agarose para RNA.....	16
Validação do RT-PCR semi-quantitativo.....	17
Etapas da validação do RT-PCR semiquantitativo.....	17
Transcrição reversa (RT) do RNA.....	18
Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	18
Primers.....	19
Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores.....	19
Análise Estatística.....	20
<i>Resultados</i>	21

<i>Discussão</i>	40
<i>Conclusões</i>	50
<i>Referências</i>	52

Lista de Figuras

<i>Figura 1.</i>	Representação esquemática da mobilização de Ca^{2+} durante a contração e o relaxamento miocárdio. Cerca 2a: ATPase de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático; PLB: fosfolambam; RyR: receptor rianodina; CSQ2: calsequestrina; NCX; trocador Na^+/Ca^{2+} e Canal L: canal lento de Ca^{2+}	07
<i>Figura 2.</i>	Peso corporal em gramas de acordo com a idade representada pela média; comparações entre os grupos foram efetuadas pela análise de variância de duas vias, seguida de teste de comparação múltiplas de Tukey.....	26
<i>Figura 3.</i>	Média da pressão arterial sistólica de acordo com a cepa e idade.....	27
<i>Figura 4.</i>	Peso do ventrículo esquerdo (VE), média dos grupos estudados.....	28
<i>Figura 5.</i>	Relação entre pesos do ventrículo esquerdo e peso corporal dos grupos experimentais.....	28
<i>Figura 6.</i>	Peso do ventrículo direito (VD), médias dos grupos de acordo com a cepa e as idades.....	29
<i>Figura 7.</i>	Relação do peso do ventrículo direito (VD) e peso corporal, médias dos grupos estudados.....	30
<i>Figura 8.</i>	Médias do volume diastólico para a pressão diastólica de 0 mmHg (V0) dos grupos estudados.....	31
<i>Figura 9.</i>	Média da relação peso do ventrículo esquerdo e V0 dos grupos estudados.....	31
<i>Figura 10.</i>	-dp/dt de acordo com a cepa e idade.....	32
<i>Figura 11.</i>	+dp/dt de acordo com a cepa e idade.....	33
<i>Figura 12.</i>	Relação PV Sistólica de acordo com a cepa e idade.....	34
<i>Figura 13.</i>	Relação Estresse - Deformação Sistólica.....	34

<i>Figura 14.</i>	Rigidez passiva miocárdica mensurada pelo Strain_{20} de acordo com a cepa e a idade.....	35
<i>Figura 15.</i>	Complacência ventricular mensurada pelo ΔV_{20} de acordo com cepa e idade.....	36
<i>Figura 16.</i>	Médias da fração de colágeno (CVF) dos grupos estudados.....	36
<i>Figura 17.</i>	Médias e erro-padrão da área celular dos grupos estudados.....	37
<i>Figura 18.</i>	Serca 2a e média dos grupos estudados.....	38
<i>Figura 19.</i>	Foto do corte de gel com bandas eletroforéticas de RNAm para Serca 2a dos grupos SHR (hipertensos) e WKY (controles).....	38
<i>Figura 20.</i>	Foto do corte de gel com bandas eletroforéticas de RNAm para Receptores Rianodínicos (RyR) dos grupos SHR (hipertensos) e WKY (controles).....	39
<i>Figura 21.</i>	Foto do corte de gel com bandas eletroforéticas de RNAm para fosfolambam (PLB) dos grupos SHR (hipertensos) e WKY (controles).....	39

Lista de Tabelas

<i>Tabela 1.</i>	Média e o erro padrão da média das Variáveis Morfométricas e Pressão Arterial Caudal.....	22
<i>Tabela 2.</i>	Média e erro padrão da média das variáveis obtidas pelo estudo do coração isolado e da variável VD/PC.....	23
<i>Tabela 3.</i>	Médias e erro padrão da média das variáveis de função sistólica e diastólica, obtidas pelo estudo do coração isolado.....	24
<i>Tabela 4.</i>	Média e erro padrão da média das variáveis morfológicas do ventrículo esquerdo e da expressão de RNAm.....	25

Introdução

1.1. Hipertensão Arterial e Remodelação Miocárdica

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma das principais causas de complicações cardiovasculares em nosso meio, devido à sua alta incidência e pelo fato de ser uma doença insidiosa e silenciosa, ela é subdiagnosticada. Frequentemente, o seu diagnóstico é efetuado quando há complicações ou comprometimento de órgãos alvos como o coração, cérebro e rins¹. A hipertensão arterial é um fator de risco cardiovascular, sendo sobrepujada apenas pela doença aterosclerótica coronariana como agente etiológico de insuficiência cardíaca congestiva^{2,3,4}. A hipertrofia ventricular esquerda secundária à hipertensão arterial sistólica é acompanhada por alterações nos miócitos, no tecido intersticial, fibras colágenas e no sistema tecido vascular⁵. Modificações na geometria, composição do tecido cardíaco e expressão gênica caracterizam o que denominamos remodelação miocárdica. A remodelação miocárdica é a resposta adaptativa a diversos estímulos como a sobrecarga de pressão e volume, ativação neurohormonal, inflamação e outros agentes físicos e biológicos.

Modelos experimentais são largamente utilizados em estudos sobre fisiopatologia da remodelação cardíaca induzida pela hipertensão arterial. O rato espontaneamente hipertenso (SHR) é o modelo que mais se aproxima da hipertensão arterial essencial humana, pois apresenta características similares como aumento da resistência periférica total, débito cardíaco normal, volemia normal ou levemente reduzida e progressiva hipertrofia ventricular esquerda⁶. Os SHRs começam a desenvolver aumento de pressão arterial entre 6 e 8 semanas de vida, apresentando nível de pressão considerada como hipertensão entre a 8ª e a 14ª semanas, atingindo um platô entre a 20ª e 28ª semanas⁷.

1.2. Função Cardíaca e Envelhecimento

No envelhecimento, ocorrem mudanças no sistema cardiovascular, como aumento da rigidez arterial, aumento da pós-carga, e da massa do VE, e modificação da complacência miocárdica que resultam em alterações na fisiologia do coração. As modificações cardíacas em decorrência do envelhecimento são atribuídas a deposição de substâncias fucsínicas, hipertrofia, perda de miócitos por apoptose e isquemia relativa^{8,9}.

As mudanças na fisiologia cardiovascular devem ser diferenciadas dos efeitos patológicos tais como da doença arterial coronariana, que ocorrem com freqüência crescente enquanto a idade aumenta¹⁰.

Na hipertensão sistólica isolada, o aumento da massa ventricular do VE é fator associado a maior morbidade e mortalidade entre indivíduos mais velhos¹¹.

A doença hipertensiva aumenta o risco de disfunção diastólica. Os mecanismos fisiopatológicos que governam a função diastólica são complexos e influenciados por muitas variáveis, particularmente a idade^{12,13,14,15}, embora estudos recentes têm demonstrado a ocorrência de disfunção diastólica em fases incipientes da doença cardíaca hipertensiva, na qual ainda não se encontra presente a hipertrofia cardíaca¹⁶.

As manifestações da doença cardíaca hipertensiva e do envelhecimento do coração são similares: Hipertrofia ventricular, fibrose do miocárdio e danos na função ventricular e na hemodinâmica coronária caracterizam ambas¹⁷. Tanto a idade como a hipertensão predis põem a remodelação vascular com aumento na espessura vascular e aumento na

velocidade e magnitude da onda de deslocamento da pressão arterial¹⁸. Estes dados podem sugerir a ocorrência de efeito somatório do envelhecimento e da HAS sobre o sistema cardiovascular.

Shapiro e cols¹⁹ observaram em cães hipertensos idosos maior rigidez arterial em relação a cães jovens; no entanto, ambos apresentaram a mesma resposta vascular com infusão de fenilefrina, mostrando manutenção da resistência vascular total em manobras que aumentam a pós-carga. Esta alteração na resposta vascular em cães idosos e hipertensos não levou à hipertrofia ventricular mensurada pelo peso, mas ao menor volume ventricular nos cães velhos hipertensos, em relação aos cães jovens.

Estes achados sugerem que a hipertensão induz deslocamentos para cima e para a esquerda da curva pressão-volume sistólica e diastólica. Entretanto, outros trabalhos evidenciaram aumento do volume diastólico e sistólico finais com manutenção da fração de ejeção em decorrência do envelhecimento²⁰, bem como hipertrofia do ventrículo²¹ e comprometimento na capacidade de dilatação coronária²². Portanto, alterações de função cardíaca no envelhecimento são caracterizadas por redução da complacência ventricular²³, mesmo na ausência de hipertrofia, menor distensibilidade vascular que promove aumento da pressão diastólica por deterioração das fibras elásticas e formação de colágeno no interstício.

Estudos em seres humanos, como o realizado em Baltimore, demonstraram que o trabalho cardíaco, em repouso e durante o exercício, e a fração da ejeção eram inalterados durante o envelhecimento²⁴, apesar das alterações pronunciadas e bem documentadas no enchimento do ventrículo esquerdo e na complacência diastólica²⁵. Em contraste, vários trabalhos em diversas espécies de ratos usando coração isolado²⁶ ou músculo papilar²⁷ indicaram alterações não

somente na tensão de repouso, mas também na contração e no relaxamento ativo. Tal discrepância entre os dados obtidos *in vivo* e aqueles *in vitro* sugerem a existência de mecanismos eficientes adaptativos que permitem a preservação da função cardíaca²⁶.

1.3. Remodelação Cardíaca – Aspectos Morfológicos

A remodelação ou remodelamento pode ser definido como variações moleculares, celulares e intersticiais cardíacas, que se manifestam por alterações no tamanho, na massa, na geometria e na função do coração, em resposta a uma determinada injúria²⁸.

Korecky e Rakusan²⁹, comparando miócitos hipertrofiados com miócitos normais provenientes de corações de igual peso, observaram que os hipertrofiados apresentaram volume cinco vezes maior em relação ao normal. Van Laarse e cols verificaram que o número de miócitos são iguais, tanto em coração com hipertrofia como em coração normal. Logo, a hipertrofia observada é decorrente do aumento da massa do miócito e não do número de miócitos³⁰.

Anversa e cols.³¹ constataram em tecido cardíaco e em miócitos de corações hipertrofiados diferenças a nível histológico e subcelular. A hipertrofia cardíaca pode ser atribuída, entre outros fatores, ao aumento das dimensões miocitárias, ao aumento de colágeno intersticial e à proliferação de tecido vascular^{5,32}. Quanto ao tecido vascular, estes autores observaram redução do volume luminal em relação à superfície dos capilares e, a nível subcelular, constataram redução potencialmente desfavorável do volume mitocondrial em relação ao volume das miofibrilas, o que possivelmente comprometeria a

mobilização e o fornecimento de energia para a demanda dos miócitos durante a contração frente à sobrecarga pressória.

Recentemente, foi evidenciado que a hiperplasia pode contribuir para a hipertrofia cardíaca^{33,34,35}.

1.4 Expressão dos Transportadores de Ca^{2+} no envelhecimento

A hipertrofia ventricular secundária à hipertensão arterial e/ou à senescência pode ser acompanhada de alteração na expressão da bomba de Ca^+ do Retículo Sarcoplasmático Ca ATPase (Serca 2a) e da fosfolambam (PLB), além de alteração funcional dos canais rianodínicos, contribuindo para o surgimento de disfunção miocítica e posterior falência cardíaca. Há evidências que a hipertensão arterial e a senescência são fatores que promovem a remodelação cardíaca com hipertrofia ventricular, fibrose miocárdica e alteração na homeostase do cálcio, que contribuem para a disfunção miocárdica³⁶.

O trânsito de cálcio (Ca^{2+}) intracelular é um dos principais mecanismos reguladores do ciclo de contração e relaxamento cardíaco³⁷. Enquanto a rápida elevação do Ca^{2+} citosólico induz a contração, sua diminuição provoca o relaxamento. A contração inicia-se com a abertura dos canais L sarcolemal, e influxo de Ca^{2+} que desencadeia liberação de grande quantidade de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS) pelos receptores rianodínicos. O aumento do Ca^{2+} citosólico possibilita a ligação desse íon com a troponina C (TnC) e a interação actina-miosina. A intensidade da contração depende da quantidade e da responsividade dos miofilamentos ao Ca^{2+} . O relaxamento inicia-se quando a concentração intracelular de Ca^{2+} é reduzida, principalmente, pela recaptação do Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático Ca^{2+} ATPase (Serca 2a). A função da Serca 2a é regulada pela fosfolambam (PLB) que, em

seu estado fosforilado, permite a recaptura do Ca^{2+} pela Serca 2a³⁷. O cálcio captado pelo RS é armazenado em altas concentrações em proteínas de estoque, como a calsequestrina (CSQ2), antes de ser novamente liberado pelos receptores rianodínicos (RyR). Outras proteínas, como o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e a bomba de Ca^{2+} do sarcolema participam da regulação do efluxo de Ca^{2+} do miocárdio. Desta forma, a atividade de diferentes canais e bombas e localizados no sarcolema e no RS regulam o trânsito de Ca^{2+} intracelular, modulam a contratibilidade e o relaxamento do miocárdio³⁷ (figura 1).

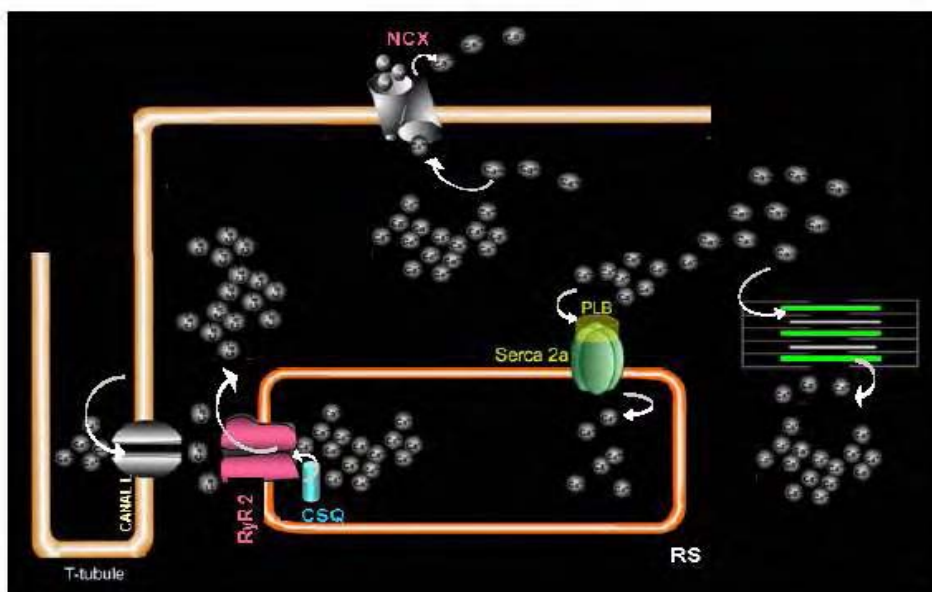


Figura1. Representação esquemática da mobilização de Ca^{2+} durante a contração e o relaxamento miocárdio. Serca 2a: ATPase de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático; PLB: fosfolambam; RyR: receptor rianodina; CSQ2: calsequestrina; NCX; trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e Canal L: canal lento de Ca^{2+} . Modificado de Aline Villa Nova Bacurau e Patrícia Brum, 2006.

No envelhecimento foi observada a diminuição dos níveis da atividade da bomba cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático (Serca 2a) que pode ocasionar uma lenta remoção do cálcio citoplasmático.

Níveis elevados ou aumento da atividade da fosfolambam, uma proteína inibidora da Serca 2a, pode também alentecer o relaxamento. O aumento dos níveis de Adenosina monofosfato cíclico (AMPc), resultante da estimulação beta-1 adrenérgica ou da inibição da fosfodiesterase cardíaca, promove a fosforilação da fosfolambam e, desta forma, remove seu efeito inibitório sobre a Serca 2a, tornando o relaxamento mais rápido³⁸. A Serca 2a é uma enzima dependente de energia e promove o relaxamento ativo do miócito. A hipertrofia patológica secundária à hipertensão arterial sistêmica ou à estenose aórtica resulta em redução da Serca 2a ou aumento da fosfolambam, contribuindo para o relaxamento anormal^{39,40}.

Segundo Nakayama e Cols⁴¹, a redução dos níveis de Serca 2a retroalimenta positivamente a sinalização da hipertrofia, na medida em que o Ca^{+} deixa de ser captado pelo Retículo Sarcoplasmático via Serca 2a, acumula-se no citosol e facilita maior ativação da proteína quinase C, importante na sinalização da hipertrofia, o que contribui para agravamento da hipertrofia e redução adicional dos níveis de Serca 2a⁴².

A cardiomiopatia hipertrófica⁴³ e o envelhecimento⁴⁴ diminuem os níveis da Serca 2a. Em corações senescentes e hipertensos de rato, a diminuição na velocidade contrátil observada *in vitro* é atribuída geralmente a um deslocamento da isomiosina que causa mudanças na atividade da ATPase da miosina^{13,16,10}. Entretanto, a velocidade e o relaxamento ativo dependem da disponibilidade do cálcio intracelular e obviamente de outras proteínas da membrana envolvidos nos movimentos do cálcio, incluindo o (NCX) e o receptor rianodínico.

Hipótese: A hipertensão arterial é um fator aditivo para a remodelação cardíaca e alteração da função ventricular no envelhecimento.

Objetivos

1. Avaliar a remodelação cardíaca em ratos hipertensos e a influência da idade sobre variáveis morfo-funcionais.
2. Avaliar a expressão gênica do ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) da fosfolambam, do receptor rianodínico e da SERCA 2a no miocárdio dos ratos SHR e WKY senescentes.

Métodos

Grupos experimentais

O presente trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em experimentação animal, estando em conformidade com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Protocolo n.510 de 17/11/2005).

Foram estudados oito grupos experimentais formados por ratos das cepas Wistar-Kyoto (WKY) e ratos espontaneamente hipertensos (SHR) com idades de 30 semanas WKY30 (n=09) e SHR30 (n=10), 45 semanas WKY45 (n=7) e SHR 45 (n=8), 60 semanas WKY60 (n=8) e SHR 60 (n=11) e 90 semanas WKY90 (n=10) e SRH 90 (n=17). Os animais foram mantidos em ambientes com controle de luz (ciclos de 12 horas) e temperatura constante de 25°C, recebendo dieta padrão e água *ad libitum*.

A pressão arterial sistólica dos ratos foi mensurada por método não invasivo com a utilização de monitor de medida de pressão caudal da Narco-Biosystem (Austin, Texas, USA), no período que precedeu a eutanásia dos animais.

Estudo da função ventricular em coração isolado: preparação de Langendorff

Os animais foram anestesiados com Tiopental sódico (50mg/kg, IP) e medicados com 2000UI de heparina, IP. A seguir foi efetuada a esternotomia mediana, com ventilação assistida, e dissecada a aorta ascendente. A aorta foi canulada e iniciada a perfusão retrógrada

com solução de Krebs-Henseleit à temperatura e a pressão constantes (37°C e 75 mmHg, respectivamente). O coração, conectado a cânula perfusora, foi rapidamente retirado e transferido para o aparato de perfusão de coração isolado tamanho 3, tipo 830 da Hugo Sachs Elektronik – (March-Hungstetten/Germany). A auricleta esquerda foi retirada para a introdução de balão de látex (volume aproximado de 40 microlitros) na cavidade ventricular esquerda. Esse balão, conectado ao transdutor de pressão P23XL, permitiu a aferição precisa do volume e da pressão ventricular durante todo o experimento. O estudo funcional consistiu dos seguintes passos:

- a) determinação do volume para obtenção de pressão ventricular diastólica nula (V0);
- b) a partir do V0 foram acrescentados, sucessivamente, 20 microlitros de água ao volume do balão até obter-se pressão diastólica de 25 mmHg. A cada acréscimo, foram registradas as curvas de pressão do VE e da primeira derivada temporal da pressão, utilizando-se um polígrafo da GOULD, modelo Windowgraf;
- c) a calibração dos traçados permitiu a aferição das pressões sistólicas e diastólicas do ventrículo esquerdo correspondentes aos diferentes volumes. A partir dos dados de pressão e volume foram construídas curvas de relação pressão-volume sistólica e diastólica.

As relações Stress-Strain sistólica e diastólica foram calculadas utilizando as seguintes fórmulas⁴⁵:

$$\text{Stress} = (1,36 \times PVE \times VVE^{2/3}) / [(VVE + 0,943MVE)^{2/3} - VVE^{2/3}]$$

$$\text{Strain} = \{ [VVE^{1/3} + (VVE + 0,943 \times MVE)^{1/3}] / [V0^{1/3} + (V0 + 0,943 \times MVE)^{1/3}] - 1 \} \times 100$$

nas quais PVE é pressão do ventrículo esquerdo; VVE é o volume do ventrículo esquerdo; MVE é a massa do ventrículo esquerdo. Stress é expresso em gramas/cm² e Strain em % de deformação do miocárdio.

- d) a complacência ventricular foi mensurada a partir da curva de relação pressão-volume diastólica, sendo determinada como a variação de volume necessária para elevar a pressão diastólica de zero a 20 mmHg (ΔV_{20});
- e) a rigidez passiva miocárdica foi mensurada a partir da curva de relação Stress-Strain diastólica e foi determinada como estresse diastólico necessário para provocar uma deformação de 20% (Stress_{20}).

Terminado o experimento, o coração foi retirado do aparato de perfusão e os ventrículos direito e esquerdo foram separados e pesados.

A solução de Krebs utilizada teve a seguinte composição (milimoles/litro): 118,5 NaCl; 4,69 KCl; 2,52 CaCl₂; 1,16 MgSO₄; 1,18 KH₂PO₄; 5,50 glicose e 25,88 NaHCO₃. Antes de sua utilização essa solução foi filtrada com filtro de acetato de celulose com poro de 5 micras. Durante a perfusão do coração a pressão parcial de oxigênio (PO₂) da solução foi mantida entre 550 e 600 mmHg por meio de contato da película de solução de Krebs com gás carbogênio (95% O₂, 5% CO₂).

Estudo Morfológico

Amostras de tecido cardíaco foram fixadas em solução tamponada de formol a 10% por período de 48 horas. Após a fixação, o tecido foi incluído em blocos de parafina, obtendo-se, a seguir, cortes histológicos coronais de 4 μ m para coloração com hematoxilina-eosina (HE). Cortes histológicos de 6 μ m foram corados pelo picro sirius red, específico para colágeno, para avaliação do interstício do miocárdio.

Os cortes histológicos corados pelo HE foram utilizados para análise da histologia e para aferição das áreas de secção transversa dos miócitos, empregando-se microscópio LEICA DM LS acoplado à câmara de vídeo que enviou imagem digital ao computador dotado de programa de análise de imagens Image Pro-plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA).

As lâminas coradas pelo picro sirius red foram utilizadas para a quantificação da fração de colágeno intersticial (CVF), por meio de vídeo densitometria. Imagens do tecido cardíaco foram capturadas por computador IBM compatível e analisadas por software de análise de imagens Image Pro-plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). Os elementos do tecido cardíaco foram identificados de acordo com os níveis de cor. Assim, as fibras colágenas aparecem vermelhas, os miócitos, amarelos, e os espaços, brancos. O perfil digitalizado foi analisado pelo computador que calcula o volume de fração do colágeno como a soma de toda área do tecido conectivo dividido pela soma da área de tecido conectivo e a área do miócito. Em média, foram analisados 30 campos com a utilização de objetiva 40X. O colágeno perivascular foi excluído da presente análise.

Avaliação da expressão gênica da Fosfolambam (PLB), Receptores rianodínicos (RyR), Serca 2a e Ciclofilina por Reação em Cadeia da Polimerase após Transcrição Reversa semi-quantitativo (RT - PCR)

Extração de RNA com TRIzol

Para a extração de RNA, o fragmento muscular do ventrículo esquerdo congelado no nitrogênio líquido foi homogeneizado em Polytron com TRIzol (1 mL de TRIzol/50-100 mg de tecido)¹⁵. Essa solução foi transferida para um tubo de 1,5 mL e incubada durante 5 minutos à temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos núcleo-protéicos. Após esse período, foram acrescentados 0,2 mL de clorofórmio por mL de TRIzol utilizado, homogeneizado vigorosamente e incubado novamente, por 3 minutos à temperatura ambiente. Após essa segunda incubação, o material foi centrifugado a 14.000 rpm por 15 minutos a 4 °C.

Para a precipitação do RNA, a fase aquosa formada após a centrifugação do material foi separada e precipitada por intermédio da incubação com 0,5 mL de isopropanol (por mL de TRIzol utilizado inicialmente) por 10 min, à temperatura ambiente. Após esse período, o material foi novamente centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O sedimento formado foi lavado com 1mL de etanol 75% (por mL de TRIzol utilizado inicialmente) e centrifugado a 7.500 rpm por 5 minutos a 4 °C. O sedimento de RNA formado ficou em temperatura ambiente por 10 minutos para secagem e foi ressuspenso em água ultrapura, incubado a 60 °C, por 10 min, para a inativação de qualquer possível resíduo de RNase. O RNA foi quantificado por espectrofotometria a 260 nm, utilizando-se o fator de correção próprio para o RNA (40) e o fator de diluição do RNA (70). Foi determinada, por espectrofotometria, a razão

entre 260 e 280 nm, o que nos forneceu uma estimativa da qualidade da extração (razão ≥ 1.65).

Gel analítico de agarose para RNA

Foi procedida a eletroforese (1 μ L da solução contendo o RNA total) em gel de agarose 1%, em tampão Tris 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1mM (TAE), a uma voltagem de 60 mV para analisar a integridade do RNA.

Validação do RT-PCR semi-quantitativo

Objetivando quantificar comparativamente a expressão gênica do Fosfolambam (PLB), Receptor Rianodina (RyR) e Serca 2a, foi validado o RT-PCR semi-quantitativo. Amostras de RNA total proveniente de animais controle foram utilizadas, a fim de que o RT-PCR semiquantitativo fosse validado para um grau de expressão semelhante ao das amostras a que foram posteriormente quantificadas.

Etapas da validação do RT-PCR semiquantitativo

- I. Determinação da temperatura de anelamento ideal para cada par de oligonucleotídeos iniciadores gene-específicos.
- II. Padronização do “PCR multiplex” (amplificação no mesmo PCR do gene alvo e do gene constitutivo ciclofilina, a ser utilizado como referência para a quantificação do gene alvo).

- III. Determinação do intervalo de sobreposição das fases de aumento linear das curvas de amplificação do gene alvo e do gene constitutivo, testando vários números de ciclos no PCR.

O RT-PCR semiquantitativo para o PLB, RyR e Serca 2a foi validado amplificando-se o gene alvo e o gene constitutivo ciclofina num mesmo tubo, uma vez que a combinação dos respectivos pares de oligonucleotídeos iniciadores se mostrou compatível com a amplificação simultânea (“multiplex”).

Transcrição reversa (RT) do RNA

A RT obtida do RNA do músculo cardíaco de cada amostra foi realizada utilizando-se os componentes do *Kit SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen, Brasil). Uma mistura contendo 1000 ng/ μ L de RNA total, 1 μ L de *dNTP mix* 10 mM, 1 μ L de “random hexamers” (50 ng/ μ L) e volume total ajustado com dietil pirocarbonato (H₂O DEPC) para 10 μ L foi incubada por 5 minutos a 65 °C e, em seguida, por pelo menos 1 minuto no gelo. Posteriormente, foi adicionado a essa mistura 9 μ L de uma solução contendo 2 μ L de tampão RT 10x, 4 μ L de MgCl₂ 25 mM, 2 μ L de DTT 0.1 M e 1 μ L de Inibidor de RNase Recombinante *RNaseOUTTM*. Após essa mistura de reação ser levemente agitada e incubada a 25 °C por 2 minutos, foi adicionado à reação 1 μ L da enzima *SuperScriptTM II RT* e a mistura foi novamente incubada por um período de 10 minutos a 25 °C, 50 minutos a 42°C e 15 minutos a 70°C. Posteriormente foi adicionado 1 μ L de RNase H para finalmente incubar essa mistura de reação por 20 minutos a 37 °C.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a realização da reação de PCR, alíquotas de 2 μL da reação de RT foram adicionadas a 48 μL de uma mistura contendo 38,1 μL de água autoclavada, 5 μL de tampão Taq polimerase 10X, 1 μL de dNTPs (10 mM), 1 μL de primer senso (10 μM), 1 μL de primer antisenso (10 μM) e 0,4 μL de Taq polimerase por amostra. Essa mistura foi incubada a 94 °C, por 2 minutos e as condições do PCR ajustadas para cada um dos primers utilizados.

Primers

Os oligonucleotídeos utilizados como primers (iniciadores) para a reação de PCR do produto de RT, do RNA total extraído do músculo cardíaco, para os genes dos canais de cálcio foram o PLB e a Serca 2a, como descrito por Mirit *et al* (1999)⁴⁶ e o RyR, como descrito por Coussin *et al* (2000)⁴⁷. Os primers utilizados para a reação de PCR, do produto da RT do RNA controle, foram os primers controles A e B, fornecidos pelo *kit*. Para a detecção de diferenças relativas na integridade das amostras de RNA individuais foi realizada a normalização da quantidade do produto da reação do transcrito do gene alvo com a quantidade de produto da reação do transcrito do gene da ciclofilina, utilizando os *primers* descritos por Alway *et al* 2002⁴⁸.

Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores:

PLB “sense”: 5' TAC CTT ACT CGC TCG GCT ATC 3'

PLB “antisense”: 5' CAG AAG CAT CAC AAT GAT GCA G 3'

Fragmento amplificado: 140 pb

RyR "sense": 5' GAA TCA GTG AGT TAC TGG GCA TGG 3'

RyR "antisense": 5' CTG GTC TCT GAG TTC TCC AAA AGC 3'

Fragmento amplificado: 635 pb

SERCA 2a "sense": 5' ATG AGA TCA CAG CTA TGA CTG GTG 3'

SERCA 2a "antisense": 5' GCA TTG CAC ATC TCT ATG GTG ACT AG 3'

Fragmento amplificado: 653 pb

CICLOFILINA "sense": 5' ACG CCG CTG TCT CTT TTC 3'

CICLOFILINA "antisense": 5' TGC CTT CTT TCA CCT TCC 3'

Fragmento amplificado: 440 pb

Análise Estatística

As variáveis estudadas apresentaram distribuição normal e foram apresentadas com médias e erros-padrão. As comparações da média entre os grupos foram efetuadas pela análise de variância de duas vias (ANOVA)⁴⁹ seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey⁵⁰, admitindo-se um nível de significância de 5%.

Foi realizada análise de correlação linear (coeficiente de correlação de Pearson) entre as variáveis estudadas e a idade, considerando-se as diferentes cepas, para um nível de significância 5%.

Resultados

Os resultados das variáveis estudadas estão demonstrados nas tabelas 1 a 4 de acordo com as cepas e idades.

Tabela 1. Média e o erro padrão da média das Variáveis Morfométricas e Pressão Arterial Caudal.

Cepas	PC (g)	PA (mmHg)	VE (g)	VE/PC (mg/g)	VD (g)
SHR 30 (n=10)	355±15	211±7	1,109±0,04	3,114±0,08	0,307±0,02
SHR 45 (n=8)	368±14	204±7	1,054±0,04	2,940±0,08	0,323±0,02
SHR 60 (n=11)	371±13	206±6	1,246±0,03	3,354±0,07	0,312±0,02
SHR 90 (n=17)	397±12	169±5	1,315±0,03	3,308±0,06	0,285±0,01
WKY 30 (n=9)	470±18	133±8	0,968±0,05	2,070±0,09	0,302±0,02
WKY 45 (n=7)	513±15	122±7	1,026±0,04	2,010±0,08	0,360±0,02
WKY 60 (n=8)	482±17	109±7	1,068±0,05	2,240±0,09	0,454±0,02
WKY 90 (n=10)	604±31	132±5	1,159±0,03	1,927±0,06	0,334±0,01
<i>Fator</i>	<i>Valor do p</i>	<i>Valor do p</i>	<i>Valor do p</i>	<i>Valor do p</i>	<i>Valor do p</i>
<i>Cepa</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>Idade</i>	<0,001	0,009	<0,001	0,001	<0,001
<i>Cepa x Idade</i>	<0,001	<0,001	0,275	0,008	0,004
<i>Cepa</i>			SHR>WKY		
<i>Idade</i>			90>30 90>45 90>60 60>30 60<45		
<i>Cepa x Idade</i>	WKY90>WKY30 WKY90>WKY60 WKY90>WKY45 WKY30>SHR30 WKY45>SHR45 WKY60>SHR60 WKY90>SHR90	SHR30>SHR90 SHR60>SHR90 SHR45>SHR90 SHR30>WKY30 WKY90>WKY60 SHR45>WKY45 SHR60>WKY60 SHR90>WKY90		SHR60>SHR45 SHR90>SHR45 WKY60>WKY90 SHR30>WKY30 SHR45>WKY45 SHR60>WKY60 SHR90>WKY90	WKY60>WKY30 WKY60>WKY90 WKY60>WKY45 WKY60>SHR60 WKY90>SHR90

PC; Peso Corporal; PA: Pressão Arterial Caudal; VE: Peso do Ventrículo Esquerdo; VE/PC: Peso Ventrículo Esquerdo corrigido pelo peso corporal; VD: peso do Ventrículo Direito; Análise de variância de duas vias, seguido de teste de comparação múltiplas de Tukey, considerando-se os fatores cepas, idade e a interrelação cepa x idade.

Tabela 2. Média e erro padrão da média das variáveis obtidas pelo estudo do coração isolado e da variável VD/PC

Cepas	VD/PC (mg/g)	VO (μ L)	VE/VO (mg/ μ L)	dp/dt pos (mmHg/s)	dp/dt neg (mmHg/s)
SHR 30 (n=10)	0,855 \pm 0,05	196,8 \pm 13	5,687 \pm 0,5	4581 \pm 219	1958 \pm 88
SHR 45 (n=8)	0,894 \pm 0,05	208,0 \pm 15	5,470 \pm 0,5	5259 \pm 245	2260 \pm 99
SHR 60 (n=11)	0,842 \pm 0,04	175,7 \pm 13	7,143 \pm 0,4	3867 \pm 209	2091 \pm 85
SHR 90 (n=17)	0,717 \pm 0,04	154,7 \pm 10	8,880 \pm 0,4	3632 \pm 168	1875 \pm 68
WKY 30 (n=9)	0,653 \pm 0,06	176,7 \pm 16	5,518 \pm 0,7	3800 \pm 244	1680 \pm 99
WKY 45 (n=7)	0,706 \pm 0,05	220,8 \pm 16	4,672 \pm 0,7	3661 \pm 261	1687 \pm 106
WKY 60 (n=8)	0,961 \pm 0,06	281,7 \pm 15	3,910 \pm 0,7	2555 \pm 244	1375 \pm 99
WKY 90 (n=10)	0,575 \pm 0,05	200,9 \pm 10	7,408 \pm 0,5	3208 \pm 199	1917 \pm 81
<i>Fator</i>	<i>Valor do p</i>	<i>Valor do p</i>	<i>Valor do p</i>	<i>Valor do p</i>	<i>Valor do p</i>
<i>Cepa</i>	0,004	<0,001	<0,003	<0,001	<0,001
<i>Idade</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,079
<i>Cepa x Idade</i>	0,005	<0,001	0,010	0,037	<0,001
<i>Cepa</i>					
<i>Idade</i>					
<i>Cepa x Idade</i>	SHR45>SHR90 WKY60>WKY90 WKY60>WKY30 WKY60>WKY45 SHR30>WKY30 SHR45>WKY45 SHR90>WKY90	SHR45>SHR90 SHR30>SHR90 WKY60>WKY30 WKY60>WKY45 WKY60>WKY90 WKY90>WKY30 WKY60>SHR60 WKY90>SHR90	SHR90>SHR45 SHR90>SHR30 WKY90>WKY60 WKY90>WKY45 SHR60>WKY60 SHR90>WKY90	SHR45>SHR90 SHR45>SHR60 SHR30>SHR90 WKY30>WKY60 WKY45>WKY60 SHR30>WKY30 SHR45>WKY45 SHR60>WKY60	SHR45>SHR90 WKY90>WKY60 SHR30>WKY30 SHR45>WKY45 SHR60>WKY60

VD/PC: peso do ventrículo direito corrigido pelo peso corporal; VO: volume VE para pressão de 0 mmHg; VE/VO; pressão diastólica nula; dp/dt pos: Velocidade máxima de elevação da pressão do Ventrículo esquerdo; dp/dt neg: Velocidade máxima de decréscimo da pressão do ventrículo esquerdo. Análise de variância de duas vias, seguido de teste de comparação múltiplas de Tukey, considerando-se os fatores cepas, idade e a interrelação cepa x idade.

Tabela 3. Médias e erro padrão da média das variáveis de função sistólica e diastólica, obtidas pelo estudo do coração isolado.

Cepas	R PV sist (mmHg/mL)	R SS sist (g/cm ² /%)	ΔV_{20} (μ L)	Stress20 (g/cm ²)
SHR 30	443±46 (n=10)	6,4±0,3 (n=10)	77±9 (n=9)	6,84±0,59 (n=9)
SHR 45	179±51 (n=8)	5,3±0,4 (n=8)	125±10 (n=8)	8,61±0,63 (n=8)
SHR 60	248±44 (n=11)	5,2±0,3 (n=11)	121±9 (n=9)	9,44±0,60 (n=9)
SHR 90	175±35 (n=17)	4,4±0,2 (n=17)	129±6 (n=12)	13,18±0,51 (n=12)
WKY 30	634±52 (n=9)	5,5±0,4 (n=9)	49±10 (n=8)	5,44±0,63 (n=8)
WKY 45	420±55 (n=7)	6,8±0,4 (n=7)	84±7 (n=7)	7,11±0,45 (n=7)
WKY 60	242±52 (n=8)	6,6±0,4 (n=8)	147±10 (n=9)	8,42±0,60 (n=8)
WKY 90	304±42 (n=10)	5,6±0,3 (n=10)	104±9 (n=9)	11,41±0,60 (n=9)
Fator	Valor do p	Valor do p	Valor do p	Valor do p
Cepa	<0,001	0,001	0,014	<0,001
Idade	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Cepa x Idade	0,082	<0,001	0,006	0,933
Cepa	WKY>SHR			SHR>WKY
Idade	30>90 30>60 30>45			90>30 90>45 90>60 60>30 45>30
Cepa x Idade		SHR30>SHR90 SHR30>SHR60 SHR30>SHR45 WKY45>WKY30 WKY45>WKY90 SHR30>WKY30 WKY45>SHR45 WKY60>SHR60 WKY90>SHR90	WKY60>WKY30 WKY60>WKY45 WKY60>WKY90 WKY90>WKY30 WKY45>WKY30 SHR90>SHR30 SHR45>SHR30 SHR60>SHR30 SHR45>WKY45	

R PV sist:Relação Pressão-Volume Sistólica

R SS sist:Relação Stress-Strain sistólica

ΔV_{20} :Volume ventricular necessário para elevar a pressão diastólica de 0 a 20 mmHg.

Stress20: stress diastólico para Strain de 20%.

Análise de variância de duas vias, seguido de teste de comparação múltiplas de Tukey, considerando-se os fatores capas, idade e a interrelação cepa x idade.

Tabela 4. Média e erro padrão da média das variáveis morfológicas do ventrículo esquerdo e da expressão de RNAm.

Cepas	CVF (%)	ASM (μ^2)	Serca 2a	Rianodina	Fosfolambam
SHR 30	7,3±0,009	214±9,1	3,07±0,27 (n=3)	2,57±0,34 (n=3)	1,22±0,13 (n=3)
SHR 45	7,62±0,009	198±8,2	2,57±0,35 (n=3)	2,64±0,44 (n=3)	1,09±0,16 (n=3)
SHR 60	7,45±0,008	193±8,2	3,04±0,35 (n=3)	2,40±0,44 (n=3)	1,43±0,16 (n=3)
SHR 90	7,22±0,008	270±6,1	3,354±0,30	2,265±0,38	1,097±0,14
WKY 30	2,01±0,009	205±9,2	5,28±0,35 (n=3)	2,27±0,44 (n=3)	1,66±0,16 (n=3)
WKY 45	2,87±0,009	143±8,1	3,70±0,35 (n=3)	1,42±0,44 (n=3)	1,11±0,16 (n=3)
WKY 60	2,48±0,009	132±8,1	3,76±0,35 (n=3)	1,91±0,43 (n=3)	1,057±0,16 (n=3)
WKY 90	4,07±0,005	240±6,9	2,85 ±0,35	2,55±0,43	1,047±0,16
<i>Fator</i>	<i>Valor do p</i>	<i>Valor do p</i>	<i>Valor do p</i>	<i>Valor do p</i>	<i>Valor do p</i>
<i>Cepa</i>	<0,001	<0,001	0,001	0,166	0,932
<i>Idade</i>	0,663	<0,001	0,012	0,743	0,080
<i>Cepa x Idade</i>	0,534	0,016	0,005	0,389	0,088
<i>Cepa</i>	SHR>WKY				
<i>Idade</i>					
<i>Cepa x Idade</i>		SHR90>SHR60 SHR90>SHR45 SHR90>SHR30 WKY90>WKY60 WKY90>WKY45 WKY90>WKY30 WKY30>WKY60 WKY30>WKY45 SHR45>WKY45 SHR60>WKY60 SHR90>WKY90	WKY30>WKY90 WKY30>WKY45 WKY30>WKY60 WKY30>SHR30 WKY45>SHR45		

Análise de variância de duas vias, seguido de teste de comparação múltiplas de Tukey, considerando-se os fatores capas, idade e a interrelação cepa x idade

CVF: fração de colágeno intersticial; ASM: área seccional do miócito.

Os ratos WKY apresentaram peso corporal maiores que os SHR. Houve aumento progressivo do peso corporal com a idade, no grupo SHR ($r=0,98$; $p=0,015$). Nos ratos WKY não foi observado o ganho de peso correlacionado com a idade (Figura 2), embora os ratos apresentassem maior peso corporal.

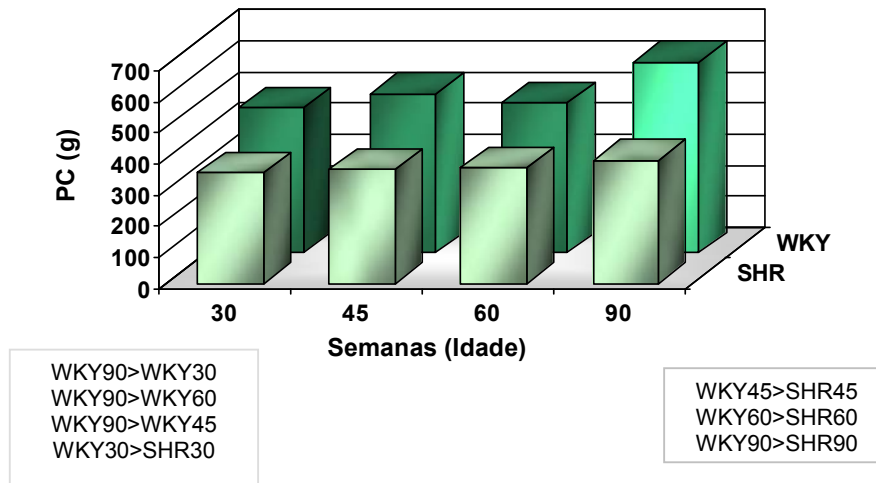


Figura 2. Peso corporal em gramas de acordo com a idade representada pela média; comparações entre os grupos foram efetuadas pela análise de variância de duas vias, seguida de teste de comparação múltiplas de Tukey.

A pressão arterial, como esperado, foi maior na cepa SHR em relação ao WKY; houve uma tendência de queda da PA com o envelhecimento nos grupos SHR. No grupo SHR90, a PA foi significativamente menor em comparação aos ratos SHRs dos grupos 60, 45 e 30 semanas de idade (Figura 3).

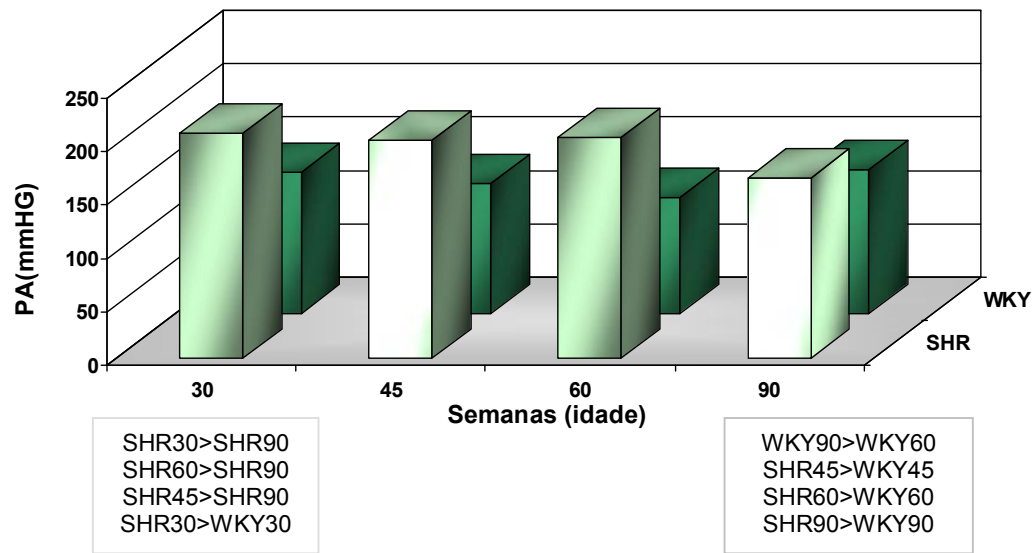


Figura 3. Média da pressão arterial sistólica de acordo com a cepa e idade.

Comparados aos ratos WKY, os SHRs apresentaram maior peso do ventrículo esquerdo (VE) (Figura 4), em todas as idades dos grupos estudados. Nos animais não hipertensos (WKY), o peso do VE aumentou com a idade ($r=0,998$; $p=0,02$). Não foi observada interação entre cepa e idade para o peso do ventrículo esquerdo. A relação VE/PC (Figura 5) foi maior nos SHRs em relação aos WKYs, evidenciando hipertrofia do VE nos ratos da cepa SHR.

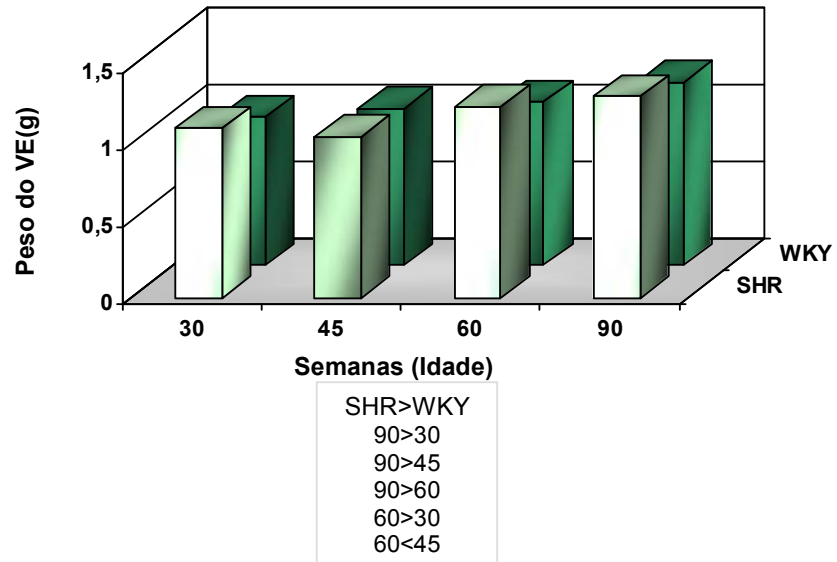


Figura 4. Peso do ventrículo esquerdo (VE), média dos grupos estudados.

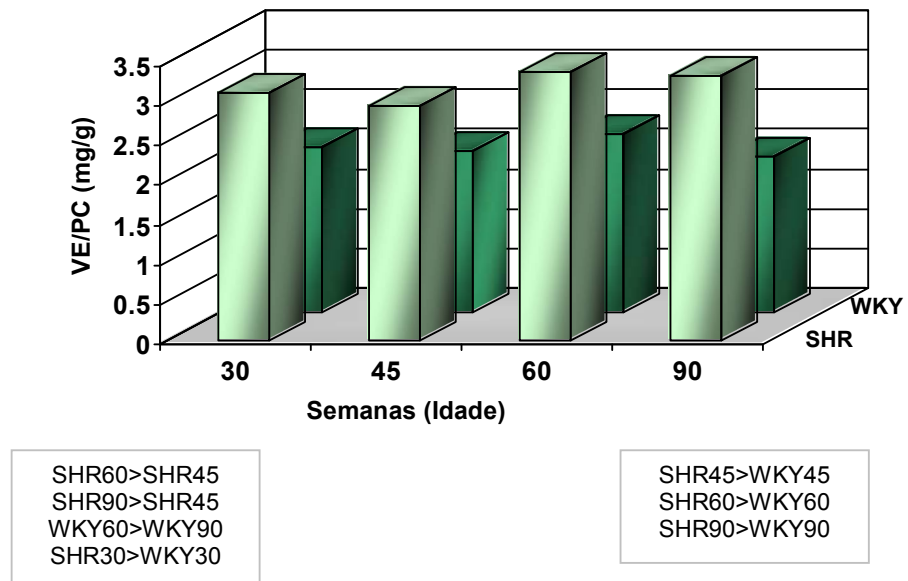


Figura 5. Relação entre pesos do ventrículo esquerdo e peso corporal dos grupos experimentais.

Não houve correlação com o envelhecimento, tanto no grupo SHR como no WKY. Nos ratos hipertensos o VE/PC foi maior nos idosos, enquanto que, nos não hipertensos, os idosos WKY90 apresentaram menor relação VE/PC que os WKY60.

O peso do VD foi maior nos ratos WKY quando comparados aos SHRs (Figura 6). O peso do VD no grupo WKY 60 foi maior que as outras idades. No entanto, ao corrigir para o peso corporal (VD/PC) evidencia-se maior peso do VD corrigido no grupo SHR com influência da idade (Figura 7).

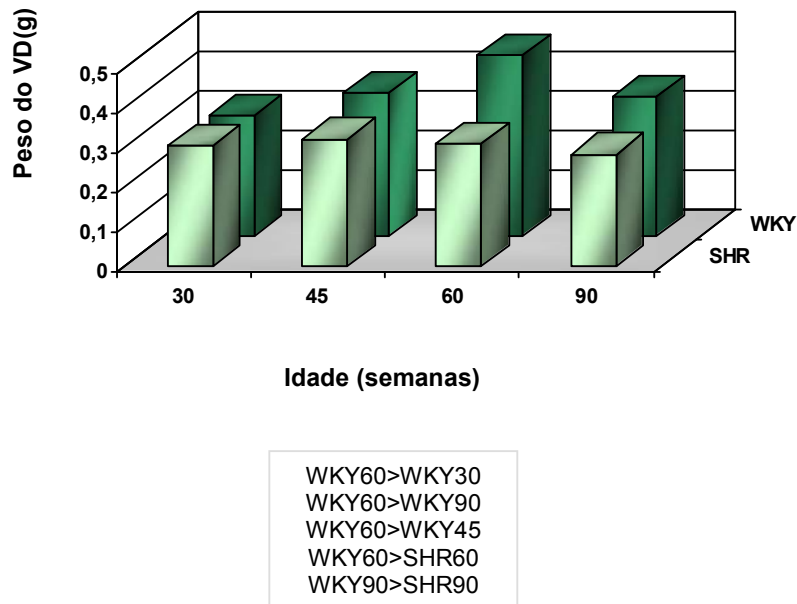


Figura 6. Peso do ventrículo direito (VD), médias dos grupos de acordo com a cepa e as idades.

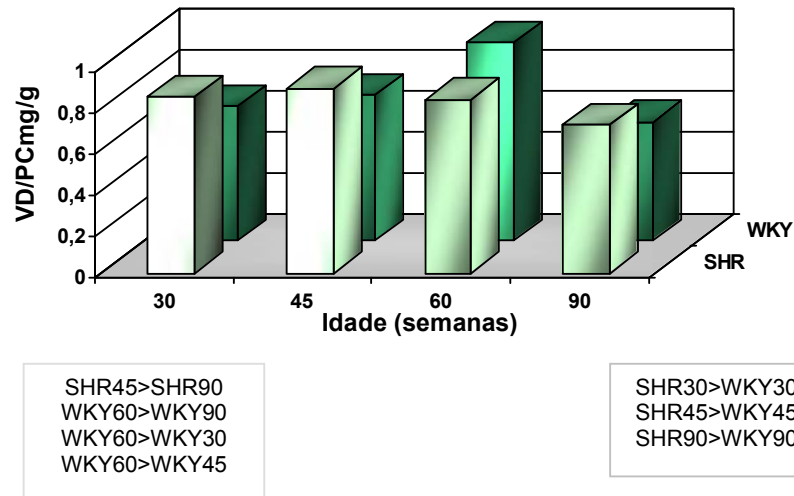
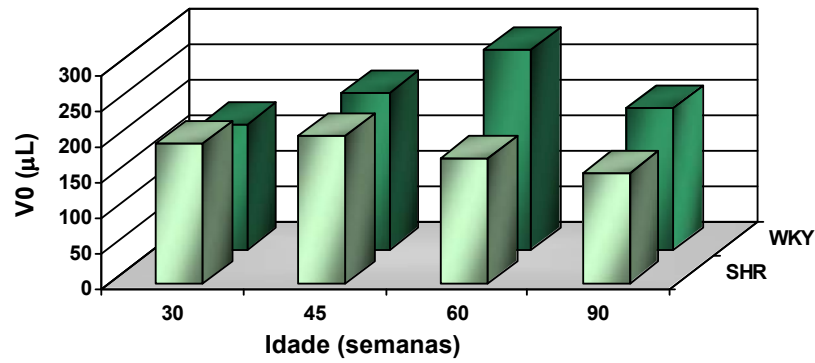


Figura 7. Relação do peso do ventrículo direito (VD) e peso corporal, médias dos grupos estudados.

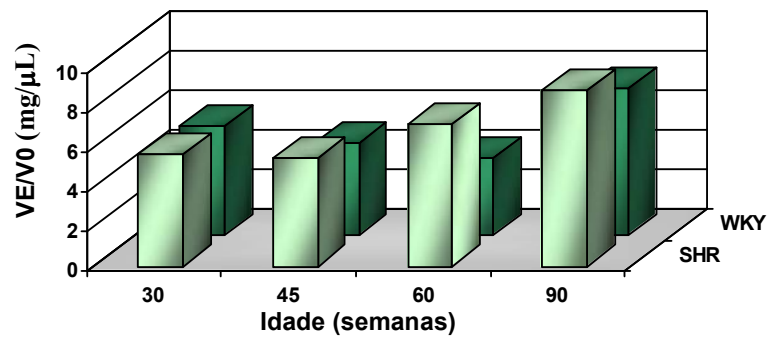
A geometria ventricular, mensurada pelos índices V_0 (Figura 8) e VE/V_0 (Figura 9), foi diferente entre as cepas. O V_0 foi maior no WKY em relação ao SHR. No grupo WKY, os ratos idosos de 90 semanas mostraram V_0 maior que os de 30 semanas e o WKY60 foi significamente maior que os outros grupos. No grupo SHR90, o V_0 foi significamente menor que nos grupos SHR30 e SHR45. A relação VE/V_0 foi significamente maior na cepa SHR mostrando a presença de hipertrofia concêntrica no SHR e esta hipertrofia concêntrica no SHR aumentou linearmente com a idade ($r=0,95$, $p=0,045$).



SHR45>SHR90
SHR30>SHR90
WKY60>WKY30
WKY60>WKY45

WKY60>WKY90
WKY90>WKY30
WKY60>SHR60
WKY90>SHR90

Figura 8. Médias do volume diastólico para a pressão diastólica de 0 mmHg (V_0) dos grupos estudados.



SHR90>SHR45
SHR90>SHR30
WKY90>WKY60

WKY90>WKY45
SHR60>WKY60
SHR90>WKY90

Figura 9. Média da relação peso do ventrículo esquerdo e V_0 dos grupos estudados.

No grupo WKY, os ratos de 90 semanas apresentaram valores maiores da relação VE/V0 que os ratos de 45 semanas e 60 semanas.

A derivada negativa ($-dp/dt$) (Figura 10) foi significativamente menor na cepa WKY em relação ao SHR. Em relação à idade, SHR45 foi maior que SHR90 e o WKY90 foi significativamente maior que o WKY60.

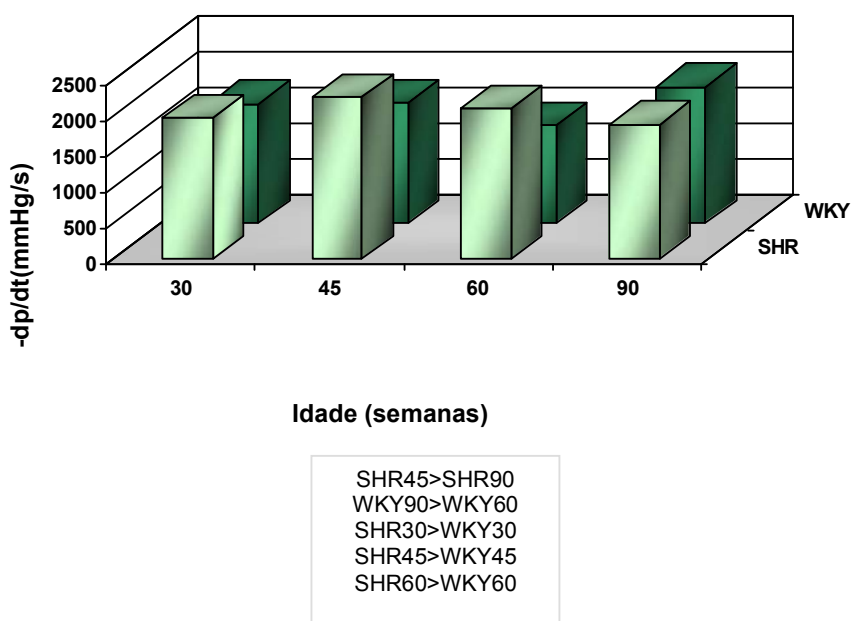


Figura 10. $-dp/dt$ de acordo com a cepa e idade.

As variáveis de função sistólica apresentadas em nosso trabalho foram a derivada positiva ($+dp/dt$) (Figura 11), a relação pressão-volume sistólica (Figura 12) e a relação estresse-deformação sistólica (Figura 13).

A derivada positiva ($+dp/dt$) foi significativamente maior no SHR em relação ao WKY e dentro das cepas a $+dp/dt$ do grupo SHR45 foi maior que o dos SHR60 e SHR90. No grupo SHR30, a $+dp/dt$ foi maior que no SHR90. A $+dp/dt$ no grupo WKY60 foi menor que WKY30 e

WKY45 (Figura 11). Portanto, a $+dp/dt$ foi maior nos ratos hipertensos e esta derivada decaiu com a idade nos dois grupos, independentemente da presença de hipertrofia ventricular.

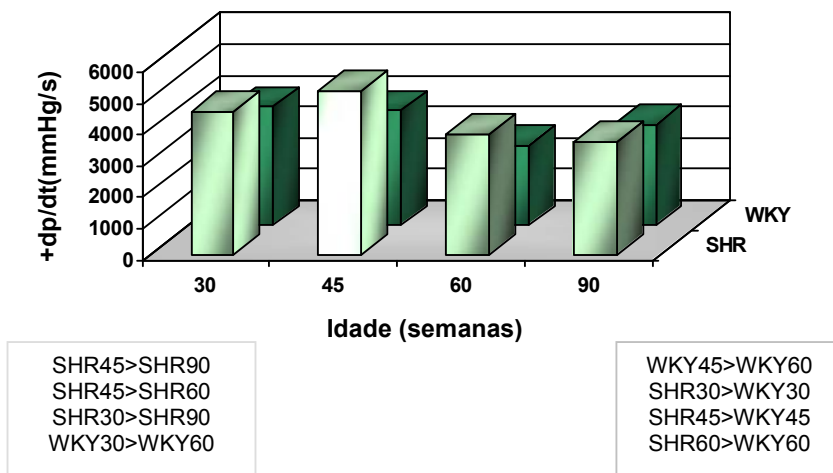


Figura 11. $+dp/dt$ de acordo com a cepa e idade.

A relação pressão-volume sistólico foi estatisticamente diferente entre as cepas SHR e WKY. Foi observada diminuição da relação pressão-volume sistólico (RPVsist) com a idade (Figura12). Os animais com idade 30 semanas apresentaram RVPsist maior que todas as outras idades (Figura 12).

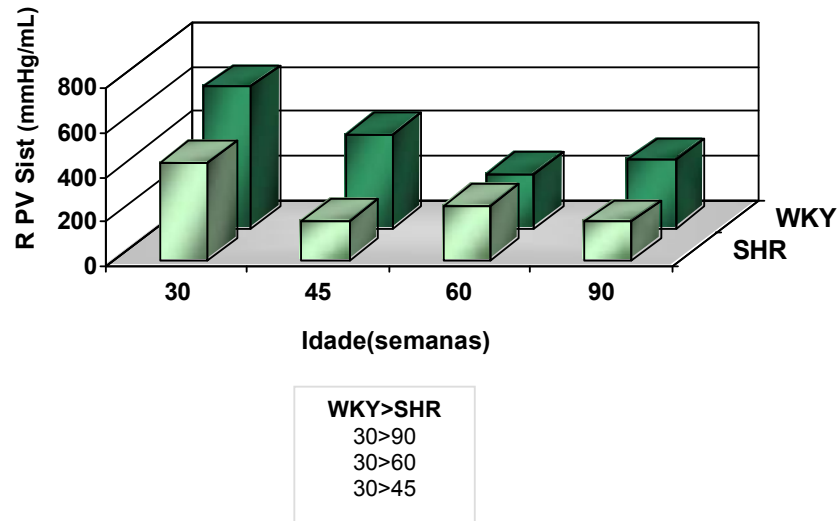


Figura 12. Relação PV Sistólica de acordo com a cepa e idade.

A relação "Stress-Strain (RSSsist) foi estatisticamente menor no SHR em relação ao WKY, exceto para a idade de 30 semanas (Figura 13). No grupo SHR os ratos com 30 semanas apresentaram maior RSSsist que os ratos de 45, 60, e 90 semanas de idade. Na cepa WKY os ratos de 45 semanas apresentaram RSSsist maiores que os ratos de 30 e 90 semanas de idade (Figura 12).

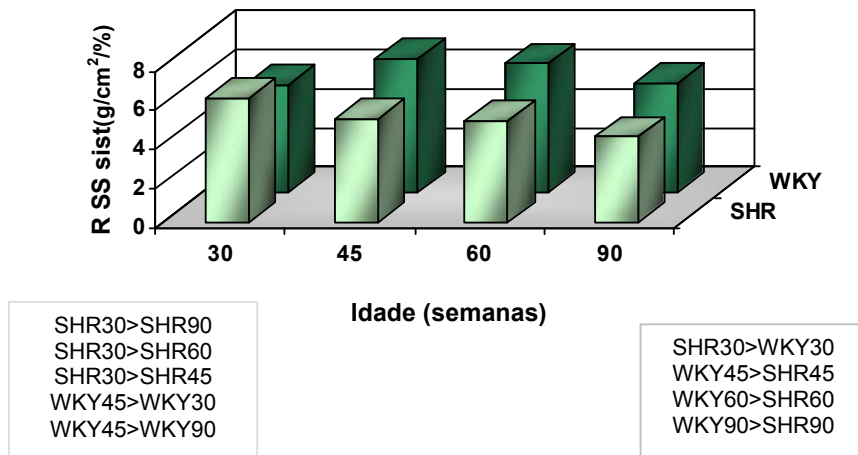


Figura 13. Relação Estresse - Deformação Sistólica.

Não foi observada interação entre cepa e idade para a variável Strain_{20} . Considerando-se as cepas, o grupo SHR apresentou Strain_{20} significativamente maior que o grupo WKY. Houve aumento progressivo do Strain_{20} com aumento da idade (Figura 14) e o teste de correlação de Pearson mostrou $r=0,997$ e $p=0,003$.

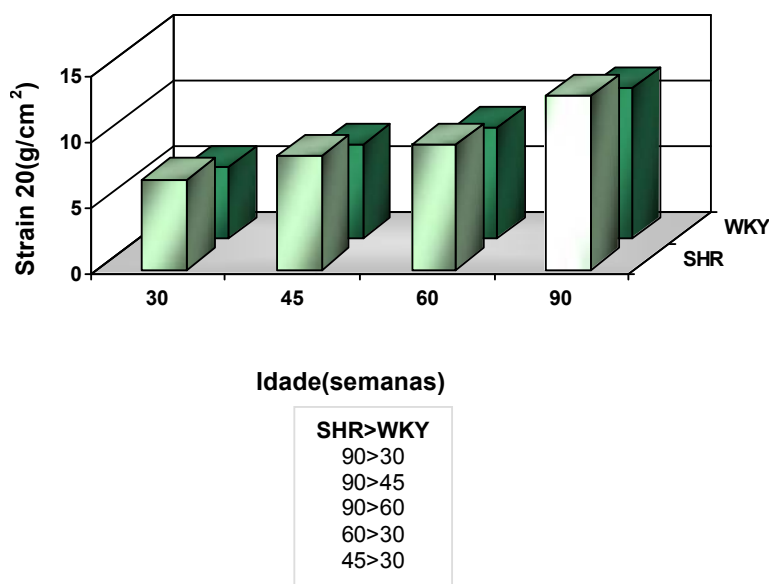


Figura 14. Rigidez passiva miocárdica mensurada pelo Strain_{20} de acordo com a cepa e a idade.

Foi observada interação entre cepa e idade para a variável ΔV_{20} (Figura 15). A complacência ventricular, mensurada pelo ΔV_{20} , foi significativamente maior nos animais idosos, tanto no grupo SHR (SHR90 > SHR30, SHR45 > SHR30 e SHR60 > SHR30), como no grupo WKY (WKY90 > WKY30, WKY45 > WKY30 e WKY60 > WKY30, WKY45 e WKY90). Logo, foi observado aumento da complacência ventricular com o envelhecimento dos animais em ambas as cepas.

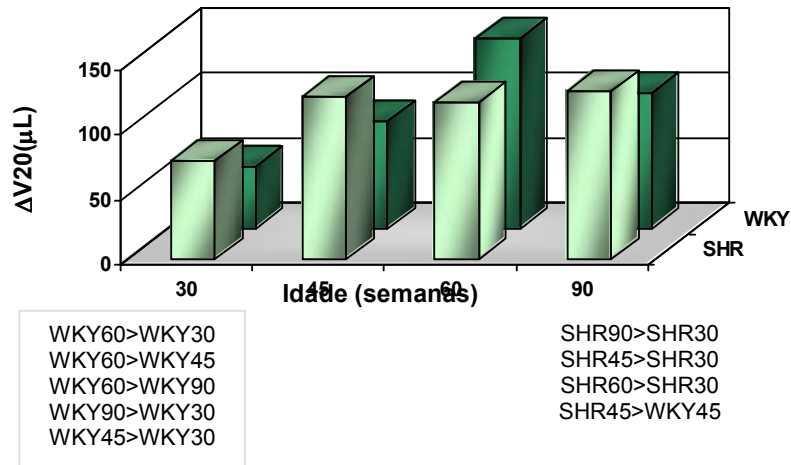


Figura 15. Complacência ventricular mensurada pelo ΔV_{20} de acordo com cepa e idade.

A fração de colágeno intersticial (CVF) foi maior nos ratos da cepa SHR em relação à cepa WKY (Figura 16). A idade não alterou a quantidade de colágeno e não houve interação entre cepa e idade.

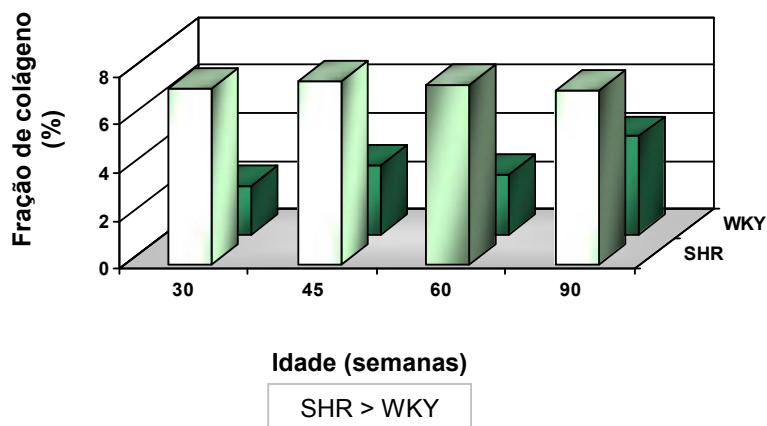


Figura 16. Médias da fração de colágeno (CVF) dos grupos estudados.

A área celular (ASM) foi maior nos ratos da cepa SHR em relação ao WKY, exceto na idade 30 semanas (figura 17). No WKY houve aumento da área celular do WKY90 em relação aos outros grupos e WKY30 foi maior que os WKY45 e WKY60. No grupo SHR, os ratos de 90 semanas de idade apresentaram área celular maior que os animais de outras idades.

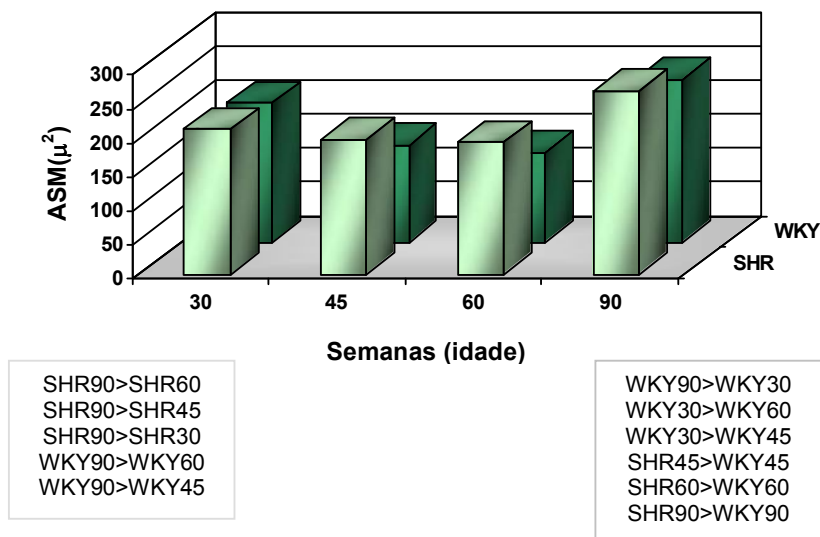


Figura 17. Médias e erro-padrão da área celular dos grupos estudados.

A expressão da Serca 2a foi significativamente maior na cepa WKY em relação ao SHR (Figura 18). Nos ratos da cepa SHR não houve alteração com o envelhecimento. Na cepa WKY, os ratos de 30 semanas de idade apresentaram maior expressão que os ratos de 45, 60 e 90 semanas de idade (Figura 19).

As expressões de RNAm dos canais de rianodínicos (Figura 20) e fosfolambam (Figura 21) não foram estatisticamente diferentes entre as cepas e idades.

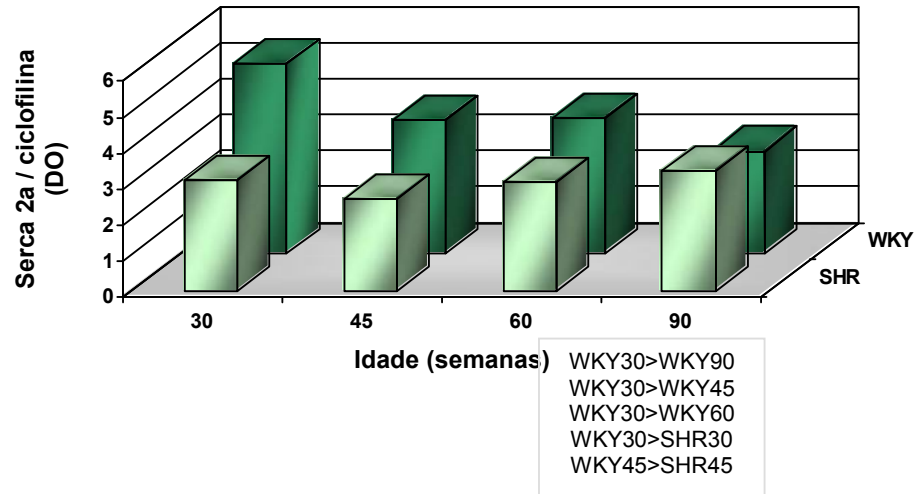


Figura 18. Serca 2a e média dos grupos estudados.

Serca 2a

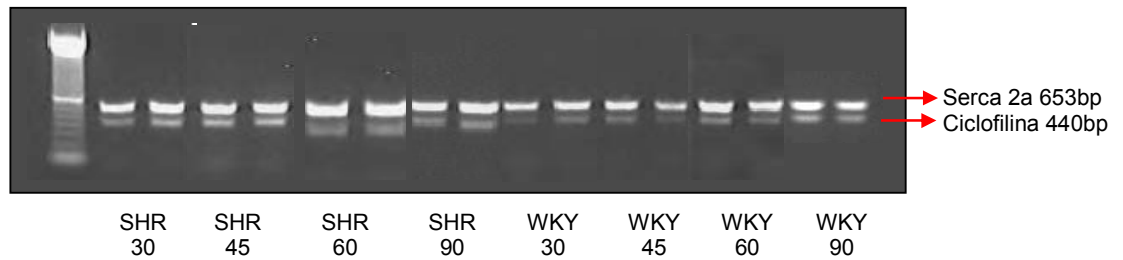


Figura 19. Foto do corte de gel com bandas eletroforéticas de RNAm para Serca 2a dos grupos SHR (hipertensos) e WKY (controles).

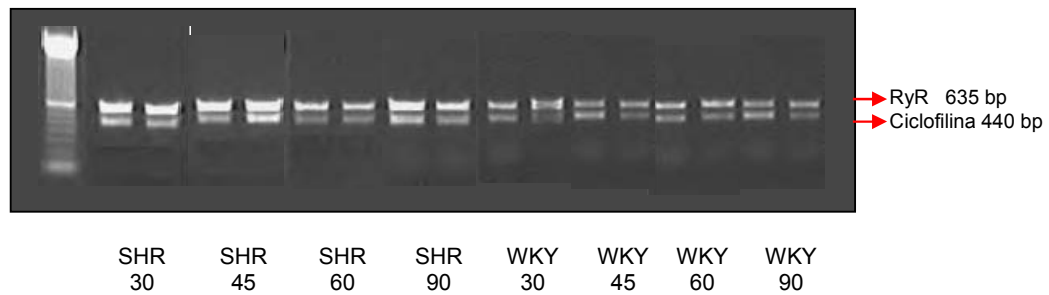
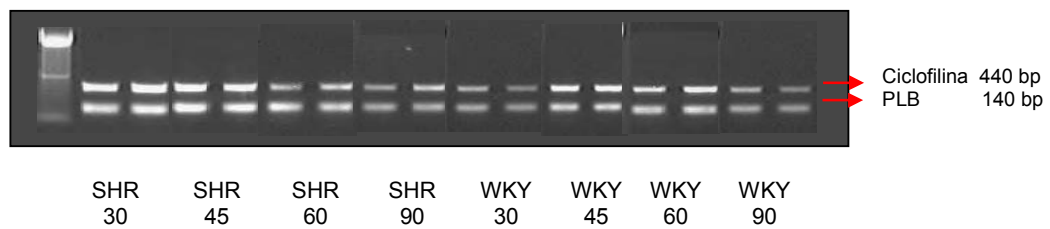
Rianodina

Figura 20. Foto do corte de gel com bandas eletroforéticas de RNAm para Receptores Rianodínicos (RyR) dos grupos SHR (hipertensos) e WKY (controles).

Fosfolambam

.Figura 21. Foto do corte de gel com bandas eletroforéticas de RNAm para fosfolambam (PLB) dos grupos SHR (hipertensos) e WKY (controles).

Discussão

Considerando-se a importância clínica da hipertensão arterial sobre o processo de remodelação cardíaca, este projeto teve como intuito a análise do efeito da idade sobre as variáveis morfo-funcionais e sobre a expressão de genes de proteínas que regulam a contração, ou a homeostase do cálcio nas cepas de animais Wistar-Kyoto (WKY) e em ratos espontaneamente hipertensos (SHR).

Modelos experimentais têm sido largamente utilizados em estudos sobre a fisiopatologia da remodelação cardíaca induzida pela hipertensão arterial. O SHR é o animal geneticamente hipertenso, que mais se aproxima da hipertensão arterial essencial humana³⁶, pois apresenta características similares como aumento da resistência periférica total, débito cardíaco normal, volemia normal ou levemente reduzida e progressiva hipertrofia ventricular esquerda⁵¹. Eram animais da cepa Wistar Kyoto que, ao apresentarem hipertensão arterial, foram sucessivamente selecionados por endocruzamento dos portadores de hipertensão arterial⁵². Os SHRs começam a desenvolver aumento de pressão arterial entre 6 e 8 semanas de vida, apresentado um nível de pressão considerada como hipertensão arterial entre 12 e 14 semanas^{53,54}, atingindo um platô entre a 20^a e 28^a semanas⁷. Embora geneticamente sejam consideradas semelhantes, verificamos diferenças no peso corporal entre as cepas (Tabela 3; figura 1). Foi observado menor peso corporal nos ratos SHRs em comparação aos WKYs. Esta diferença também foi previamente observada por outros pesquisadores^{55,56}. É possível que o menor peso observado na cepa SHR seja decorrente da hipertensão arterial crônica que compromete vasos e sistemas⁵⁷. Apesar de o peso corporal final no SHR ser menor que o controle WKY, o ganho de peso na cepa SHR ocorre linearmente com a idade ($r=0,94$; $p=0.015$), fato este não observado no grupo WKY.

A hipertensão arterial, presente na cepa SHR, foi a principal responsável pela hipertrofia ventricular esquerda. No coração, o

aumento da massa do VE nos ratos SHR e relação VE/PC e a área celular dos miócitos refletem o crescimento do cardiomiócito quando comparados aos ratos WKY. Por conseqüência, os nossos resultados mostram a presença de hipertrofia ventricular em decorrência da sobrecarga pressória secundária à hipertensão arterial nos animais SHR. Em ambas as cepas, observamos aumento da massa com o envelhecimento para as variáveis VE e ASM. Portanto, mesmo na cepa WKY, o envelhecimento contribui para a hipertrofia ventricular.

O peso do VD e a relação VD/PC não acompanharam a tendência do VE. O peso do VD na cepa SHR manteve-se constante com o envelhecimento e na cepa WKY o peso do VD acompanhou o ganho de peso corporal com o aumento da idade. Estes dados mostram que a câmara ventricular direita, não submetida à sobrecarga, não apresenta hipertrofia correspondente.

O volume ventricular para pressão diastólica de 0 mmHG (V0) foi menor no grupo SHR, mostrando redução da cavidade ventricular. A redução do volume ventricular, associada ao aumento de sua massa, é característica da hipertrofia concêntrica. A hipertrofia concêntrica é um mecanismo compensatório à situação de sobrecarga de pressão crônica. Os estímulos para a hipertrofia são múltiplos e os principais são os estímulos mecânicos que ativam a via “Mitogen-activated Protease” Kinase (MAPK)⁵⁸, promovendo maior síntese protéica.

A hipertrofia concêntrica, mensurada pela variável VE/V0, foi evidente nos animais SHR hipertensos, em comparação ao seu controle genético WKY, e também mais evidente nos ratos idosos. Assim, há efeito aditivo da hipertensão arterial e da idade na hipertrofia concêntrica. Estes dados são consistentes com os observados por outros pesquisadores: o aumento da cavidade ventricular é fenômeno evolutivo

que ocorre quando surge a insuficiência cardíaca. Em nossa casuística, não foram estudados animais que desenvolveram insuficiência cardíaca, o que justifica a ausência de dilatação ventricular nos animais idosos hipertensos (SHR) ou não (WKY).

A remodelação ventricular é um processo adaptativo e contínuo a estímulos mecânicos ou neurohumorais que atuam sobre o coração. Os principais estímulos mecânicos são a sobrecarga de volume e a sobrecarga de pressão. A primeira promove hipertrofia ventricular com dilatação ventricular, caracterizando a hipertrofia excêntrica. A segunda é caracterizada pela hipertrofia ventricular e diminuição da cavidade ventricular, remodelação esta denominada de hipertrofia concêntrica.

As características morfométricas do grupo SHR mostraram que os ratos hipertensos apresentam remodelação cardíaca com características de hipertrofia concêntrica.

A função cardíaca possui vários índices de avaliação que são compreensíveis e aceitos como indicadores da função sistólica. Dentre eles citamos a pressão sistólica máxima, velocidade máxima de ascensão da pressão sistólica na unidade de tempo ($+dp/dt$), elastância sistólica máxima (E_{max}), derivada da relação pressão-volume sistólica e o coeficiente da relação Stress-Strain sistólica.

A variável $+dp/dt$ foi maior no coração hipertrofiado (SHR) mostrando que a massa muscular contribui para o aumento da velocidade de geração de força. No entanto, ao analisarmos a função do ventrículo pelo coeficiente de inclinação pressão-volume sistólica, observamos menor função ventricular sistólica do SHR em comparação com o grupo controle WKY. Isto sugere que a hipertrofia ventricular associa-se à disfunção sistólica e esta disfunção aumenta com o envelhecimento. A disfunção sistólica também pode ser verificada ao nível do músculo

cardíaco detectada pela variável relação estresse-deformação sistólica. O músculo hipertrofiado apresentou menor função contrátil, mensurada pela relação SSist e houve diminuição gradativa com o envelhecimento. Os nossos dados mostram que todas as variáveis de função sistólica diminuíram com o envelhecimento, independentemente da presença de hipertrofia ventricular.

No grupo não hipertenso, a função contrátil do músculo está preservada e a perda da função ocorre apenas nas idades avançadas. Estes resultados foram previamente observados por outros pesquisadores^{59,60} que verificaram alteração tanto da câmara como do músculo com o envelhecimento. Os fatores associados à disfunção contrátil com o envelhecimento são múltiplos e incluem: alteração fenotípica da miosina de cadeia pesada, aumento da fibrose intersticial, alteração do metabolismo energético ao nível mitocondrial e modificação na homeostase do cálcio.

A função diastólica pode ser avaliada por vários índices. Dentre eles podemos citar a velocidade máxima de queda da pressão na unidade de tempo ($-dp/dt$), relação pressão-volume diastólica e relação estresse-deformação diastólica.

Freqüentemente, os índices de avaliação diastólica mostram resultados opostos o que contribui para a maior dificuldade e controvérsia no diagnóstico de disfunção diastólica.

No presente trabalho, avaliamos a função diastólica com as variáveis $-dp/dt$, ΔV_{20} e $Stress_{20}$. A variável $-dp/dt$, que corresponde à velocidade de decaimento da pressão sistólica durante o relaxamento isométrico foi significativamente maior na cepa SHR do que na WKY, em todas as faixas etárias, exceto para 90 semanas. Com o envelhecimento, houve diminuição desta variável no SHR45 em relação ao SHR90 e não foi observada queda da $-dp/dt$ com o envelhecimento no grupo WKY.

Portanto, o envelhecimento não modificou a velocidade de queda de pressão em ratos não hipertensos e houve diminuição da $-dp/dt$ em ratos hipertensos idosos de 90 semanas.

A complacência ventricular foi mensurada pela variação do volume necessário para elevar a pressão diastólica de 0 a 20mmHg (ΔV_{20}). Foi observada interação entre a cepa e a idade para esta variável. Apenas para a idade de 45 semanas o grupo SHR apresentou maior complacência que o grupo WKY. Embora houvesse tendência de maior complacência com o aumento da idade, em ambas as cepas, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos de ratos mais idosos. Cingolani e cols⁶¹ observaram que os animais SHR de 10 a 11 meses de idade apresentaram menor complacência que os controles WKY de mesma idade. Não conseguimos uma explicação para estes dados divergentes. Há a possibilidade de que a alteração na conformação geométrica do ventrículo, possa contribuir para a maior complacência no grupo SHR. Aparentemente não há influência do conteúdo de colágeno, uma vez que o CVF foi sistematicamente maior no SHR em relação ao WKY e não houve modificação com a idade.

Rozemberg e Cols⁶² observaram em ratos aumento da complacência ventricular com o envelhecimento em estudo com ratos de 3, 24, e 28 meses de idade. Estes resultados são semelhantes aos nossos, considerando os ratos WKY não hipertensos. Este aumento pode ser devido à modificação da geometria do VE, no qual o volume diastólico final desempenha papel fundamental⁶³.

A rigidez passiva miocárdica foi analisada pela variável $Stress_{20}$, que corresponde ao estresse passivo da parede para a deformação 20%. A rigidez passiva foi significativamente maior na cepa SHR em relação à cepa WKY e o envelhecimento aumentou a rigidez passiva miocárdica em ambas as cepas de maneira linear. Estes

resultados estão de acordo com os dados observados por outros pesquisadores⁶³. No trabalho não foi observada interação entre cepas e idade, mostrando que o aumento de rigidez passiva foi decorrente do envelhecimento e foi independente da cepa. A rigidez passiva é dependente do conteúdo de colágeno. No trabalho constatamos que a cepa SHR possui maior quantidade de colágeno, o que justifica a maior rigidez passiva neste grupo. Todavia, apenas o conteúdo de colágeno não explica o comportamento de rigidez passiva com o envelhecimento. Assim, temos que considerar a presença da hipertrofia miocárdica⁶⁴, modificação na matriz extracelular⁹ e outros fatores coadjuvantes no aumento da rigidez passiva^{65,66,19}.

O colágeno intersticial é formado por uma rede de fibras interligadas cuja função é dar sustentação aos miócitos e vasos, realinhamento com os miócitos, transmissão de força durante a sístole e acúmulo de energia elástica na diástole para preservação da geometria cardíaca.

No trabalho, observamos que os ratos hipertensos apresentaram maiores níveis de CVF (fração de colágeno intersticial) em relação aos animais não hipertensos. Considerando-se o papel do colágeno para a manutenção da estrutura e função cardíaca, o aumento do colágeno em animais hipertensos e hipertróficos, seria o mecanismo adaptivo à sobrecarga de pressão, para o funcionamento fisiológico destes corações.

O aumento do CVF nos animais hipertensos ocorre em todas as idades e o envelhecimento em si não alterou o conteúdo de colágeno em relação aos animais jovens.

Trabalhos anteriores mostraram maior acúmulo de colágeno intersticial em ratos SHR idosos, porém este fenômeno ocorreu em ratos que apresentaram insuficiência cardíaca na senescência. Em

nossa amostra não foram incluídos ratos com insuficiência cardíaca, o que contribuiu para a observação de ausência de fibrose nos animais idosos, com ou sem hipertensão arterial. Portanto, na amostra estimada, não podemos associar a disfunção cardíaca do envelhecimento à presença de fibrose miocárdica.

Os mecanismos envolvidos na disfunção miocárdica na presença de hipertrofia ventricular e envelhecimento são complexos e não totalmente esclarecidos. Boluyt e cols⁶⁷ avaliaram ratos SHR e WKY com 18-24 meses de idade e observaram a manutenção da função do miocárdio e a alteração na tensão ativa é observada apenas na situação de fibrose intersticial abundante em ratos com evidências de insuficiência cardíaca. Outros mecanismos envolvidos na modificação da função cardíaca seriam as alterações na isomiosina de cadeia pesada^{68,69} e na homeostase do cálcio^{70,71}.

Os nossos resultados mostram menores expressões do RNAm para Serca 2a nos animais SHR em relação aos WKY para as idades de 30 e 45 semanas. Estes resultados são similares aos observados por Arata e cols⁷² (1999) que analisaram animais com 10 a 18 semanas de idade. Há de se considerar que este comportamento ocorreu em animais jovens e adultos. Em nosso trabalho não foi observada modificação significativa da expressão de RNA para Serca 2a nos animais SHR com o envelhecimento. Por outro lado, verificamos diminuição significativa da expressão do Serca 2a nos animais WKY com o envelhecimento de maneira que na idade de 60 e 90 semanas a expressão da Serca 2a foi semelhante entre as Cepas SHR e WKY. Este resultado é similar a Boluyt e cols⁶⁹ que observaram que animais SHR e WKY, entre 18 e 28 meses, apresentaram expressão de Serca 2a em níveis não significativamente diferentes.

Não constatamos modificações nos RNAm do fosfolambam e dos receptores rianodínicos, o que demonstra que estas proteínas não participaram na modificação da homeostase do cálcio na situação de hipertrofia e tampouco no envelhecimento. Assayag e cols²⁶ relataram resultados semelhantes aos nossos. Os autores observaram diminuição da expressão da Serca 2a e manutenção dos receptores rianodínicos e dos canais trocadores Na^+/Ca^+ (NCx), com a senescência. O mesmo comportamento foi observado nos ratos com hipertrofia no modelo de hipertensão renovascular na idade de quatro meses entretanto a análise não conseguiu estudar ratos hipertensos idosos com 24 meses de idade, uma vez que os ratos de 24 meses não sobreviveram.

A hipertensão arterial é um dos principais estímulos para ativação de receptores de membrana que, por sua vez, sinalizam por meio do cálcio e fosforilação de peptídeos intracelulares para o aumento de síntese protéica, contribuindo para a hipertrofia celular. Segundo Nakayama e Cols⁴¹, a redução dos níveis de Serca 2a retroalimenta positivamente a sinalização para hipertrofia, na medida em que o Ca^{2+} deixa de ser captado pelo retículo sarcoplasmático (via Serca 2a) e acumula-se no citosol, promovendo ativação da proteína quinase C, importante sinalizador de síntese protéica, o que contribuiria para o agravamento da hipertrofia ventricular.

Pelo exposto, os nossos dados mostram que a senescência é acompanhada de disfunção cardíaca tanto sistólica como diastólica. Há alteração na homeostase do cálcio dependente da atividade da Serca 2a, sendo este dado mais marcante nos animais não hipertensos. A hipertrofia ventricular secundária à sobrecarga de pressão pode estar associada à menor expressão da Serca 2a no rato adulto e esta alteração persiste no envelhecimento. No presente trabalho, não foram observadas modificações nas expressões da fosfolambam e dos receptores dos canais rianodínicos.

Embora as alterações funcionais na hipertensão arterial e no envelhecimento sejam similares, as modificações morfológicas são distintas entre si e, por isso, não há evidências que mostrem efeitos aditivos deletérios da hipertensão arterial no processo de envelhecimento exceto na hipertrofia ventricular. Contudo, há de se considerar que nesta amostra os animais que desenvolveram falência cardíaca foram excluídos do estudo.

Conclusões

- 1) A remodelação cardíaca nos ratos hipertensos foi caracterizada pela hipertrofia concêntrica e aumento do colágeno intersticial.
- 2) Na amostra estudada observou-se diminuição de função sistólica e diastólica com a idade e não houve evidência de deterioração da função cardíaca pela associação da hipertrofia ventricular com o envelhecimento.
- 3) A expressão do Serca 2a diminui com o envelhecimento em animais normotensos e mantém-se inalterada nos animais hipertensos. A expressão de receptores de canais rianodínicos e do fosfolamban não se modificaram com a idade e com a hipertrofia.

*Referências**

* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal: sample references.[homepage on the Internet]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine; 2003[last updated 2003 July 09; cited 2005 Jun 01]. Available from:http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html
National Library of Medicine. List of journals indexed in Index Medicus. Washington, 2003. 240p.

1. Barbosa JF, Barbosa PR, Cordovill I. Modulação Autonômica do Coração na Hipertensão Arterial Sistêmica. *Arq Bras Cardiol.* 2002;78:181-8.
2. Devereux RB, Roman MJ. Left ventricular hypertrophy in hypertension: Stimuli, patterns, and consequences. *Hypertens Res Clin Exp.* 1999;22:1-9.
3. Spinale FG. Matrix metalloproteinases - Regulation and dysregulation in the failing heart. *Cir. Res.* 2002;90:520-30.
4. Jesmin S, Hattori Y, Togashi H, Ueno K, Yoshioka M, Sakuma I. Age-related changes in cardiac expression of VEGF and its angiogenic receptor KDR in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Mol Cell Biochem.* 2005;272(1-2):63-73.
5. Anversa P, Vitali-Mazza L, Gandolfi A, Loud A. Morphometry and autodiagraphy of early hypertrophic changes in the ventricular myocardium of adult rat. A light microscopic study. *Lab Invest.* 1975;33:125-9.
6. Pinto Y, Paul M, Ganten D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovasc Res.* 1998;39:77-88.
7. Yamori Y. Animal models for hypertension. *Nippon Rinsho.* 1984;42:258-70.

8. Anversa P, Palackal T, Sonnenblick E, Olivetti G, Meggs L, Capasso J. Myocyte Cell Loss and Myocyte Cellular Hyperplasia in the Hypertrophied Aging Rat-Heart. *Circ Res* 1990;67:871-85.
9. Burgess M, McCrea J, Hedrick H. Age-associated changes in cardiac matrix and integrins. *Mechanisms of Ageing and Development* 2001; 122(15): 1739-1756. *Mech. Ageing Dev.* 2001;122:1739-56.
10. Melvim D, Cheitin M. Cardiovascular Physiology: Changes with aging. *Am J Geriatric Cardiol.* 2003;12:9-13.
11. Aronson D. Cross-linking of glycated collagen in pathogenesis of arterial and myocardial system aging and diabetes. *J Hypertens.* 2003;21:3-12.
12. Rosa E C, Moysés V, Sesso R, Cintra R, Kohlmann N, Zanella MT. Função diastólica do ventrículo esquerdo em hipertensos essenciais. Influência da idade e da geometria cardíaca. *Arq. Bras. Cardiol.* 2002;78:466-71.
13. Shapiro LM MW. Left ventricular hypertrophy: relation of structure to diastolic function in hypertension. *Br Heart J.* 1984;51:637-42.
14. Atkins F, Bing O, Dimauro P, Conrad C, Robinson K, Brooks W. Modulation of left and right-ventricular beta-adrenergic receptors from spontaneously hypertensive rats with left-ventricular hypertrophy and failure. *Hypertension.* 1995;26:78-82.

15. Chowczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162:156-9.
16. Zabalgoitia M, Rahman NU, Halley Wea. Comparison in systemic hypertension of left ventricular mass and geometry with systolic and diastolic function in patients, <65 to>65 years of age. *Am J Cardiol* 1998;82:604-8.
17. Varagic J, Susic D, Frohlich E. Heart, aging and hypertension. *Curr Opin Cardiol* 2001;16:336-41.
18. Zieman S, Melenovsky V, Kass D. Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Arterioscler Tromb Vasc Biol* 2005;25:932-43.
19. Shapiro BP, Lam CS, Patel JB, Mohammed SF, Kruger M, Meyer DM. Acute and chronic ventricular-arterial coupling in systole and diastole: insights from an elderly hypertensive model. *Hypertension* 2007;50:503-511.
20. Fleg JL, O'Connor F, Gerstenblith G, Becker LC, Clulow J, Schulman SP. Impact of age on the cardiovascular response to dynamic upright exercise in healthy men and women. *J Appl Physiol* 1995;78:890-900.
21. Gerstenblith G, Frederiksen J, Yin F, Fortuin N, Lakatta E, Weisfeldt M. Echocardiographic assessment of a normal adult aging population. *Circulation.* 1977;56:273-8.

22. Czernin J, Müller P, Chan S, et al. Influence of age and hemodynamics on myocardial blood flow and flow reserve. *Circulation*. 1993;88:62-9.
23. Slama M, Ahn J, Varagic J, Susic D, Frohlich E. Long-term left ventricular echocardiographic follow-up of SHR and WKY rats: effects of hypertension and age. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286:H181-5.
24. Rodeheffer R, Gerstenblith G, Becker L, Fleg J, Weisfeldt M, Lakatta E. Exercise cardiac output is maintained with advancing age in healthy human subjects: cardiac dilatation and increased stroke volume compensate for a diminished heart rate. *Circulation*. 1984;69:203-13.
25. Lakatta E. Cardiovascular regulatory mechanisms in advanced age. *Physiol Rev*. 1993;73:413-67.
26. Assayag P, Charlemagne D, de Leiris J, Boucher F, Valère PE, Lortet S. Senescent heart compared with pressure overload-induced hypertrophy. *Hypertension*. 1997;29:15-21.
27. Besse S, Assayag P, Delcayre C, Carre F, Cheav SL, Lecarpentier Y. Normal and hypertrophied senescent rat heart: mechanical and molecular characteristics. *Am J Physiol*. 1993;265:H183-90.
28. Braunwald E, Zipes D, Libby P. *Heart disease: a textbook of Cardiovascular Medicine*. 6th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

29. Korecky B, Rakusan K. Normal and hypertrophic growth of the rat heart: changes in cell dimensions and number. *Am J Physiol* 1978;234:H123-8.
30. Rakusan K, Hrdina P, Turek Z, Lakatta E, Spurgeon H, Wolford G. Cell size and capillary supply of the hypertensive rat heart: quantitative study. *Basic Res Cardiol*.1984;79:389-95.
31. Anversa P, Ricci R, Olivetti G. Quantitative structural analysis of the myocardium during physiologic growth and induced cardiac hypertrophy: a review. *J Am Coll Cardiol*. 1986;7:1140-9.
32. Eleftheriades E, Durand J, Ferguson A, Engelmann G, Jones S, Samarel A. Regulation of procollagen metabolism in the pressure-overloaded rat heart. *J Clin Invest*. 1993;91:1113-22.
33. Anversa P, Palackal T, Sonnenblick E, Olivetti G, Capasso J. Hypertensive cardiomyopathy. Myocyte nuclei hyperplasia in the mammalian rat heart. *J Clin Invest*. 1990;85:994-97.
34. Anversa P, Capasso J, Olivetti G, Sonnenblick E. Cellular basis of ventricular remodeling in hypertensive cardiomyopathy. *Am J Hypertens*. 1992;5:758-70.
35. Leri A, Kajstura J, Anversa P. Myocyte proliferation and ventricular remodeling. *J Card Fail*. 2002;8:S518-25.
36. Bing O, Conrad C, Boluyt M, Robinson K, Brooks W. Studies of prevention, treatment and mechanisms of heart failure in the aging spontaneously hypertensive rat. *Heart Fail Ver*. 2002;7:78-88.

37. Opie LH, Solaro RJ. Myocardial contraction and relaxation. In: Opie LH. Heart physiology: from cell to circulation. 4thed. Philadelphia, 1998:221-31.
38. Mesquita ET, Socrates J, Rassi S, Villacorta H, Mady C. Insuficiência cardíaca com função sistólica preservada. Arq Bras Cardiol. 2004;82:494-500
39. Bluhm WF, Kranias EG, Dillmann WH, Meyer M. Phospholamban: a major determinant of the cardiac force-frequency relationship. Am J Physiol Heart Cir. Physiol. 2000;278:H249-55.
40. Li SY, Golden KL, Jiang Y, Wang GJ, Privratsky JR, Zhang X. Inhibition of sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase differentially regulates contractile function in cardiac myocytes from normotensive and spontaneously hypertensive rats: role of Ca²⁺ regulatory proteins. Cell Biochem Biophys. 2005;42:1-12.
41. Nakayama H, Otsu K, Yamaguchi O, Nishida K, Date MO, Hongo K. Cardiac-specific overexpression of high Ca²⁺ affinity mutant of SERCA 2a attenuates in vivo pressure overload cardiac-hypertrophy. FASEB J 2003;17:61-3.
42. Takeishi Y, Bhagwat A, Ball N, Kirkpatrick D, Periasamy M, Walsh R. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on protein kinase C and SR proteins in heart failure. Am J Physiol. 1999;276:H53-62.
43. Zheng MZ, Dilly K, Cruz JD, Li M, Gu Yusu, Ursitti JA. Sarcoplasmic reticulum calcium defect in Ras-induced hypertrophic

- cardiomyopathy heart. *Am J of Physiol-Heart and Cir Physiol* 2004;286:H424-33.
44. Li Q, Wu S, Li SY, et al. Cardiac-specific overexpression of insulin-like growth factor 1 attenuates aging-associated cardiac diastolic contractile dysfunction and protein damage. *American Journal of Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292:H1398-403.
 45. Matsubara BB, Matsubara LS, Zornoff LAM, Franco M, Janicki JS. Left ventricular adaptation to chronic pressure overload induced by inhibition of nitric oxide synthase in rats. *Basic Res Cardiol*. 1998;93:173-81.
 46. Mirit E, Palmon A, Hasin Y, Horowitz M. Heat acclimation induces changes in cardiac mechanical performance: the role of thyroid hormone. *Am J Physiol Regul. Integr Comp Physiol*. 1999;276:R550-8.
 47. Cousin F, Macrez N, Morel J, Mironneau J. Requirement of Ryanodine receptor subtypes 1 and 2 for Ca^{2+} release in vascular myocytes. *J Biol Chem*. 2000;275:9596-03.
 48. Alway SE, Degens H, Lowe DA, Krishnamurthy G. Increased myogenic repressor Id mRNA and protein levels in hindlimb muscle of aged rats. *Am J Physiol* 2002;282:R411-22.
 49. Dawson-Saunders B, Trapp R. *Basic & Clinical Biostatistics*. East Norwalk, Connecticut: Appleton & Lange, 1994.344.
 50. Snedecor GW, Cochran WG. *Statistical Methods*. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1989:503.

51. Susic D, Varagic J, Ahn. J, Matavelli L, Frohlich E. Long-term mineralocorticoid receptor blockade reduces fibrosis and improves cardiac performance and coronary hemodynamics in elderly SHR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292:175-9.
52. Kurtz T, Morris R. Biological variability in Wistar-Kyoto rats. Implications for research with the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens.* 1987;10:127-31.
53. Ikeda U, Tsuruya Y, Kamitani T, Oguchi A, Oohara T, Yaginuma T. Ventricular cells in culture from adult spontaneously hypertensive rats exhibit decreased growth. *J Hypertension* 1990;8:1003-1006.
54. Ebata H, Natsume T, Mitsuhashi T, Yaginuma T. Reduced calcium sensitivity of dihydropyridine binding to calcium channels in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 1991;17:234-41.
55. Conrad CH, Brooks WW, Hayes JA, Sen S, Robinson KG, Bing OH. Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Circulation.* 1995;91:161-70.
56. Fukuda S, Tsuchikura S, Iida H. Age-related changes in blood pressure, hematological values, concentrations of serum biochemical constituents and weights of organs in the SHR/lzm, SHRSP/lzm and WKY/lzm. *Exp Anim.* 2004;53:67-72.
57. Horinaka S, Frohlich ED. Cardiovascular mass and ventricular function after celiprolol in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res.* 1992;26:396-400.

58. Aoyagi T, Izumo S. Hemodynamic overload-induced activation of myocardial mitogen-activated protein kinases in vivo - Augmented responses in young spontaneously hypertensive rats and diminished responses in aged Fischer 344 rats. *Hypertension*. 2001;37:52-7.
59. Bing OH, Brooks WW, Robinson KG, Slawsky MT, Hayes JA, Litwin SE. The spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from compensated left ventricular hypertrophy to failure. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27:383-96.
60. Raya TE, Gaballa M, Anderson P, Goldman S. Left ventricular function and remodeling after myocardial infarction in aging rats. *Am. J Physiol Heart Circ Physiol*. 1997;42:H2652-58.
61. Cingolani OH, Yang XP, Cavaasin MA, Carretero OA. Increased systolic performance with diastolic dysfunction in adult spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2003;41:249-54.
62. Rozenberg S, Tavernier B, Riou B, Swynghedauw B, Page CL, Boucher F, Leiris J. Severe impairment of ventricular compliance accounts for advanced age-associated hemodynamic dysfunction in rats. *Exp Gerontol*. 2006;41:289-95.
63. De Stefano LM, Matsubara LS, Matsubara BB. Myocardial dysfunction with increased ventricular compliance in volume overload hypertrophy. *Eur. J Heart Fail*. 2006;8:784-9.
64. Mirsky I, Pasipoularides A. Elastic properties of normal and hypertrophied cardiac muscle. *Fed Proc* 1980;39:156-61.

65. Anversa P, Palackal T, Sonnenblick EH, Olivetti G, Meggs LG, Capasso JM. Myocyte Cell Loss and Myocyte Cellular Hyperplasia in the Hypertrophied Aging Rat-Heart. *Cir. Res.* 1990;67:871-85.
66. A. Abbate, S. Scarpa, D. Santini, J. Palleiro, F. Vasaturo, J. Miller. Myocardial expression of survivin, an apoptosis inhibitor, in aging and heart failure. An experimental study in the spontaneously hypertensive rat. *Int J Cardiol.* 2006;111:371-6.
67. Boluyt MO, Bing OHL, Lakatta EG. The ageing spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from stable compensated hypertrophy to heart failure. *Eur Heart J.* 1995;16:19-30.
68. Vulpis V, Ricci S, Seccia TM, Lograno M, Daniele E, Pirrelli A. [Aging and isomyosin pattern of the left ventricle in spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto rats]. *Cardiologia.* 1996;41:877-82.
69. Boluyt MO, O'Neill L, Meredith AL, Bing OH, Brooks WW, Conrad CH. Alterations in Cardiac Gene-Expression During the Transition from Stable Hypertrophy to Heart-Failure - Marked up-Regulation of Genes Encoding Extracellular-Matrix Components. *Cir. Res.* 1994;75:23-32.
70. Lammerich A, Gunther J, Pfitzer G, Storch E, Vetter R. Alterations of cardiac contractile function are related to changes in membrane calcium transport in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension J.* 1995;13:1313-24.
71. Fowler MR, Naz JR, Graham MD, Orchard CH, Harrison SM. Age and hypertrophy alter the contribution of sarcoplasmic reticulum and

- Na⁺/Ca²⁺ exchange to Ca²⁺ removal in rat left ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2007;42:582-9.
72. Nakayama H, Otsu K, Yamaguchi O, Nishida K, Date MO, Hongo K. Cardiac-specific overexpression of high Ca²⁺ affinity mutant of SERCA 2a attenuates in vivo pressure overload cardiac-hypertrophy. *FASEB J* 2003;17:61-3.
73. Arata Y, Geshi E, Nomizo A, Aoki S, Katagiri T. Alterations in sarcoplasmic reticulum and angiotensin II receptor type 1 gene expression in spontaneously hypertensive rat hearts. *Jpn Circ J* 1999;63:367-72.