

*Marcelo Diarcadia Mariano Cezar*

**EFEITO DO BLOQUEIO DA ALDOSTERONA  
NA REMODELAÇÃO CARDÍACA DE RATOS  
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

**Orientador: Prof. Dr. *Katashi Okoshi***

**Botucatu – São Paulo  
2010**

*Marcelo Diarcadia Mariano Cezar*

# **EFEITO DO BLOQUEIO DA ALDOSTERONA NA REMODELAÇÃO CARDÍACA DE RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia em Clínica Médica.

**Orientador:** Prof. Dr. *Katashi Okoshi*

**Botucatu – São Paulo  
2010**

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*

Cezar, Marcelo Diarcadia Mariano.

Efeito do bloqueio da aldosterona na remodelação cardíaca de ratos espontaneamente hipertensos / Marcelo Diarcadia Mariano Cezar. – Botucatu, 2010.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Katashi Okoshi  
Assunto CAPES: 40101100

1. Aldosterona - Efeitos fisiológicos - Estudos experimentais 2. Insuficiência cardíaca 3. Remodelação ventricular

Palavras-chave: Cardiopatia; Espironolactona; Insuficiência cardíaca; Rato espontaneamente hipertenso; Remodelação cardíaca

“NÃO SOBRECARREGUES OS TEUS DIAS COM  
PREOCUPAÇÕES DESNECESSÁRIAS, A FIM DE QUE NÃO  
PERCAS A OPORTUNIDADE DE VIVER COM ALEGRIA”

**(André Luiz)**

“SORTE É O QUE ACONTECE QUANDO CAPACIDADE  
ENCONTRA-SE COM OPORTUNIDADE”

**(Sêneca)**

## **DEDICATÓRIA**

A meus pais, DAGOBERTO e MARIA  
ADORAÇÃO.

Aos meus irmãos PHELIPE e BRUNO!

A minha vó ELVIRA e a toda minha  
FAMÍLIA botucatuense!

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS por oportunizar o convívio com pessoas maravilhosas durante a realização deste estudo.

Ao Prof. Dr. KATASHI OKOSHI, pela orientação, ensino, dedicação e paciência durante todo esse período. Obrigado por entender minhas dificuldades, mas confiar na minha capacidade.

À Profa. Dra. MARINA POLITI OKOSHI, pela grande contribuição e persistência durante todas as etapas do trabalho.

Ao Prof. Dr. ANTONIO CARLOS CICOGNA por contribuir para a realização deste estudo e sempre disponibilizar oportunidades de aprendizado.

Ao Prof. Dr. LEONARDO ANTÔNIO MAMEDE ZORNOFF e ao Prof. Dr. MARCOS FERREIRA MINICUCCI, pela atenção e valiosas sugestões prestadas no exame de qualificação.

Aos Professores: Prof. Dr. LUIZ SHIGUERO MATSUBARA, Prof. Dr. CARLOS ROBERTO PADOVANI, Profa. Dra. CÉLIA REGINA NOGUEIRA, Profa. Dra. BEATRIZ BOJIKIAN MATSUBARA, pela colaboração profissional.

Aos meus amigos do laboratório: DIJON, RICARDO, ALINE, PAULA, SÍLVIO, ANDRÉ LEOPOLDO, ANA PAULA, ANDRÉ NASCIMENTO, DANI, CAMILA BONOMO, CAMILA ROSA, GABRIEL que caminharam juntos comigo durante toda jornada e tornaram possível a execução deste trabalho.

À TODOS OS COMPANHEIROS DE LABORATÓRIO pela amizade, momentos de diversão e contribuição nos momentos de trabalho.

A todos os funcionários do Laboratório Experimental, JOSÉ CARLOS, MÁRIO BRUNO, CORINA, CAMILA, ELENIZE, LALLA, JOSÉ APARECIDO, ROGÉRIO, ÂNGELO, SUELI C., SUELI G., VÍTOR, e principalmente, a Sandra, pela convivência e por todo o auxílio durante a realização do trabalho.

A TODOS OS FUNCIONÁRIOS DO DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA e da Secretaria de Pós-Graduação, pela colaboração e disponibilidade em todo auxílio requisitado.

Aos meus amigos GUSTAVO, FELIPÃO, ANDERSON, FELIPE LEME, EMMANUEL, DIEGO, que me incentivaram em todos os momentos, mesmo estando longe, me passando confiança para a continuação dos estudos.



Ao meu tio EDSON RAMOS DE SIQUEIRA por ter me indicado, juntamente com DIJON, propiciando o início dos estudos em Botucatu.

A minha família botucatuense: VÓ, ANA MARIA, ANA HELENA, DIOGO, ANA LUISA, ANA ELISA, PAIXÃO, ANA CLÁUDIA, JULIANA, BRANCO, MÉIA, ANDRÉ, CRISTINA, JOÃO VICTOR, BRUNA, por todo o carinho em todos os momentos.

Aos meus PAIS e IRMÃOS por todo amor e confiança durante toda minha vida, não importando a distância física que nos separe, pois estaremos sempre ligados.

À FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP), pelo suporte financeiro.

## SUMÁRIO

Resumo .....	1
Abstract .....	4
Introdução .....	7
Objetivo .....	12
Material e Métodos .....	14
Resultados .....	26
Discussão .....	37
Conclusão .....	45
Referências .....	47

**RESUMO**

A hipertensão arterial sistêmica é uma das principais causas de insuficiência cardíaca (IC). No processo do desenvolvimento da hipertrofia miocárdica e a evolução para IC, decorrente da sobrecarga pressórica, a ativação dos sistemas nervoso simpático e renina-angiotensina-aldosterona exerce papel fundamental, e a aldosterona tem sido responsabilizada por muitos desses efeitos. Diversos estudos clínicos e experimentais mostraram que o bloqueio da aldosterona atenua a remodelação ventricular na IC avançada. Considerando os efeitos adversos da aldosterona, o bloqueio de seus receptores, na fase mais precoce ao desenvolvimento da IC, poderá ser também benéfico atenuando a progressão da remodelação cardíaca. Para investigar essa questão, foram utilizados ratos espontaneamente hipertensos, com 16 meses de idade, divididos em dois grupos experimentais: controle (CTL) e tratado com espironolactona 20 mg/kg/dia (ESP) por seis meses. A pressão arterial sistólica (PAS) foi medida no início e no final do experimento. A avaliação estrutural e funcional cardíaca *in vivo* foi realizada por ecocardiograma. O estudo funcional *in vitro* foi realizado pela técnica do músculo papilar do ventrículo esquerdo (VE). A reserva contrátil foi avaliada após aumento da concentração de cálcio extracelular, contração pós-pausa e estimulação por  $\beta$ -agonista isoproterenol. Para análise estrutural *in vitro* foram medidos os pesos do VE, ventrículo direito, átrios, pulmão e amostra de fígado, e calculada a razão peso úmido/peso seco desses órgãos. Amostras do VE foram obtidas para análise histológica, com a finalidade de medir a área seccional dos cardiomiócitos (hematoxilina e eosina) e a área ocupada pelo colágeno (*picrosirius red*), para quantificação de hidroxiprolina e realização da técnica do RT-PCR em tempo real para o estudo dos genes relacionados à remodelação cardíaca. As comparações entre os grupos foram realizadas por teste *t* de Student ou teste de Mann-Whitney, de acordo com distribuição normal ou não normal, respectivamente. A mortalidade foi avaliada por meio de teste de *log-rank* (curva de Kaplan Meier). A análise do estudo funcional do músculo isolado após realização das diferentes manobras inotrópicas foi realizada por ANOVA de medidas repetidas de dois fatores independentes e complementada com teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls. Os resultados são discutidos no nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). Os animais do grupo CTL apresentaram

mortalidade de 71% e o grupo ESP de 38% no decorrer do experimento ( $p=0,004$ ). Os níveis de PAS inicial (CTL:  $206\pm 17$  mmHg; ESP:  $215\pm 21$  mmHg) e final do experimento (CTL:  $199\pm 43$  mmHg; ESP:  $200\pm 35$  mmHg) foram semelhantes entre os grupos. Não houve diferença entre os grupos em relação às variáveis estruturais e funcionais avaliadas por ecocardiografia. Da mesma forma, a avaliação *in vitro* não mostrou diferença nos índices de função miocárdica, na condição basal e após manobras inotrópicas. A concentração de hidroxiprolina e a fração colágena miocárdica não apresentaram diferença entre os grupos. A avaliação da área seccional do miócito mostrou maior hipertrofia no grupo CTL em relação ao grupo ESP ( $p=0,001$ ). A análise da expressão dos genes  $\alpha$ -miosina,  $\beta$ -miosina, peptídeo natriurético atrial, SERCA e relação  $\alpha/\beta$ -miosina não mostraram diferença estatística entre os grupos. Diante desses resultados podemos concluir que a administração de espironolactona, antes do surgimento de sinais clínicos de insuficiência cardíaca, aumenta a sobrevida sem interferir no processo de remodelação cardíaca de ratos espontaneamente hipertensos.

**Palavras-chave:** remodelamento cardíaco, espironolactona, insuficiência cardíaca, cardiopatia hipertensiva, ratos espontaneamente hipertensos.

**ABSTRACT**

Arterial hypertension is one of the main causes of heart failure (HF). In the process of myocardial hypertrophy and HF development due to pressure overload, activation of sympathetic nervous system and renin-angiotensin system plays a fundamental role. Several clinical and experimental studies have been shown that aldosterone blockade attenuates ventricular remodeling in advanced HF. Considering the aldosterone deleterious effects, we hypothesized that the blockade of its receptors in the early phase of HF development can attenuate the progression of cardiac remodeling. To investigate this issue, 16 month-old spontaneously hypertensive rats were used. Rats were separated into two groups: control (CTL) and spironolactone treated (SPR, 20 mg/kg/day) for six months. Systolic arterial pressure (SAP) was measured at the beginning and the end of the experiment. *In vivo* cardiac structural and functional evaluation was performed by echocardiogram. *In vitro* myocardial function was analyzed in left ventricular (LV) papillary muscles under isometric contractions. Contractile reserve was evaluated after extracellular calcium concentration increase, post-pause contractions, and  $\beta$ -agonist isoproterenol stimulation. *In vitro* structural analysis was done by measuring LV, right ventricle, and atria weight, and the wet-to-dry weight ratio of these organs and also lung and liver samples. LV samples were stored for histological analysis (cardiomyocyte cross-sectional area and myocardial collagen fraction), measurement of hydroxyproline concentration, and quantification of gene expression of proteins related to cardiac remodeling by real-time RT-PCR. According to sample distribution, normal or non-normal, Student's *t* test or Mann-Whitney test was used to compare the groups. Mortality rate was analyzed by log-rank test (Kaplan Meier curve). Statistical analysis of contractile reserve was done by two factors repeated measures ANOVA followed by Student-Newman-Keuls multiple comparisons test. Statistical significance was accepted at the level of  $p < 0.05$ . The SPR group presented lower mortality rate than the CTL group (38% vs. 71%,  $p = 0.004$ ). The SAP at the beginning (CTL:  $206 \pm 17$  mmHg; SPR:  $215 \pm 21$  mmHg) and the end of the experiment (CTL:  $199 \pm 43$  mmHg; SPR:  $200 \pm 35$  mmHg) was not different between the groups. *In vivo* and *in vitro* structural and functional analyses were not different between the groups. LV papillary muscle contractile reserve was not different between the



groups. Hydroxyproline concentration and myocardial collagen fraction were not different between the groups. Cardiomyocyte cross-sectional area was lower in the SPR than the CTL group ( $p=0.001$ ). Alfa-myosin,  $\beta$ -myosin,  $\alpha/\beta$ -myosin ratio, atrial natriuretic peptide, and SERCA gene expression was not statistically different between the groups. We conclude that administration of spironolactone, initiated before heart failure clinical evidence, increases survival rate without changing cardiac remodeling of spontaneously hypertensive rats.

**Key-words:** cardiac remodeling, spironolactone, heart failure, hypertensive heart disease, spontaneously hypertensive rats.

# INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) acomete cerca de 600 milhões de pessoas no mundo, segundo a Organização Mundial da Saúde. Estima-se que 1,56 bilhão de pessoas poderão apresentar HAS em 2025, o que provocaria uma epidemia global de doenças cardiovasculares ([www.sbh.org.br](http://www.sbh.org.br)).

No Brasil, a prevalência de HAS na população geral é de aproximadamente 30%, chegando a mais de 50% na terceira idade, o que representa a principal doença cardiovascular em nosso meio. A taxa anual de mortalidade brasileira, por doenças cardiovasculares, se aproxima de trezentas mil pessoas, sendo que mais da metade ocorre devido às complicações da HAS ([www.sbh.org.br](http://www.sbh.org.br)).

Hipertensão arterial sistêmica é a mais freqüente das doenças cardiovasculares ([www.saude.gov.br](http://www.saude.gov.br)). Entre os efeitos deletérios aos vários órgãos como cérebro, rins e o sistema vascular, a HAS causa alterações cardíacas que irão comprometer a sua função evoluindo para insuficiência cardíaca (IC). A elevação da pressão arterial induz hipertrofia miocárdica, que é uma resposta adaptativa do coração com o objetivo de manter o débito cardíaco normal. No entanto, juntamente com a hipertrofia miocárdica, ocorrem outras alterações dentro do processo de remodelação cardíaca, como alteração da matriz extracelular, que inicialmente irão se manifestar clinicamente como IC com função sistólica do ventrículo esquerdo (VE) normal, habitualmente denominada IC diastólica. Com a persistência da pressão arterial elevada e a incapacidade do miocárdio de continuar se hipertrofiando, estabelece-se o comprometimento adicional e predominante da função sistólica, com piora acentuada da IC e do prognóstico para o paciente. A presença de hipertrofia miocárdica, por si só, representa fator de risco independente para morbidade e mortalidade cardíaca. Além disso, a HAS é o principal fator de risco para o infarto do miocárdio, que apresenta alta taxa de complicações e mortalidade (Swynghedauw, 1989; Verdecchia *et al.*, 1998; Vasan & Benjamin, 2001).

Sobrecargas hemodinâmicas crônicas, como a que ocorre na HAS, ocasionam alterações na geometria, volume, massa, constituição e função do coração, cujo processo é denominado remodelação cardíaca (Cohn *et al.*, 2000). Trata-se de um conceito amplo e complexo, e envolve uma série de respostas

cardíacas causadas por determinada agressão, como fatores genético, neurohormonal, inflamatório e bioquímico. Incluem-se dentro desse processo a re-expressão de genes das proteínas contráteis do período fetal como a  $\alpha$  e  $\beta$ -miosina, modificação na expressão gênica de peptídeo natriurético atrial e da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático, alterações na quantidade e qualidade do colágeno na matriz extracelular, distúrbios na atividade elétrica do coração relacionados à matriz extracelular e as alterações de diversos canais iônicos, recentemente denominado remodelação elétrica ou eletrofisiológica, entre outros (Tomaselli & Marbán, 1999; Cohn *et al.*, 2000; Spinale, 2002; Aiba & Tomaselli, 2010).

A participação de sistemas neurohormonais na remodelação cardíaca tem sido objeto de muito estudo nas últimas décadas. Atualmente, está bem estabelecido o papel maléfico da ativação do sistema nervoso simpático e do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) no desenvolvimento de hipertrofia cardíaca e em sua evolução para IC (Weinberg *et al.*, 1994; Weinberg *et al.*, 1997; Okoshi *et al.*, 2004; Bregagnollo *et al.*, 2005; Gonçalves *et al.*, 2005). Ambos os sistemas estão intimamente relacionados, e a ativação de um deles estimula o outro e vice-versa. A ativação do SRAA causa aumento na síntese de renina pelas células justaglomerulares do córtex renal com conseqüente aumento na produção de angiotensina II. Esse hormônio causa vasoconstrição, estimula a hipertrofia e apoptose dos miócitos, e modula a secreção de aldosterona (Dostal & Baker, 1999; Kim, 2000; Paul *et al.*, 2006; Burla *et al.*, 2007).

A aldosterona exerce papel importante na remodelação cardíaca e na fisiopatologia da IC, promovendo proliferação de colágeno intersticial miocárdico e vascular e hipertrofia dos miócitos (Brilla *et al.*, 1993; Matsubara *et al.*, 2000; Okoshi *et al.*, 2004). Além disso, apresenta efeitos adversos na IC como retenção de sódio e água, diminuição de magnésio e potássio, ativação simpática e inibição parassimpática (Pitt *et al.*, 1999; Kambara *et al.*, 2003). Esses efeitos citados são independentes das alterações da pressão arterial induzida pela aldosterona (Kalidindi *et al.*, 2007).

Os antagonistas da aldosterona previnem fibrose miocárdica e vascular em ratos normotensos idosos e em vários modelos de hipertensão arterial em ratos. Além disso, pode prevenir morte súbita, uma vez que a fibrose miocárdica é substrato estrutural importante na gênese de arritmias ventriculares (Kalidindi *et al.*, 2007). Diversos estudos clínicos e experimentais mostraram que o bloqueio da ação da aldosterona com espironolactona atenua as alterações cardíacas morfológicas e funcionais desencadeadas por diversos estímulos (Pitt *et al.*, 1999; Takeda *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2002; Hayashi *et al.*, 2003; Pitt *et al.*, 2003; Okoshi *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2006; Burla *et al.*, 2007).

Dois grandes estudos clínicos mostraram que os bloqueadores dos receptores da aldosterona reduzem a mortalidade e o número de hospitalizações em pacientes com IC sistólica de todas as causas e em classes funcionais III e IV da *New York Heart Association* (NYHA) (RALES) (Pitt *et al.*, 1999) e em pacientes com disfunção sistólica pós-infarto agudo do miocárdio (EPHESUS) (Pitt *et al.*, 2003). Baseado no estudo RALES, as diretrizes terapêuticas passaram a recomendar o uso de espironolactona em portadores de IC em classes funcionais III e IV da NYHA (Hunt *et al.*, 2005; Bocchi *et al.*, 2009). De acordo com a NYHA, a IC é classificada de I a IV de acordo com a limitação à atividade física do indivíduo: classe I, sem limitação; classe II, leve limitação; classe III, limitação acentuada; classe IV, sintomas de IC às atividades físicas mínimas ou em repouso (Mann, 2008).

Até o momento, esse fármaco não está indicado para o tratamento de formas mais leves (classes I e II) de IC sistólica de qualquer etiologia, por falta de evidências consistentes que comprovem o seu benefício (Jessup *et al.*, 2009). O estudo EPHESUS, citado anteriormente, embora tenha avaliado pacientes de todas as classes funcionais da IC, incluiu somente indivíduos que foram acometidos por infarto do miocárdio recente e com disfunção sistólica do VE (Pitt *et al.*, 2003). Recentemente, um ensaio clínico envolvendo pequeno número de pacientes, de todas as classes funcionais de IC, mostrou efeito benéfico da espironolactona sobre a estrutura e função do VE. Nesse estudo foram incluídos indivíduos com IC

por doença isquêmica, cardiomiopatia dilatada e hipertensão arterial sistêmica, com fração de ejeção do VE inferior a 0,40 (Chan *et al.*, 2007).

Portanto, é de fundamental importância que se investigue o efeito do bloqueio dos receptores da aldosterona em fase anterior ao aparecimento de sinais clínicos de IC. Para estudar essa questão, o rato geneticamente hipertenso parece ser bastante adequado, por ser um modelo de reconhecido valor no estudo da remodelação cardíaca e IC secundária a HAS.

Os ratos espontaneamente hipertensos (SHR) foram introduzidos por Okamoto e Aoki como um modelo de hipertensão genética, muito semelhante à hipertensão arterial sistêmica em humanos (Okamoto & Aoki, 1963). O SHR desenvolve hipertensão persistente depois de aproximadamente dois meses de idade, e aos três meses já apresenta hipertrofia do VE (Bing *et al.*, 1995; Okoshi *et al.*, 2004; Okoshi *et al.*, 2006). Após um período relativamente longo de hipertensão estável e hipertrofia compensada com função sistólica preservada, os animais desenvolvem disfunção sistólica do VE e evidência clínica de insuficiência cardíaca entre 18 e 24 meses de idade (Pfeffer *et al.*, 1979; Cicogna *et al.*, 1999; Bing *et al.*, 2002; McCrossan *et al.*, 2004). A progressão de hipertrofia miocárdica para disfunção cardíaca no SHR é semelhante à que ocorre no ser humano portador de HAS (Trippodo & Frohlich, 1981).

Considerando os efeitos adversos da aldosterona na remodelação cardíaca e no desenvolvimento da IC, pode-se supor que o bloqueio dos receptores da aldosterona, em fase precoce do desenvolvimento de IC, será benéfico, podendo atenuar a progressão da remodelação cardíaca.

## OBJETIVO

Avaliar o efeito da administração crônica de espironolactona, introduzida antes do surgimento de sinais clínicos de insuficiência cardíaca, sobre a remodelação cardíaca de ratos espontaneamente hipertensos.



## **MATERIAL E MÉTODOS**

## Animais e constituição dos grupos

Foram utilizados ratos espontaneamente hipertensos, machos, com 16 meses de idade, fornecidos pelo Biotério do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais: 1) grupo controle (CTL, n=72), que foi alimentado com ração comercial e água *ad libitum*; 2) grupo espironolactona (ESP, n=34), que foi alimentado com ração comercial, acrescida de espironolactona 20 mg/kg/dia (BiOLAB Farmacêutica), e água *ad libitum*. Os ratos permaneceram sob esse tratamento por seis meses. Durante o período experimental os ratos foram mantidos em gaiolas (dois animais/gaiola), à temperatura ambiente de 23° C, com ciclos de luminosidade de 12 horas.

Os animais foram observados semanalmente a partir do início do experimento, pesquisando a presença dos seguintes sinais: taquipnéia, oscilação de peso corporal e de brilho dos pêlos e diminuição da movimentação física. A presença desses sinais, principalmente a taquipnéia, sugere o diagnóstico *in vivo* de IC.

Ao final de 6 meses de período experimental, os animais foram avaliados clinicamente para a detecção de taquipnéia. No momento da eutanásia foram avaliados os seguintes sinais anátomo-patológicos de IC: ascite, congestão hepática, derrame pleuropericárdico, trombo em átrio esquerdo e hipertrofia do ventrículo direito (relação peso do ventrículo direito/peso corporal maior que 0,8 mg/kg) (Boluyt *et al.*, 1994; Brooks *et al.*, 1997; Boluyt *et al.*, 2005). Os animais que apresentaram dois ou mais desses sinais foram considerados portadores de IC (Martinez *et al.*, 2007). Os animais que morreram antes de completar o período experimental não tiveram o diagnóstico de IC confirmado por sinais anátomo-patológicos.

## Aferição da pressão arterial e peso corporal

A pressão arterial sistólica (PAS) foi aferida indiretamente na cauda, no início e ao término da fase experimental, utilizando-se o método da pletismografia (Pfeffer *et al.*, 1971). Os ratos foram previamente colocados em caixa de madeira (50x40 cm), forrada com maravalha de pinus autoclavada, à temperatura de 40° C por 5 minutos, com a finalidade de produzir vasodilatação da artéria caudal. O equipamento utilizado foi o esfigmomanômetro da marca *Narco Bio-System*®, modelo 709-0610 (*International Biomedical, Inc.*). O manguito foi posicionado em torno da cauda do animal e conectado a transdutor de pressão (*Gould*). Em seguida, o manguito foi insuflado a valor superior à pressão arterial sistólica e desinsuflado. O registro das pulsações arteriais foi feito por polígrafo *Gould*, modelo RS 3200.

Os ratos foram pesados individualmente por meio de balança digital da marca *Mettler*® modelo *Spider 2*.

## Estudo ecocardiográfico

O ecocardiograma foi realizado antes da introdução do tratamento e ao final do período experimental. Os ratos foram submetidos a leve anestesia com cloridrato de cetamina (50 mg/kg, i.p.) e cloridrato de xilidino (1 mg/kg, i.p.). Após tricotomia da região anterior do tórax, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo para a realização do exame. Foi utilizado o equipamento modelo HDI-5000 da *Philips*, equipado com transdutor eletrônico multifrequencial de 12 MHz. Para avaliar as medidas estruturais do coração foram obtidas imagens em modo monodimensional (modo-M) orientado pelas imagens em modo bidimensional, estando o transdutor em posição para-esternal, eixo menor. A avaliação do VE foi realizada posicionando o cursor do modo-M logo abaixo do plano da valva mitral no nível dos músculos papilares (Simone *et al.*, 1992; Litwin *et al.*, 1995). As imagens da aorta e do átrio esquerdo foram obtidas posicionando o cursor do modo-M ao nível do plano da valva aórtica. As

imagens obtidas no modo-M foram registradas em impressora modelo UP-895 da Sony Co. Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas, manualmente, com o auxílio de paquímetro de precisão. As seguintes estruturas foram medidas: diâmetros diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) do VE; espessuras diastólica (EDPP) e sistólica (ESPP) da parede posterior do VE; espessuras diastólica (EDSIV) e sistólica (ESSIV) do septo interventricular e diâmetros da aorta (AO) e do átrio esquerdo (AE). A massa do VE foi calculada pela fórmula  $[(DDVE + EDPP + EDSIV)^3 - (DDVE)^3] \times 1,04$ , onde 1,04 representa a densidade específica do miocárdio (Litwin *et al.*, 1995; Paiva *et al.*, 2003). A função sistólica do VE foi avaliada pelos seguintes índices: 1) porcentagem de encurtamento endocárdico (% $\Delta$  endo)  $[(DDVE - DSVE) / DDVE]$ ; 2) porcentagem de encurtamento mesocárdico (% $\Delta$  meso)  $[(DDVE + \frac{1}{2} EDPP + \frac{1}{2} EDSIV) - (DSVE + \frac{1}{2} ESPP + \frac{1}{2} ESSIV) / (DDVE + \frac{1}{2} EDPP + \frac{1}{2} EDSIV)]$ ; 3) velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP), que é a tangente máxima do movimento sistólico da parede posterior. A função diastólica do VE foi avaliada pelos seguintes índices: 1) pico de velocidade de fluxo de enchimento inicial (onda E); 2) pico de velocidade de fluxo de enchimento decorrente da contração atrial (onda A); 3) razão entre as ondas E e A; 4) tempo de relaxamento isovolumétrico.

## **Estudo do Músculo Isolado**

O desempenho mecânico do músculo papilar foi avaliado no dia seguinte à realização do ecocardiograma, de acordo com a técnica utilizada rotineiramente em nosso laboratório (Cicogna *et al.*, 1997; Cicogna *et al.*, 2000; Okoshi *et al.*, 2001; Gut *et al.*, 2003; Okoshi *et al.*, 2006). Após anestesia com pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.), os animais foram submetidos a toracotomia mediana. O coração foi rapidamente removido e colocado em solução de Krebs-Henseleit com a seguinte composição em mM: 118,5 NaCl; 4,69 KCl; 1,25 CaCl<sub>2</sub>; 1,16 MgSO<sub>4</sub>; 1,18 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 5,50 glicose; e 24,88 NaCO<sub>3</sub>. Esta solução foi mantida à temperatura de 28° C, previamente oxigenada durante 10 minutos com 95% de oxigênio e 5% de dióxido de carbono. A seguir, o átrio e o ventrículo direito

foram dissecados e o septo interventricular exposto. Este foi cortado ao meio a fim de permitir a exposição adequada dos dois músculos papilares do VE. Os músculos foram dissecados e o músculo com morfologia mais adequada teve suas extremidades presas a anéis de aço inoxidável e foi rapidamente transferido para câmara de vidro contendo a solução descrita acima, continuamente oxigenada e mantida à temperatura de 28°C, graças ao uso de banho circulante (*PAPST, K-5058*). O pH da solução foi mantido entre 7,38 a 7,42 e a pressão parcial de oxigênio entre 550 a 600 mmHg. O músculo foi posicionado verticalmente e sua extremidade inferior acoplada a fio de aço inoxidável (0,38 mm de diâmetro) conectado a transdutor de força (*Kyowa 120T 20B*). A porção superior do músculo foi conectada a um fio de aço, semelhante ao anterior, que estava ligado à extremidade do braço longo de uma alavanca isotônica. Sobre esta extremidade há um micrômetro que permite ajustar o comprimento de repouso do músculo. Na extremidade do braço curto da alavanca foi suspenso, por fio de aço, peso de 2,5 a 5,0 g, denominado pré-carga, que tem por finalidade promover o estiramento inicial do músculo papilar.

O músculo papilar foi estimulado 12 vezes por minuto por meio de eletrodos de platina tipo agulha (E8 - Grass), posicionados paralelamente ao eixo longitudinal do músculo. Os eletrodos foram acoplados a estimulador elétrico que emite estímulos em onda quadrada de 5 mili-segundos. A voltagem de estímulo utilizado, 12 a 15 volts, corresponde a valor 10% acima do mínimo necessário para provocar resposta mecânica máxima do músculo.

Após período de 60 minutos, no qual o músculo permaneceu sob contrações sem desenvolver força (contração isotônica), foi colocada pós-carga de 50 g. A carga total, pré-carga mais a pós-carga, impedia que o músculo encurtasse passando a desenvolver somente força (contração isométrica). Após a estabilização do músculo em contração isométrica, este foi progressivamente estirado, por meio do micrômetro, até a força desenvolvida atingir o seu valor máximo. O comprimento de estiramento da fibra muscular correspondente a força ou tensão máxima desenvolvida, em contração isométrica, denomina-se *L*<sub>max</sub>. Após atingir *L*<sub>max</sub>, o músculo foi novamente colocado em contração isotônica durante 5 minutos. A seguir, o músculo papilar foi recolocado em

contração isométrica, para determinação final de  $L_{max}$ . O registro das variáveis foi iniciado após verificar-se que o músculo permanecera estável em contração isométrica durante 15 minutos. Os seguintes parâmetros foram analisados: tensão desenvolvida (TD, g/mm<sup>2</sup>), tensão de repouso (TR, g/mm<sup>2</sup>), tempo para atingir o pico da tensão desenvolvida (TPT, ms), velocidade de variação da tensão desenvolvida (+dT/dt, g/mm<sup>2</sup>/s) e velocidade de variação de decréscimo da tensão desenvolvida (-dT/dt, g/mm<sup>2</sup>/s). As contrações isométricas foram registradas utilizando sistema de aquisição de dados computadorizado (*AcqKnowledge*® MP100, *Biopac Systems Inc.*). Com o objetivo de comparar o desempenho de músculos de tamanhos diferentes, os valores de TD, TR, +dT/dt e -dT/dt foram normalizados pela respectivas áreas seccionais.

As variáveis morfológicas utilizadas para caracterizar os músculos papilares foram: comprimento (mm), peso (mg) e área seccional (AS, mm<sup>2</sup>). O comprimento ( $L_{max}$ ) foi medido com auxílio de catetômetro *Gartner* (*Gartner Scientific Corporation*). A porção muscular entre os anéis de aço foi cortada, submetida à secagem com papel filtro e pesada. Considerando-se que o músculo papilar possui forma cilíndrica, é uniforme e apresenta peso específico aproximado de 1,0, a AS foi calculada dividindo-se o peso pelo comprimento.

O estudo funcional *in vitro* foi complementado por manobras que aumentam a contratilidade miocárdica, com a finalidade de avaliar a reserva contrátil. Após o período de estabilização em  $L_{max}$ , foi realizada a manobra de pós-pausa, que consiste em analisar a primeira contração muscular após determinado período de repouso (10, 30 e 60 segundos). Passados 10 minutos, foi trocada a solução nutriente de Krebs-Henseleit para outra com concentração extracelular de Ca<sup>++</sup> de 0,625 mM, deixando o músculo se estabilizar por 10 minutos; a seguir, foi iniciada elevação de cálcio para 1,25 mM, 2,5 mM e 5,0 mM, com cinco minutos de intervalo entre cada concentração. Após essas manobras, o músculo foi recolocado em solução nutriente com Ca<sup>++</sup> 1,25 mM, deixando-se estabilizar por 10 minutos antes de dar início à manobra de adição de isoproterenol, nas concentrações de 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup> e 10<sup>-6</sup> M, com 10 minutos de estabilização entre cada condição.

## Análise Histológica do Coração

Após a pesagem dos ventrículos direito e esquerdo, foram cortados fragmentos da parte central do VE, com 3 a 5 mm de espessura. O material foi imerso em formalina 10% neutra e tamponada, durante 48 h, a 4° C. A seguir, o tecido foi lavado, desidratado e incluído em parafina. Cortes histológicos com 5 a 7 µm de espessura foram submetidos à coloração por hematoxilina e eosina, para avaliação morfológica geral e quantificação da área seccional dos miócitos. Similarmente, lâminas contendo secções teciduais de 6 µm de espessura foram coradas por *picrosirius red*.

A análise morfométrica foi realizada utilizando-se câmara de vídeo acoplada a microscópio Leica, com objetiva 40 X, conectado a computador equipado com programa analisador de imagem (*Image-Pro Plus 3.0, Media Cybernetics*). Em secções transversas do VE, foram medidas as áreas seccionais dos miócitos de, no mínimo, 50 fibras cardíacas nas quais o núcleo era claramente identificado. As lâminas coradas por *picrosirius red* foram utilizadas para quantificação do conteúdo de colágeno intersticial miocárdico, avaliado por meio de videodensitometria. Retidas as imagens, os componentes do tecido cardíaco foram identificados, segundo o realce da cor. Os filamentos de colágeno refletiam a cor vermelha enquanto os miócitos eram vistos na coloração amarela. Áreas contendo vasos sanguíneos foram excluídas da análise.

O grau de hipertrofia ventricular foi avaliado pelos pesos dos ventrículos direito e esquerdo e pela normalização desses valores pelo peso corporal e também para o comprimento da tíbia. Após a retirada do coração do tórax, foram colhidos o pulmão e fragmentos do fígado para determinação da relação peso úmido/peso seco desses órgãos.

## Quantificação de Hidroxiprolina

A concentração miocárdica de hidroxiprolina foi mensurada em tecido miocárdico obtido da ponta do VE, de acordo com o método descrito por Switzer (1991), padronizado em nosso laboratório por Matsubara *et al.* (2000).

Inicialmente foram obtidas as soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina (diluição 60 µl HOP / 2940 µl HCl) e a solução branca (água destilada). Previamente à execução do processamento bioquímico, foi necessária a preparação dos seguintes reagentes químicos: tampão borato 0,2 M (pH 8,7), tiosulfato de sódio 3,6 M e o reagente de Ehrlich. O processamento bioquímico para determinação da concentração de hidroxiprolina foi iniciado por secagem das soluções-padrão e das amostras no concentrador de amostras (*Speed Vac*). A hidrólise ácida foi realizada mediante adição de HCl 6 N em cada um dos tubos das amostras, que foram aquecidas em estufa a 100° C por 8 horas. A oxidação foi realizada após retirada e resfriamento dos tubos da estufa. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 8000 rpm por 10 minutos e colocadas novamente no concentrador de amostras (*Speed Vac*) por 3 horas. Retiradas as amostras, adicionou-se 1 mL de água destilada e tamponadas com solução tampão borato 0,2 M pH 8,7; após 20 minutos, a reação foi inibida com a solução tiosulfato de sódio 3,6 M e as amostras agitadas. Posteriormente, a solução foi saturada com KCl e colocada em banho-maria a 90° C. Os tubos foram resfriados e adicionados 2,5 mL de tolueno e agitados por 5 minutos para a separação das fases água e tolueno. Retirou-se 1,5 mL de tolueno da solução, que foi colocado em tubos de hemólise e acrescentado 0,6 mL de solução de Ehrlich. As amostras foram mantidas em repouso por 30 minutos a fim de se alcançar a estabilidade do cromógeno. A leitura foi realizada por espectrofotometria com filtro de 565 nm.



## **Análise dos mRNAs dos genes alvo por RT-PCR**

A análise da expressão gênica dos genes alvo foi realizada por reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa semi-quantitativa (RT-PCR) em fragmentos da parede livre do VE (Wellner *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2006). Após a eutanásia, amostras de miocárdio foram imediatamente congeladas em nitrogênio e, a seguir, transferidas para freezer a -80° C, onde permaneceram até o estudo molecular.

## **Extração de RNA com TRIzol**

O fragmento muscular congelado foi homogeneizado em Polytron com TRIzol (1 mL de TRIzol/50-100 mg de tecido). O material insolúvel resultante da homogeneização foi retirado por centrifugação a 12.000 g por 10 min. a 4° C. Essa solução foi coletada e transferida para tubo de 1,5 mL e incubada por 5 min. à temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos núcleo-protéicos. A seguir, após incubação por 3 min. com 0,2 mL de clorofórmio por mL de TRIzol utilizado, o material foi centrifugado a 12.000 g por 15 min. a 4° C. A fase aquosa formada após a centrifugação do material foi separada e precipitada por meio de incubação com 0,5 mL de isopropanol (por mL de TRIzol utilizado inicialmente) por 10 min. A seguir, o material foi novamente centrifugado a 12.000 g. O sedimento formado foi lavado com 1 mL de etanol 75% (por mL de TRIzol utilizado inicialmente) e centrifugado a 7.500 g. O sedimento de RNA foi deixado secar à temperatura ambiente por 10 min, e a seguir foi ressuspenso em solução 0,01% de DEPC (dietilpirocarbonato) e incubado a 60° C por 10 min. para inativação de possíveis resíduos de RNase. O RNA foi, então, 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 também determinada, por espectrofotometria, a razão entre 260 e 280 nm, o que fornece uma estimativa da qualidade do processo de extração.

## Gel analítico de agarose para RNA

Para analisar a integridade do RNA, eletroforese (3 µL da solução contendo o RNA total) foi realizada em gel de agarose à voltagem de 80 mV.

## Transcrição reversa (RT) do RNA

A RT do RNA de cada amostra foi realizada utilizando-se os componentes do *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)*. Uma mistura contendo 4 µg de RNA total, 2 µL de 10x RT Buffer, 0,8 µL de 25x dNTP Mix 100 mM, 2 µL de 10x RT *Random Primers*, 1 µL de *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* (50 unidades/µL) e 1 µL de *RNase Inhibitor*, com volume total ajustado para 20 µL de *H<sub>2</sub>O Nuclease-Free*, foi incubada por 10 min. a 25° C, 120 min. a 37° C e 5 segundos a 85° C. A seguir, a mistura da reação foi colocada no gelo e estocada a -80° C.

## Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

Alíquotas de 2,5 µL cDNA de cada amostra foram adicionadas a uma mistura contendo 10 µL 2x *TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)* e 1 µL de ensaio customizado (20x) contendo *primers sense e antisense* e sonda *Taqman (Applied Biosystems)* específicos para cada gene. Foi adicionada água tratada com DEPC para se obter um volume final de 20 µL. As reações foram realizadas em triplicatas para cada gene alvo e para o gene constitutivo no Sistema *Real Time PCR StepOne® (Applied Biosystems)*, seguindo protocolo sugerido pelo fabricante: 1 ciclo a 95° C por 10 min. para ativação da *AmpliTaq Gold Enzyme*; 40 ciclos de desnaturação (95° C por 15 s) e anelamento-extenso (60° C por 1 min.). Para cada amostra foi plotado um gráfico de amplificação mostrando um aumento do *reporter dye* fluorescente (Rn) em cada ciclo da PCR. A partir desse gráfico, foi determinado o ciclo em que a reação atinge o limiar de detecção (*critical threshold cycle - C<sub>T</sub>*), baseado na variabilidade dos dados da linha de base obtidos a partir dos ciclos iniciais da PCR.

Os *primers* para os genes analisados foram obtidos através do *software Primer Express*® (Applied Biosystems), a partir de seqüências publicadas no *GenBank*. Os ensaios (*primer* + sonda) foram adquiridos diretamente do fabricante (Applied Biosystems). A quantificação relativa de cada gene, normalizada pela referência endógena (ciclofilina), foi realizada pelo método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

## Primers

Os oligonucleotídeos utilizados como *primers* para a reação de PCR do produto de RT do RNA total extraído do músculo cardíaco para os genes alvo foram os seguintes:

- isoforma  $\alpha$  da cadeia pesada de miosina (nº de acesso genbank: NM\_017230)
- isoforma  $\beta$  da cadeia pesada de miosina (nº de acesso genbank: NM\_017240)
- peptídeo natriurético atrial (nº de acesso genbank: M27498)
- enzima ATPase de cálcio do retículo sarcoplasmático (nº de acesso genbank: NM\_017290)
- ciclofilina (nº de acesso genbank: NM\_017101) - gene constitucional.

## **Análise Estatística**

Os dados numéricos são expostos como média  $\pm$  desvio padrão (distribuição normal) ou mediana e percentis 25% e 75% (distribuição não-normal). As comparações entre os grupos foram realizadas por teste *t* de Student ou teste de Mann-Whitney, de acordo com distribuição normal ou não normal, respectivamente. A mortalidade foi avaliada por meio de teste de *log-rank* (curva de Kaplan Meier). Os resultados são discutidos no nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

A análise do estudo funcional do músculo isolado após realização das diferentes manobras inotrópicas foi realizada por ANOVA de medidas repetidas de dois fatores independentes e complementada com teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls.

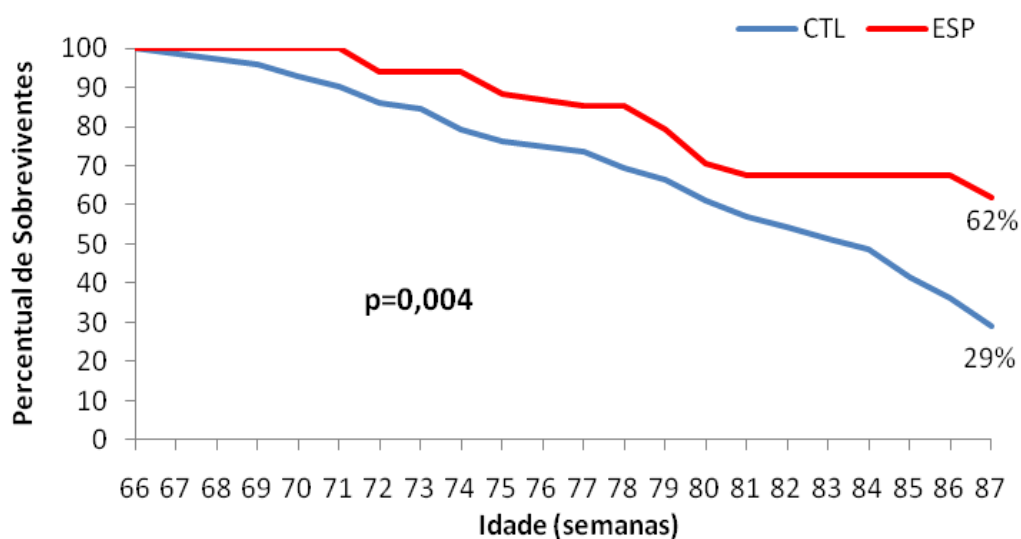
## **RESULTADOS**

Neste estudo foram utilizados 72 animais para o grupo controle e 34 para o grupo tratado com espironolactona, resultando em 21 animais em cada grupo que sobreviveram até o final do experimento.

Todos os ratos que morreram antes do término do período experimental apresentavam sinais compatíveis com o diagnóstico *in vivo* de IC.

Dentre os 21 animais sobreviventes de cada grupo, os dois grupos apresentaram a mesma porcentagem de animais com diagnóstico confirmado de insuficiência cardíaca (76,2%) por variáveis clínicas e anátomo-patológicas.

Os animais do grupo CTL apresentaram mortalidade de 71% e o grupo ESP de 38% no decorrer do experimento. Houve diferença estatisticamente significativa na mortalidade entre os grupos ( $p=0,004$ ). As curvas de sobrevida dos grupos, conforme a idade dos animais, estão expostas no Gráfico 1.



**Gráfico 1.** Probabilidade de sobrevida (curva de Kaplan-Meier: log-rank). CTL: grupo controle; ESP: grupo espironolactona.

## Peso Corporal

Na Tabela 1 estão expostos os valores de peso corporal dos animais. Pode-se observar que os mesmos não apresentaram diferença significativa quando a comparação foi realizada no momento inicial ou final; no entanto, ambos os grupos

apresentaram redução significativa do peso corporal em relação ao respectivo peso inicial.

**Tabela 1.** Peso corporal dos animais

Variáveis	CTL (n=21)	ESP (n=21)	Valor P
PC inicial (g)	393 ± 23	393 ± 27	0,985
PC final (g)	347 ± 34*	348 ± 33*	0,975

Dados expressos em média e desvio padrão. CTL: grupo controle; ESP: grupo espironolactona; PC: peso corporal. \*:  $p < 0,05$  vs. PC inicial dentro do mesmo grupo (teste  $t$  pareado de Student); Valor P: resultado do teste estatístico CTL vs. ESP (teste  $t$  de Student para amostras independentes).

## Pressão Arterial Sistólica

Na Tabela 2 são mostrados os resultados da pressão arterial sistólica (PAS), segundo tratamento e momento de avaliação. Nos momentos inicial e final, os grupos apresentaram valores semelhantes. Não houve diferença também nos valores da PAS dentro do mesmo grupo em diferentes momentos.

**Tabela 2.** Pressão arterial sistólica (PAS) no início e no final do experimento

Variáveis	CTL (n=21)	ESP (n=21)	Valor P
PAS inicial (mmHg)	206 ± 17	215 ± 21	0,259
PAS final (mmHg)	199 ± 43	200 ± 35	0,932

Dados expressos em média e desvio padrão. CTL: grupo controle; ESP: grupo espironolactona.

## Avaliação Ecocardiográfica

O ecocardiograma transtorácico foi realizado no início e no final do período experimental. No período inicial, não observamos diferenças estatisticamente significantes nas variáveis estruturais e funcionais entre os animais utilizados para compor os dois grupos. Na Tabela 3 estão apresentados os valores das variáveis estruturais cardíacas obtidos no final do experimento. Não houve diferença entre os grupos nas variáveis estruturais analisadas.

Os resultados da avaliação funcional do VE por meio do ecocardiograma estão expostos nas Tabelas 4 e 5. Não houve diferença entre os grupos em relação às funções sistólica e diastólica do VE.

**Tabela 3.** Análise ecocardiográfica das variáveis estruturais do coração ao final do experimento

Variáveis	CTL (n=11)	ESP (n=19)	Valor P
PC (g)	369 ± 25	351 ± 31	0,128
FC (bpm)	329 ± 29	334 ± 28	0,665
DDVE (mm)	8,87 ± 1,26	8,66 ± 1,13	0,641
DDVE/PC (mm/kg)	24,1 ± 3,52	24,8 ± 3,72	0,637
DSVE (mm)	4,85 ± 1,58	4,96 ± 1,35	0,849
EDPP (mm)	1,93 ± 0,14	1,82 ± 0,15	0,059
EDSIV (mm)	1,94 ± 0,13	1,86 ± 0,15	0,189
AO (mm)	4,97 ± 0,34	4,78 ± 0,40	0,199
AE (mm)	7,52 ± 1,42	7,65 ± 1,30	0,802
Massa VE (g)	1,45 ± 0,39	1,31 ± 0,36	0,338
Massa VE/PC (g/kg)	3,93 ± 1,07	3,74 ± 1,08	0,641
Esp. Rel. VE	0,44 ± 0,07	0,42 ± 0,06	0,473

Valores expressos em média e desvio padrão. CTL: grupo controle; ESP: grupo espirolactona; PC: peso corporal; FC: frequência cardíaca; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (VE); DSVE: diâmetro sistólico do VE; EDPP: espessura diastólica da parede posterior do VE; EDSIV: espessura diastólica do septo interventricular; AO: diâmetro de aorta; AE: diâmetro do átrio esquerdo; Esp. Rel. VE: espessura relativa do VE.

**Tabela 4.** Avaliação da função sistólica do ventrículo esquerdo por ecocardiograma ao final do experimento

Variáveis	CTL (n=11)	ESP (n=19)	Valor P
%Δ endo	46,4 ± 10,9	43,7 ± 8,81	0,453
%Δ meso	26,8 ± 5,65	25,2 ± 4,93	0,426
VEPP (mm/s)	33,2 ± 6,73	29,7 ± 4,78	0,115

Valores expressos em média e desvio padrão. CTL: grupo controle; ESP: grupo espirolactona; %Δ endo: porcentagem de encurtamento endocárdico do VE; %Δ meso: porcentagem de encurtamento mesocárdico; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior do VE.



**Tabela 5.** Avaliação da função diastólica do ventrículo esquerdo por ecocardiograma ao final do experimento

Variáveis	CTL (n=11)	ESP (n=19)	Valor P
Onda E (cm/s)	57,0 (47,5–86,8)	70,0 (52,0–125)	0,464
Onda A (cm/s)	82,4 ± 35,7	69,0 ± 34,3	0,320
E/A	0,63 (0,54–0,74)	0,71 (0,59–3,65)	0,606
TRIV (ms)	36,5 ± 7,08	38,7 ± 4,68	0,327

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75%. CTL: grupo controle; ESP: grupo espironolactona; E/A: razão entre picos de velocidade de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico.

## Estudo Funcional do Músculo Isolado

A Tabela 6 apresenta os dados funcionais do músculo papilar obtidos em condição basal com concentração extracelular de cálcio de 1,25 mM. Os resultados indicam que a espironolactona não acarretou alteração funcional, desde que as variáveis analisadas apresentaram comportamento semelhante entre os grupos.

**Tabela 6.** Variáveis funcionais obtidas em contrações isométricas na condição basal

Variáveis	CTL (n=18)	ESP (n=20)	Valor P
TD (g/mm <sup>2</sup> )	4,49 ± 1,79	4,70 ± 1,67	0,706
TR (g/mm <sup>2</sup> )	0,88 ± 0,24	0,89 ± 0,28	0,918
TPT (ms)	221 ± 16	218 ± 17	0,611
+dT/dt (g/mm <sup>2</sup> /s)	38,0 ± 17,9	39,1 ± 15,7	0,838
-dT/dt (g/mm <sup>2</sup> /s)	19,0 ± 6,28	19,5 ± 5,66	0,779

Valores expressos em média e desvio padrão. CTL: grupo controle; ESP: grupo espironolactona; TD: tensão desenvolvida; TR: tensão de repouso; TPT: tempo para atingir o pico da tensão desenvolvida; +dT/dt: velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida; -dT/dt: velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida.

As Tabelas 7, 8 e 9 apresentam as variáveis funcionais obtidas em contrações isométricas após manobras inotrópicas: contração pós-pausa, elevação da concentração extracelular de cálcio e adição de isoproterenol, respectivamente.

O comportamento funcional dos músculos após as manobras inotrópicas não foi diferente entre os grupos.

**Tabela 7.** Variáveis funcionais obtidas em contrações isométricas em manobra pós-pausa

		TD (g/mm <sup>2</sup> )	TR (g/mm <sup>2</sup> )	TPT (ms)	+dT/dt (g/mm <sup>2</sup> /s)	-dT/dt (g/mm <sup>2</sup> /s)
CTL	PP 10"	4,92 ± 1,91	0,89 ± 0,24	222 ± 12	41,2 ± 19,1	19,9 ± 6,61
	PP 30"	5,33 ± 2,01	0,89 ± 0,24	226 ± 11	45,3 ± 19,9	20,4 ± 5,82
	PP 60"	5,32 ± 2,09	0,87 ± 0,26	224 ± 5	45,7 ± 21,5	20,3 ± 5,66
ESP	PP 10"	5,07 ± 1,80	0,90 ± 0,29	228 ± 16,9	42,2 ± 17,2	20,0 ± 5,98
	PP 30"	5,34 ± 1,97	0,87 ± 0,27	228 ± 14	44,7 ± 19,2	20,0 ± 5,77
	PP 60"	5,40 ± 2,03	0,84 ± 0,27	230 ± 12	45,1 ± 20,00	20,1 ± 10,7

Valores expressos em média e desvio padrão. CTL: grupo controle; ESP: grupo espironolactona; PP: pós-pausa; TD: tensão desenvolvida; TR: tensão de repouso; TPT: tempo para atingir o pico da tensão desenvolvida; +dT/dt: velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida; -dT/dt: velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida. A manobra inotrópica não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p>0,05$ ).

**Tabela 8.** Variáveis funcionais obtidas em contrações isométricas em manobra de elevação da concentração extracelular de cálcio

		TD (g/mm <sup>2</sup> )	TR (g/mm <sup>2</sup> )	TPT (ms)	+dT/dt (g/mm <sup>2</sup> /s)	-dT/dt (g/mm <sup>2</sup> /s)
CTL	0,625	3,33 ± 1,41	0,77 ± 0,24	222 ± 8	26,9 ± 12,1	15,1 ± 5,24
	1,25	4,46 ± 1,84	0,77 ± 0,25	214 ± 8	38,5 ± 19,5	19,4 ± 6,46
	2,5	5,15 ± 1,80	0,77 ± 0,24	204 ± 11	47,3 ± 20,1	21,4 ± 5,59
	5,0	5,19 ± 1,60	0,81 ± 0,26	202 ± 10	48,4 ± 17,5	21,1 ± 5,24
ESP	0,625	3,61 ± 1,44	0,80 ± 0,27	218 ± 15	29,2 ± 12,1	16,4 ± 5,61
	1,25	4,66 ± 1,70	0,80 ± 0,27	220 ± 15	40,7 ± 17,3	20,3 ± 6,30
	2,5	5,29 ± 1,71	0,79 ± 0,30	210 ± 20	49,6 ± 19,4	22,3 ± 6,54
	5,0	5,29 ± 1,62	0,82 ± 0,29	208 ± 18	50,6 ± 18,4	21,7 ± 6,17

Valores expressos em média e desvio padrão. CTL: grupo controle; ESP: grupo espironolactona; TD: tensão desenvolvida; TR: tensão de repouso; TPT: tempo para atingir o pico da tensão desenvolvida; +dT/dt: velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida; -dT/dt: velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida. A manobra inotrópica não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p>0,05$ ).

**Tabela 9.** Variáveis funcionais obtidas em contrações isométricas após adição de isoproterenol à solução nutriente

		TD (g/mm <sup>2</sup> )	TR (g/mm <sup>2</sup> )	TPT (ms)	+dT/dt (g/mm <sup>2</sup> /s)	-dT/dt (g/mm <sup>2</sup> /s)
CTL	ISO 10 <sup>-8</sup>	4,30 ± 1,76	0,75 ± 0,24	190 ± 12	40,0 ± 16,9	19,0 ± 6,15
	ISO 10 <sup>-7</sup>	4,09 ± 1,85	0,74 ± 0,24	162 ± 14	43,5 ± 20,8	23,0 ± 6,49
	ISO 10 <sup>-6</sup>	3,92 ± 1,82	0,72 ± 0,24	156 ± 8	44,7 ± 22,9	27,6 ± 10,3
ESP	ISO 10 <sup>-8</sup>	4,32 ± 1,62	0,76 ± 0,27	200 ± 18	41,8 ± 17,5	19,8 ± 6,78
	ISO 10 <sup>-7</sup>	3,91 ± 1,69	0,74 ± 0,26	168 ± 10	43,1 ± 19,1	22,6 ± 9,60
	ISO 10 <sup>-6</sup>	3,75 ± 1,66	0,73 ± 0,28	154 ± 13	44,4 ± 20,3	26,4 ± 11,1

Valores expressos em média e desvio padrão. CTL: grupo controle; ESP: grupo espironolactona; ISO: isoproterenol; TD: tensão desenvolvida; TR: tensão de repouso; TPT: tempo para atingir o pico da tensão desenvolvida; +dT/dt: velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida; -dT/dt: velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida. A manobra inotrópica não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p>0,05).

## Características Morfológicas do Tecido Cardíaco

A Tabela 10 apresenta os resultados dos parâmetros corporais dos animais, como pesos de VE, VD, átrios, fígado e pulmão e suas relações úmido/seco. Não observamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Os pesos do VE, VD e átrios normalizados para peso corporal e comprimento da tibia também não se mostraram diferentes.

**Tabela 10.** Parâmetros corporais dos animais

Variáveis	CTL (n=21)	ESP (n=21)	Valor P
PC (g)	347 ± 34	348 ± 33	0,975
Tíbia (cm)	4,28 ± 0,08	4,27 ± 0,09	0,714
VE (g)	1,19 ± 0,19	1,22 ± 0,20	0,654
VE/PC (g/kg)	3,41 ± 0,42	3,51 ± 0,57	0,552
VE/tíbia (mg/cm)	278 ± 46	285 ± 47	0,628
VD (g)	0,36 ± 0,09	0,37 ± 0,10	0,808
VD/PC (g/kg)	1,06 ± 0,27	1,07 ± 0,28	0,848
VD/tíbia (mg/cm)	85,1 ± 21,1	87,0 ± 23,2	0,780
Átrios (g)	0,20 ± 0,06	0,20 ± 0,05	0,966
Átrios/PC (g/kg)	0,59 ± 0,18	0,59 ± 0,15	0,972
Átrios/tíbia (mg/cm)	47,7 ± 15,0	47,6 ± 11,8	0,992
VE úmido/seco	4,26 ± 0,28	4,30 ± 0,18	0,601
VD úmido/seco	4,24 ± 0,60	4,27 ± 0,54	0,868
Átrios úmido/seco	4,66 ± 0,26	4,81 ± 0,26	0,069
Pulmão úmido/seco	5,21 ± 0,42	5,32 ± 0,47	0,458
Fígado úmido/seco	3,33 ± 0,30	3,27 ± 0,28	0,470

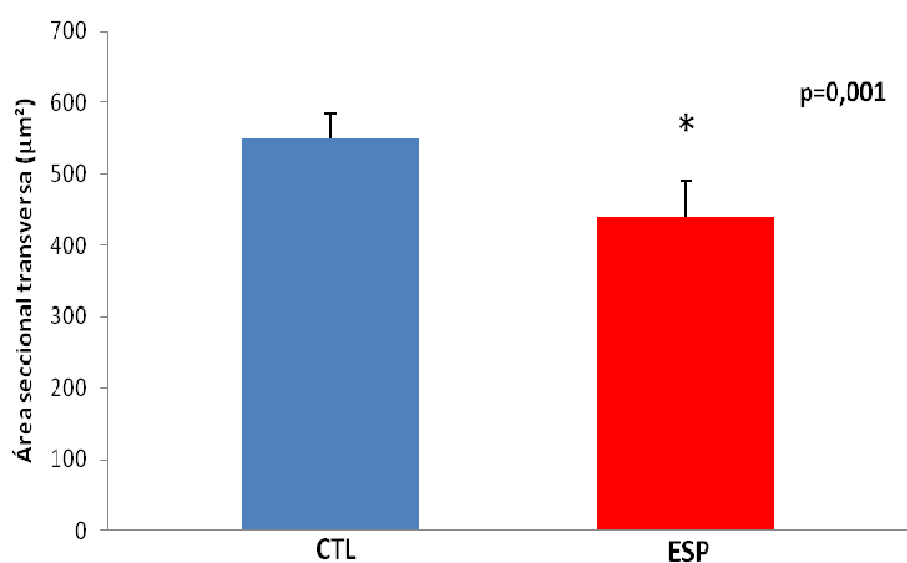
Valores expressos em média e desvio padrão. CTL: grupo controle; ESP: grupo espirolactona; PC: peso corporal; Tíbia: comprimento da tíbia; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito.

A Tabela 11 mostra os valores relativos à quantificação de hidroxiprolina, fração de colágeno intersticial miocárdica e área seccional transversa do cardiomiócito do VE. Os valores obtidos da quantificação de hidroxiprolina e da fração colágena miocárdica não foram estatisticamente diferentes entre os grupos. A avaliação da área do miócito mostrou que o grupo CTL apresenta maior hipertrofia em relação ao grupo ESP ( $p=0,001$ ), como mostrado também no Gráfico 2.

**Tabela 11.** Avaliação bioquímica e morfométrica do tecido cardíaco

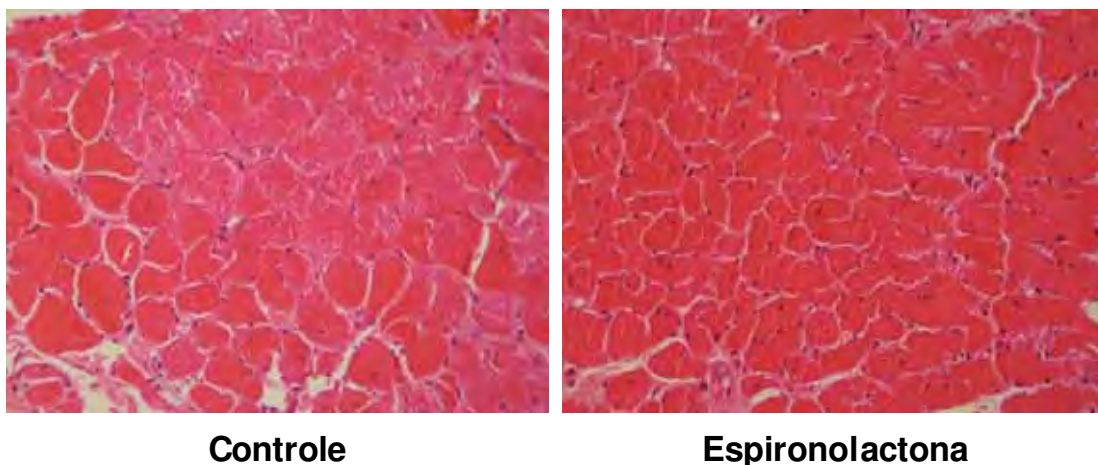
Variáveis	CTL (n=8)	ESP (n=8)	Valor P
HOP VE (mg/g)	7,11 ± 1,65	7,18 ± 1,74	0,928
FCI (%)	8,20 ± 3,00	9,90 ± 6,30	0,535
AST (µm²)	550 ± 34	440 ± 51	0,001

Valores expressos em média e desvio padrão. CTL: grupo controle; ESP: grupo espironolactona; HOP: hidroxiprolina; VE: ventrículo esquerdo; FCI: fração de colágeno intersticial; AST: área seccional transversa do cardiomiócito.



**Gráfico 2.** Área seccional transversa do cardiomiócito do ventrículo esquerdo. CTL: grupo controle; ESP: grupo espironolactona.

Na Figura 1, observa-se ilustração representativa das áreas seccionais transversas dos miócitos dos animais controle e espironolactona.



**Figura 1.** Cortes histológicos transversais do miocárdio do ventrículo esquerdo dos animais controle e espironolactona corados por hematoxilina e eosina. Objetiva 40 X.

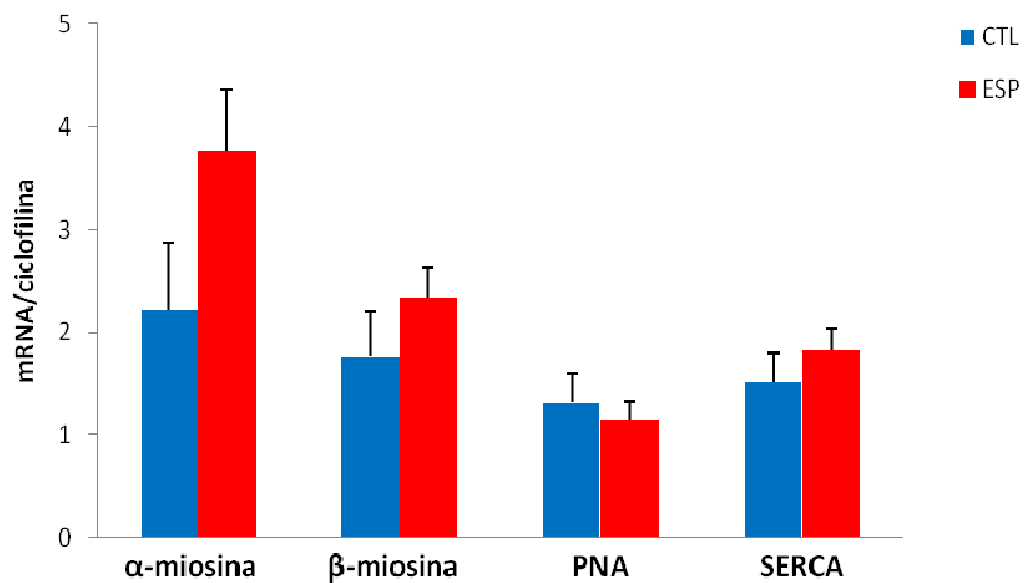
## Análise da Expressão Gênica por RT-PCR

A Tabela 12 mostra os dados da avaliação da expressão gênica por RT-PCR em tempo real. A análise da expressão dos genes para  $\alpha$ -miosina,  $\beta$ -miosina, relação  $\alpha/\beta$ -miosina, peptídeo natriurético atrial (PNA) e  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA) não mostrou diferença estatística entre os grupos. Os dados também são apresentados no Gráfico 3.

**Tabela 12.** Avaliação da expressão gênica por RT-PCR em tempo real

Variáveis	CTL (n=8)	ESP (n=7)	Valor P
$\alpha$ -miosina	$2,22 \pm 1,85$	$3,77 \pm 1,57$	0,108
$\beta$ -miosina	$1,77 \pm 1,25$	$2,34 \pm 0,77$	0,311
$\alpha/\beta$ -miosina	$1,18 \pm 0,76$	$1,67 \pm 0,81$	0,241
PNA	$1,32 \pm 0,77$	$1,15 \pm 0,47$	0,627
SERCA	$1,52 \pm 0,80$	$1,83 \pm 0,52$	0,385

Valores expressos em média e desvio padrão (unidade arbitrária). CTL: grupo controle; ESP: grupo espironolactona; PNA: peptídeo natriurético atrial; SERCA:  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático. Valores normalizados pela expressão da ciclofilina.



**Gráfico 3.** Expressão gênica por RT-PCR em tempo real em miocárdio do ventrículo esquerdo (média e erro padrão). CTL: grupo controle; ESP: grupo espironolactona; PNA: peptídeo natriurético atrial; SERCA: enzima ATPase de cálcio do retículo sarcoplasmático. Sem diferença estatística entre os grupos.

## **DISCUSSÃO**



Neste estudo avaliamos os efeitos da administração crônica de espironolactona, iniciada antes do surgimento de sinais clínicos sugestivos de IC, sobre a mortalidade e remodelação cardíaca de ratos espontaneamente hipertensos.

Sabe-se que ratos SHR podem apresentar sinais clínicos de IC a partir dos 18 meses de idade (Bing *et al.*, 2002); portanto, optamos por iniciar o tratamento com espironolactona a partir dos 16 meses de idade, e mantê-lo por longo período (6 meses). Com 16 meses de idade, nenhum animal do nosso estudo apresentou qualquer sinal que pudesse sugerir a presença de IC. Os ecocardiogramas realizados antes do início do tratamento tiveram como objetivo determinar a homogeneidade dos grupos quanto à estrutura e função cardíaca. Adicionalmente, avaliamos os animais semanalmente à procura de evidência de IC e determinamos a mortalidade durante todo o período experimental.

A avaliação do peso corporal dos animais dos grupos CTL e ESP, ao final do período experimental, não mostrou diferença entre os grupos. No entanto, houve diminuição do peso final em relação ao inicial dentro do mesmo grupo, provavelmente porque grande parte dos animais estava em IC ao final do período experimental, com comprometimento do estado geral compatível com caquexia cardíaca (Bing *et al.*, 1995; Boluyt & Bing, 2000; Okoshi *et al.*, 2001).

A pressão arterial não foi estatisticamente diferente entre os grupos durante o período experimental, concordando com estudo em ratos SHR que utilizou a mesma concentração do fármaco na ração e não obteve alteração da pressão arterial (Kambara *et al.*, 2003). A ausência de diferença da pressão arterial entre os grupos permitiu excluir essa variável de suas possíveis repercussões no processo de remodelação cardíaca.

Por meio do ecocardiograma foram analisadas variáveis estruturais do coração e parâmetros de função sistólica e diastólica. Após o período de 6 meses de tratamento, não foi possível observar diferenças entre os grupos. Esses resultados estão em acordo com o estudo de Kambara *et al.* (2003). Os autores avaliaram o efeito da mesma dose de espironolactona utilizada em nosso estudo, em ratos SHR com IC, por período de 12 semanas, e não observaram alterações ecocardiográficas em relação aos controles. Em humanos, a avaliação

ecocardiográfica do estudo de Barr *et al.* (1995) mostrou que pacientes com IC em classes funcionais II e III (NYHA), tratados com espironolactona, apresentaram funções sistólica e diastólica inalteradas. Nesse estudo, os autores não fazem referência às estruturas cardíacas avaliadas por ecocardiograma, o que nos faz supor que, da mesma forma que a função sistólica e diastólica, não houve alteração nas variáveis estruturais cardíacas. Nos importantes estudos RALES e EPHESUS, que contribuíram para modificar o tratamento de pacientes com IC, não foi realizada avaliação estrutural ou funcional do coração após tratamento com bloqueador da aldosterona (Pitt *et al.*, 1999; Pitt *et al.*, 2003). Por outro lado, estudos com diferentes modelos de indução de IC, e mesmo em pacientes, têm demonstrado que o bloqueio da aldosterona reduz a dimensão de variáveis estruturais e melhora variáveis funcionais cardíacas (Veliotis *et al.*, 2005; Urabe *et al.*, 2006; Chan *et al.*, 2007). Interessantemente, em modelo de IC por sobrecarga pressórica persistente, a introdução de espironolactona, logo após a cirurgia para indução de estenose da aorta ascendente, causou dilatação e disfunção sistólica do VE em relação àqueles que não receberam o fármaco (Okoshi *et al.*, 2008; Okoshi *et al.*, 2009). Adicionalmente, o bloqueio da aldosterona atenuou o desenvolvimento de fibrose miocárdica. Esses resultados sugerem a importância do tecido colágeno na manutenção da arquitetura da câmara ventricular durante aumento persistente da pressão intraventricular. Dessa forma, os efeitos do bloqueio da aldosterona na estrutura e função cardíaca podem envolver fatores ainda não totalmente esclarecidos e que, provavelmente, inclui o momento em que o bloqueio da aldosterona é iniciado em relação à agressão cardíaca, bem como o tipo de agressão.

A análise da função do músculo papilar mostrou que os dois grupos tiveram comportamento funcional semelhante. Pode-se observar que não houve diferença entre os valores de TD, TR, TPT,  $+dT/dt$ ,  $-dT/dt$  entre os grupos na condição basal. Após a realização das três manobras inotrópicas, contração pós-pausa, aumento da concentração extracelular de cálcio e adição de isoproterenol à solução nutriente, os grupos experimentais mantiveram comportamento semelhante. Nossos resultados são concordantes com aqueles obtidos por Miric *et al.* (2001), em estudo com ratos com miocardiopatia diabética induzida por

estreptozotocina. Os autores observaram que o tratamento com espironolactona por 4 semanas não induziu melhora da função miocárdica ou ventricular do VE desses animais, avaliadas por análise funcional do músculo papilar e do coração isolado, respectivamente. Os dados do músculo isolado do nosso estudo estão de acordo com os achados do exame ecocardiográfico, demonstrando que não há melhora da contratilidade ou do relaxamento miocárdico no grupo tratado com espironolactona.

Os parâmetros corporais analisados mostraram que o coração dos animais apresentou pesos semelhantes, como observado nos valores de VE, VD e átrios. Além disso, foi possível verificar que não houve diferença entre os grupos em relação ao peso úmido/peso seco dos ventrículos, átrios, pulmão e fígado. Esses achados nos permitem afirmar que a espironolactona não alterou o grau de hipertrofia dos ventrículos e átrios e também não alterou o teor de água naqueles tecidos. Da mesma forma, Susic *et al.* (2005), utilizando o bloqueador de aldosterona eplerenone por 12 semanas em ratos SHR com 22 semanas de idade, não observaram diferença em relação a massa ventricular esquerda, direita e átrios. A ausência de alterações nas variáveis anatômicas de nosso estudo também reforça os achados do ecocardiograma e do estudo funcional do músculo isolado.

As avaliações de colágeno pelas técnicas de hidroxiprolina e por lâminas coradas por *picrosirius red* não apresentaram diferença entre os grupos, corroborando os artigos que também não observaram diferenças significantes com bloqueadores da aldosterona (Mandarim-de-Lacerda & Pereira, 2002; Susic *et al.*, 2005; Simko *et al.*, 2009). Mandarim-de-Lacerda & Pereira (2002), estudando ratos SHR com 20 semanas de idade, tratados com espironolactona em três doses (baixa - 5 mg/kg/dia, moderada - 10 mg/kg/dia e alta - 30 mg/kg/dia) por 13 semanas, não mostraram alterações significantes na estrutura miocárdica do VE e na distribuição do colágeno perivascular e intersticial miocárdica. Por outro lado, vários estudos têm demonstrado redução do colágeno miocárdico após bloqueio da aldosterona (MacFadyen *et al.*, 1997; Zannad *et al.*, 2000; Veliotis *et al.*, 2005; MacDonald *et al.*, 2007). Ausência de alteração na análise do

colágeno miocárdica está de acordo com a ausência de alterações da função diastólica observadas nos estudos ecocardiográfico e de músculo isolado.

Em relação ao estudo histológico do tecido miocárdico corado por hematoxilina e eosina, o grupo tratado com espironolactona apresentou menor área seccional do cardiomiócito em relação ao grupo CTL. Sabe-se que a aldosterona estimula a hipertrofia miocitária em cultura de cardiomiócitos de ratos recém-nascidos (Okoshi *et al.*, 2004). No entanto, a ausência de efeito da espironolactona sobre o cardiomiócito hipertrófico é descrita em vários trabalhos disponíveis na literatura (Brilla *et al.*, 1993; Mandarin-de-Lacerda & Pereira, 2002; Baumann *et al.*, 2007). Em nosso estudo, apesar do achado de menor área seccional do miócito no grupo ESP, não observamos indícios ecocardiográficos ou anatômicos *post-mortem* de menor grau de hipertrofia nos animais tratados com espironolactona.

A remodelação cardíaca pode ser acompanhada, dentre outros fatores, pelas modificações na expressão de várias proteínas no cardiomiócito, como as cadeias pesadas de miosina, PNA, SERCA, entre outras. A molécula de miosina é composta por um par de cadeias pesadas (MHC),  $\alpha$  e/ou  $\beta$ . Três isoformas são expressas no cardiomiócito, diferindo na composição de MHC:  $\alpha\alpha$  em V1,  $\alpha\beta$  em V2 e  $\beta\beta$  em V3. Estas isoformas estão relacionadas com a atividade ATPásica do músculo e, portanto, com a velocidade de encurtamento das miofibrilas. A isoforma V1 apresenta alta atividade ATPásica com conseqüente alta velocidade de contração. Por outro lado, a isoforma V3 apresenta baixa atividade ATPásica e baixa velocidade de contração. A V2 é uma isoforma com característica intermediária entre V1 e V3 (Baldwin & Haddad, 2001; Alpert *et al.*, 2002). O rato SHR apresenta, durante o crescimento, remodelação ventricular com intensificação progressiva do grau de hipertrofia ventricular, alterações na composição de isoformas de MHC, com decréscimo da isoforma V1 e aumento das isoformas V2 e V3 (Swynghedauw, 1999; Compagno *et al.*, 2001; Bing *et al.*, 2002). Em relação ao PNA e a SERCA, estudos experimentais e em humanos com hipertrofia ventricular e IC têm mostrado elevação da expressão gênica do PNA e redução da SERCA (Ruskoaho, 1992; Colucci, 1997; Houser & Margulies, 2003). O PNA é sintetizado principalmente em decorrência de dilatação atrial e apresenta

propriedades hemodinâmicas benéficas na IC, como natriurese e vasodilatação (Stoupakis & Klapholz, 2003). A SERCA é uma proteína fundamental no processo excitação-contracção, e a principal função é a captação do íon cálcio do citoplasma para o retículo sarcoplasmático, permitindo assim o relaxamento miocárdico e o restabelecimento do estoque intracelular de cálcio para a contracção (Opie, 2008). Em condições patológicas, como hipertrofia ventricular e IC, ocorrem redução na expressão da SERCA, com conseqüente comprometimento da contracção e do relaxamento miocárdico (Arai *et al.*, 1994; Opie, 2008). No nosso estudo, análises de expressão gênica da  $\alpha$ -miosina,  $\beta$ -miosina, relação  $\alpha/\beta$ -miosina, PNA e SERCA por RT-PCR não mostraram diferenças estatisticamente significante entre os grupos. Portanto, também não demonstramos efeito benéfico da espironolactona na expressão de genes relacionados à remodelação cardíaca. Esses resultados também são concordantes com a ausência de efeito da espironolactona sobre as variáveis estruturais cardíacas avaliadas *in vivo* e *in vitro*.

Os resultados apresentados em relação à mortalidade são bem distintos de um grupo para outro (CTL: 71%; ESP: 38%), mostrando que a espironolactona reduziu a ocorrência de morte sem, no entanto, interferir na evolução natural da remodelação cardíaca decorrente da cardiopatia hipertensiva. Todos os animais que morreram no decorrer do experimento apresentavam dois ou mais sinais *in vivo* relacionados à IC; portanto, é possível afirmar que esses animais morreram por progressão da IC evoluindo para choque cardiogênico ou morte súbita. Os estudos clínicos RALES (Pitt *et al.*, 1999) e EPHESUS (Pitt *et al.*, 2003), que mostraram diminuição da mortalidade em 30% e 21% com o uso de bloqueadores da aldosterona em pacientes com IC, respectivamente, identificaram também redução significativa na ocorrência de morte súbita por causas cardíacas. Barr *et al.* (1995) estudaram o efeito da espironolactona (50-100 mg/dia) por 8 semanas, em pacientes com IC classes funcionais II e III da NYHA, que já estavam sob tratamento com diurético de alça e inibidor de enzima conversora da angiotensina. Os autores observaram maior concentração sérica de magnésio, menor excreção urinária de magnésio e potássio e menor ocorrência de arritmias ventriculares em *Holter* de 24 horas nos pacientes que receberam espironolactona. Ramires *et al.* (2000) avaliaram o efeito da espironolactona em

pacientes com IC em classe funcional III por 20 semanas e observaram redução da frequência de extrassístoles ventriculares e episódios de taquicardia ventricular não sustentada. Além disso, os autores observaram redução significativa da arritmia ventricular ao teste ergométrico nos pacientes com espironolactona. Yee *et al.* (2001) também observaram efeito anti-arrítmico da espironolactona. Esses autores estudaram o efeito da espironolactona, 50 mg/dia por 4 semanas, em pacientes com IC em classes funcionais II a IV que estavam sob tratamento com diurético e inibidor da enzima conversora de angiotensina. A espironolactona causou redução da frequência cardíaca, melhora da variabilidade R-R e redução do intervalo Q-T e da dispersão Q-T, que são indicativos de aumento do tônus parassimpático. Uma vez que o aumento da dispersão Q-T indica heterogeneidade elétrica, o resultado do estudo acima poderia sugerir que a espironolactona pode ter propriedades que reduzem arritmias malignas (Yee *et al.*, 2001).

Sabe-se que a produção de aldosterona está aumentada em condições de hipertrofia cardíaca e de IC, sendo relatados diversos efeitos desse hormônio nos canais de íons cardíacos, podendo induzir remodelação elétrica por modificação da densidade e/ou função dos canais iônicos e causar arritmias cardíacas (Pitt *et al.*, 1999; Delcayre & Swynghendauw, 2002; Pitt *et al.*, 2003; Muto *et al.*, 2007). A aldosterona aumenta a corrente dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-L e diminui o trânsito de saída de  $\text{K}^+$  ( $I_{\text{to}}$ ) nos miócitos ventriculares de ratos adultos (Benitah & Vassort, 1999; Benitah *et al.*, 2001); além disso, aumenta a entrada rápida de  $\text{Na}^+$  nos miócitos ventriculares de camundongos adultos (Boixel *et al.*, 2006). Lalevée *et al.* (2005) mostraram que a aldosterona aumenta a frequência de contrações nos cardiomiócitos de ratos recém-nascidos por aumento da corrente pelos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-T e tipo-L decorrente de estimulação da expressão gênica. A expressão de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  ATPase foi também aumentada em miócitos de ratos recém-nascidos tratados com aldosterona (Ikeda *et al.*, 1991).

O estudo de Muto *et al.* (2007) mostrou, em cultura de células, que a aldosterona aumenta a frequência de contrações espontâneas nos miócitos ventriculares de ratos recém-nascidos; além disso foi demonstrado que a aldosterona aumenta a expressão gênica dos canais  $I_f$  nessas células. O aumento

da expressão gênica dos canais  $I_f$  foi também observado em miócitos ventriculares de pacientes com IC e em miócitos hipertrofiados de ratos com sobrecarga pressórica, por hipertensão arterial ou estenose aórtica (Cerbai *et al.*, 1996; Cerbai *et al.*, 1997; Hoppe *et al.*, 1998; Fernandez-Velasco *et al.*, 2003), situações nas quais a concentração de aldosterona está elevada. Sabe-se que quanto maior a condutância dos canais  $I_f$  maior será o número de contrações por minuto e, portanto, maior a excitabilidade cardíaca (Barbosa *et al.*, 2004). O aumento no número de canais  $I_f$  por si só não causaria aumento da automaticidade miocárdica. No entanto, em condições como IC e hipertrofia miocárdica patológica, o aumento da concentração de catecolaminas causaria mudança na curva de ativação dos canais  $I_f$ , resultando em aumento da excitabilidade cardíaca (Muto *et al.*, 2007).

Importante ressaltar que ratos sem tratamento com espironolactona apresentaram alta taxa de mortalidade, e os animais que morreram no decorrer do experimento foram incluídos somente na análise de sobrevivência. Como anteriormente comentado, os animais que morreram antes de completar o período experimental apresentavam sinais clínicos compatíveis com IC. Portanto, é possível afirmar que os animais que sobreviveram estavam em melhores condições cardíacas que aqueles que não resistiram até o final do experimento. Como a mortalidade foi expressivamente maior no grupo CTL, é possível que, se tivéssemos avaliado os ratos mais precocemente, teríamos sido capazes de detectar efeitos benéficos da espironolactona na remodelação cardíaca.

## CONCLUSÃO



A administração de espironolactona, antes do surgimento de sinais clínicos de insuficiência cardíaca, aumenta a sobrevida sem interferir no processo de remodelação cardíaca de ratos espontaneamente hipertensos.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Aiba T, Tomaselli GF. Electrical remodeling in the failing heart. *Curr Opin Cardiol* 2010;25:29-36.

Alpert NR, Brosseau C, Federico A, Krenz M, Robbins J, Warshaw DM. Molecular mechanics of mouse cardiac myosin isoforms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:1446-54.

Arai M, Matsui H, Periasamy M. Sarcoplasmic reticulum gene expression in cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res* 1994;74:555-64.

Baldwin KM, Haddad F. Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle. *J Appl Physiol* 2001;90:345-57.

Barbosa EC, Barbosa PRB, Bomfim AS, Rocha PJ, Ginefra P. Repolarização precoce no eletrocardiograma do atleta: bases iônicas e modelo vetorial. *Arq Bras Cardiol* 2004;82:103-7.

Barr CS, Lang CC, Hanson J, Arnott M, Kennedy N, Struthers AD. Effects of adding spironolactone to an angiotensin-converting enzyme inhibitor in chronic congestive heart failure secondary to coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1995;76:1259-65.

Baumann M, Megens R, Bartholome R, Dolff S, van Zandvoort MA, Smits JF, *et al.* Prehypertensive renin-angiotensin-aldosterone system blockade in spontaneously hypertensive rats ameliorates the loss of long-term vascular function. *Hypertens Res* 2007;30:853-61.

Benitah JP, Perrier E, Gomez AM, Vassort G. Effects of aldosterone on transient outward K<sup>+</sup> current density in rat ventricular myocytes. *J Physiol* 2001;537:151-60.

Benitah JP, Vassort G. Aldosterone upregulates Ca<sup>2+</sup> current in adult rat cardiomyocytes. *Circ Res* 1999;85:1139-45.

Bing OH, Brooks WW, Robinson KG, Slawsky MT, Hayes JA, Litwin SE, *et al.* The spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from compensated left ventricular hypertrophy to failure. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27:383-96.

Bing OH, Conrad CH, Boluyt MO, Robinson KG, Brooks WW. Studies of prevention, treatment and mechanisms of heart failure in the aging spontaneously hypertensive rat. *Heart Fail Rev* 2002;7:71-88.

Bocchi EA, Braga FGM, Ferreira SMA, Rohde LEP, Oliveira WA, Almeida DR, *et al.* III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica. *Arq Bras Cardiol* 2009;93 supl 1:1-71.

Boixel C, Gavillet B, Rougier JS, Abriel H. Aldosterone increases voltage-gated sodium current in ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H2257-66.

Boluyt MO, Bing OHL. Matrix gene expression and decompensated heart failure: the aged SHR model. *Cardiovasc Res* 2000;46:239-49.

Boluyt MO, O'Neill L, Meredith AL, Bing OHL, Brooks WW, Conrad CH, *et al.* Alterations in cardiac gene expression during the transition from stable hypertrophy to heart failure. Marked upregulation of genes encoding extracellular matrix components. *Circ Res* 1994;75:23-32.

Boluyt MO, Robinson KG, Meredith AL, Sen S, Lakatta EG, Crow MT, *et al.* Heart failure after long-term supraaortic constriction in rats. *Am J Hypertens* 2005;18:202-12.

Bregagnollo EA, Okoshi K, Bregagnollo IF, Padovani CR, Okoshi MP, Cicogna AC. Efeitos da inibição prolongada da enzima de conversão da angiotensina sobre as características morfológicas e funcionais da hipertrofia ventricular esquerda em ratos com sobrecarga pressórica persistente. *Arq Bras Cardiol* 2005;84:225-32.

Brilla CG, Matsubara LS, Weber KT. Antifibrotic effects of spironolactone in preventing myocardial fibrosis in systemic arterial hypertension. *Am J Cardiol* 1993;71:12A-6A.

Brooks WW, Bing OHL, Robinson KG, Slawsky MT, Chaletsky DM, Conrad CH. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on myocardial fibrosis and function in hypertrophied and failing myocardium from the spontaneously hypertensive rat. *Circulation* 1997;96:4002-10.

Burla AK, Neves MF, Oigman W, Mandarim-de-Lacerda CA. Eplerenone offsets cardiac and aortic adverse remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Int J Cardiol* 2007;114:64-70.

Carvalho RF, Cicogna AC, Campos GER, Lopes FS, Sugizaki MM, Nogueira CR, *et al.* Heart failure alters MyoD and MRF4 expressions in rat skeletal muscle. *Int J Exp Path* 2006;87:219-25.

Cerbai E, Barbieri M, Mugelli A. Occurrence and properties of the hyperpolarization-activated current  $I_f$  in ventricular myocytes from normotensive and hypertensive rats during aging. *Circulation* 1996;94:1674-81.

Cerbai E, Pino R, Porciatti F, Sani G, Toscano M, Maccherini M, *et al.* Characterization of the hyperpolarization-activated current,  $I_f$ , in ventricular myocytes from human failing heart. *Circulation* 1997;95:568-71.

Chan AKY, Sanderson JE, Wang T, Lam W, Yip G, Wang M, *et al.* Aldosterone receptor antagonism induces reverse remodeling when added to angiotensin receptor blockade in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:591-6.

Cicogna AC, Padovani CR, Okoshi K, Aragon FF, Okoshi MP. Myocardial function during chronic food restriction in isolated hypertrophied cardiac muscle. *Am J Med Sci* 2000;320:244-8.

Cicogna AC, Robinson KG, Conrad CH, Singh K, Squire R, Okoshi MP, *et al.* Direct effects of colchicine on myocardial function. Studies in hypertrophied and failing spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1999;33:60-5.

Cicogna AC, Robinson KG, Conrad CH, Squire R, Okoshi MP, Bing OH. Role of myocardial contractile status and relaxation in ventricular dysfunction during the transition of the heart hypertrophy to failure. *Arq Bras Cardiol* 1997;69:381-4.

Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling – concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:569-82.

Colucci WS. Molecular and cellular mechanisms of myocardial failure. *Am J Cardiol* 1997;80:15-25.

Compagno V, Di Liegro I, Cestelli A, Donatelli M. Effect of aging and hypertension on beta-myosin heavy chain in heart of spontaneously hypertensive rats. *Int J Mol Med* 2001;7:507-8.

Delcayre C, Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. The role of aldosterone. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34:1577-84.

Dostal DE, Baker KM. The cardiac renin-angiotensin system: conceptual, or a regulator of cardiac function? *Circ Res* 1999;85:643-50.

Fernandez-Velasco M, Goren N, Benito G, Blanco-Rivero J, Bosca L, Delgado C. Regional distribution of hyperpolarization-activated current ( $I_h$ ) and hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel mRNA expression in ventricular cells from control and hypertrophied rat hearts. *J Physiol* 2003;553:395-405.

Gonçalves G, Zornoff LAM, Ribeiro HB, Okoshi MP, Cordaro FRS, Okoshi K, *et al.* O bloqueio do sistema renina-angiotensina atenua a remodelação cardíaca de ratos submetidos à estenose aórtica. *Arq Bras Cardiol* 2005;84:304-8.

Gut AL, Okoshi MP, Padovani CR, Aragon FF, Cicogna AC. Myocardial dysfunction induced by food restriction is related to calcium cycling and beta-adrenergic system changes. *Nutr Res* 2003;23:911-9.

Hayashi M, Tsutamoto T, Wada A, Tsutsui T, Ishii C, Ohno K, *et al.* Immediate administration of mineralocorticoid receptor antagonist spironolactone prevents post-infarct left ventricular remodeling associated with suppression of a marker of myocardial collagen synthesis in patients with first anterior acute myocardial infarction. *Circulation* 2003;107:2559-65.

Hoppe UC, Jansen E, Sudkamp M, Beuckelmann DJ. Hyperpolarization-activated inward current in ventricular myocytes from normal and failing human hearts. *Circulation* 1998;97:55-65.

Houser SR, Margulies KB. Is depressed myocyte contractility centrally involved in heart failure? *Circ Res* 2003;92:350-8.

Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, *et al.* ACC/AHA 2005 guideline update for the diagnosis and management of chronic heart

failure in the adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 2005;112:e154-235.

Ikeda U, Hyman R, Smith TW, Medford RM. Aldosterone-mediated regulation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase gene expression in adult and neonatal rat cardiocytes. *J Biol Chem* 1991;266:12058-66.

Jessup M, Abraham WT, Casey DE, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, *et al.* 2009 focused update: ACCF/AHA guidelines for the diagnosis and management of heart failure in adults. A report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation. *Circulation* 2009;119:1977-2016.

Kalidindi SR, Tang WH, Francis GS. Drug insight: aldosterone-receptor antagonists in heart failure – the journey continues. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2007;4:368-78.

Kambara A, Holycross BJ, Wung P, Schanbacher B, Ghosh S, McCune SA, *et al.* Combined effects of low-dose oral spironolactone and captopril therapy in a rat model of spontaneous hypertension and heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003;41:830-7.

Kim SD. Measurement of the renin-angiotensin system in heart failure. *Biol Res Nurs* 2000;1:210-26.

Kobayashi N, Yoshida K, Nakano S, Ohno T, Honda T, Tsubokou Y, *et al.* Cardioprotective mechanisms of eplerenone on cardiac performance and remodeling in failing rat hearts. *Hypertension* 2006;47:671-9.

Lalevee N, Rebsamen MC, Barrere-Lemaire S, Perrier E, Nargeot J, Benitah JP, *et al.* Aldosterone increases T-type calcium channel expression and in vitro beating frequency in neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2005;67:216-24.

Litwin SE, Katz SE, Weinberg EO, Lorell BH, Aurigemma GP, Douglas PS. Serial echocardiographic-Doppler assessment of left ventricular geometry and function in rats with pressure-overload hypertrophy. Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the transition to heart failure. *Circulation* 1995;91:2642-54.

Macdonald JE, Kennedy N, Struthers AD. Effects of spironolactone on endothelial function, vascular angiotensin converting enzyme activity, and other prognostic markers in patients with mild heart failure already taking optimal treatment. *Heart* 2004;90:765-70.

MacFadyen RJ, Barr CS, Struthers AD. Aldosterone blockade reduces vascular collagen turnover, improves heart rate variability and reduces early morning rise in heart rate in heart failure patients. *Cardiovasc Res* 1997;35:30-4.

Mandarim-de-Lacerda CA, Pereira LMM. The effects of spironolactone monotherapy on blood pressure and myocardial remodeling in spontaneously hypertensive rats: a stereological study. *J Biomed Sci* 2003;10:50-7.

Mann DL. Management of heart failure patients with reduced ejection fraction. In: Libby P, Bonow RO, Mann DL, Zipes DP, Braunwald E, eds. *Heart Disease. A Textbook of Cardiovascular Medicine*. 8<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2008. p. 611-40.

Martinez PF, Zornoff LAM, Campos DHS, Oliveira Junior SA, Damatto RL, Gosuen GB, *et al.* Caracterização clínica e anátomo-patológica da insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio em ratos. *Arq Bras Cardiol* 2007;88:14.

Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Cicogna AC, Janicki JS. Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:H1534-9.

McCrossan ZA, Billeter R, White E. Transmural changes in size, contractile and electrical properties of SHR left ventricular myocytes during compensated hypertrophy. *Cardiovasc Res* 2004;63:283-92.

Miric G, Dallemagne C, Endre Z, Margolin S, Taylor SM, Brown L. Reversal of cardiac and renal fibrosis by pirfenidone and spironolactone in streptozotocin-diabetic rats. *British J of Pharmacol* 2001;133:687-94.

Muto T, Ueda N, Opthof T, Ohkusa T, Nagata K, Suzuki S, *et al.* Aldosterone modulates If current through gene expression in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:2710-8.



Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 1963;27:282-93.

Okoshi K, Fioretto JR, Okoshi MP, Cicogna AC, Aragon FF, Matsubara LS, *et al.* Food restriction induces in vivo ventricular dysfunction in spontaneously hypertensive rats without impairment of in vitro myocardial contractility. *Braz J Med Biol Res* 2004;37:607-13.

Okoshi K, Nakayama M, Yan X, Okoshi MP, Schuldt AJT, Marchionni MA, *et al.* Neuregulins regulate cardiac parasympathetic activity: muscarinic modulation of beta-adrenergic activity in myocytes from mice with neuregulin-1 gene deletion. *Circulation* 2004;110:713-7.

Okoshi MP, Campana AO, Okoshi K, Paiva SAR, Cicogna AC. Caquexia em insuficiência cardíaca. *Rev Bras Med* 2001;58:742-9.

Okoshi MP, Martinez PF, Campos DHS, Gosuen GB, Costa LCO, Iyomasa RM, *et al.* The aldosterone blockade worsens cardiac remodeling in rats with ascending aortic stenosis-induced pressure overload. *Eur Heart J* 2008;29:45.

Okoshi MP, Campos DHS, Martinez PF, Lima ARR, Cezar MDM, Matsubara LS, *et al.* The effects of early aldosterone blockade on myocardial fibrosis and contractility in rats with ascending aortic stenosis. *Eur Heart J* 2009;30:288.

Okoshi MP, Okoshi K, Dal Pai V, Dal Pai-Silva M, Matsubara LS, Cicogna AC. Mechanical, biochemical, and morphological changes in the heart from chronic food restricted rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2001;79:754-60.

Okoshi MP, Okoshi K, Matsubara LS, Dal Pai-Silva M, Gut AL, Padovani CR, *et al.* Myocardial remodeling and dysfunction are induced by chronic food restriction in spontaneously hypertensive rats. *Nutr Res* 2006;26:567-72.

Okoshi MP, Yan X, Okoshi K, Nakayama M, Schuldt AJT, O'Connell TD, *et al.* Aldosterone directly stimulates cardiac myocyte hypertrophy. *J Card Fail* 2004;10:511-8.

Opie LH. Mechanisms of cardiac contraction and relaxation. In: Libby P, Bonow RO, Mann DL, Zipes DP, Braunwald E, eds. *Heart Disease. A Textbook of Cardiovascular Medicine*. 8<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2008. p. 509-39.

Paiva SAR, Zornoff LAM, Okoshi MP, Okoshi K, Matsubara LS, Matsubara BB, *et al.* Ventricular remodeling induced by retinoic acid supplementation in adult rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H2242-6.

Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 2006;86:747-803.

Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fishbein MC, Frohlich ED. Cardiac function and morphology with aging in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol* 1979;237:H461-8.

Pfeffer JM, Pfeffer MA, Frohlich ED. Validity of an indirect tail-cuff method for determining systolic arterial pressure in unanesthetized normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Lab Clin Med* 1971;78:957-62.

Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, *et al.* Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003;348:1309-21.

Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, *et al.* The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study (RALES) investigators. *N Engl J Med* 1999;341:709-17.

Ramires FJ, Mansur A, Coelho O, Maranhão M, Gruppi CJ, Mady C, *et al.* Effect of spironolactone on ventricular arrhythmias in congestive heart failure secondary to idiopathic dilated or to ischemic cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 2000;85:1207-11.

Ruskoaho H. Atrial natriuretic peptide: synthesis, release and metabolism. *Pharmacol Rev* 1992;44:479-602.

Saude.gov.br [homepage on the Internet]. Ministério da Saúde. Disponível em: <http://www.saude.gov.br>. Acessado em 14/01/2010.

Sbh.org.br [homepage on the Internet]. Sociedade Brasileira de Hipertensão. Disponível em: <http://www.sbh.org.br>. Acessado em 14/01/2010.

Simko F, Pechanova O, Pelouch V, Krajcovicova K, Mullerova M, Bednarova K, *et al.* Effect of melatonin, captopril, spironolactone and simvastatin on blood pressure and left ventricular remodelling in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2009;27:5-10

Simone G, Devereux RB, Camargo MJ, Volpe M, Wallerson DC, Atlas SA, *et al.* In vivo left ventricular anatomy in rats with two-kidney, one clip and one-kidney, one clip renovascular hypertension. *J Hypertens* 1992;10:725-32.

Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res* 2002;90:520-30.

Stoupakis G, Klapholz M. Natriuretic peptides: biochemistry, physiology, and therapeutic role in heart failure. *Heart Dis* 2003;5:215-23.

Susic D, Varagic J, Ahn J, Matavelli LC, Frohlich ED. Beneficial cardiovascular actions of eplerenone in the spontaneously hypertensive rat. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2005;10:197-203.

Suzuki G, Morita H, Mishima T, Sharov VG, Todor A, Tanhehco EJ, *et al.* Effects of long-term monotherapy with eplerenone, a novel aldosterone blocker, on progression of left ventricular dysfunction and remodeling in dogs with heart failure. *Circulation* 2002;106:2967-72.

Switzer BR. Determination of hydroxyproline in tissue. *J Nutr Biochem* 1991;2:229-321.

Swynghedauw B. Remodeling of the heart in response to chronic mechanical overload. *Eur Heart J* 1989;10:935-43.

Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev* 1999;79:215-62.

Takeda Y, Yoneda T, Demura M, Miyamori I, Mabuchi H. Cardiac aldosterone production in genetically hypertensive rats. *Hypertension* 2000;36:495-500.

Tomaselli GF, Marbán E. Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 1999;42:270-83.

Trippodo NC, Frohlich ED. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. *Circ Res* 1981;48:309-19.

Urabe A, Izumi T, Abe Y, Taniguchi I, Mochizuki S. Effects of eplerenone and salt intake on left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Hypertens Res* 2006;29:627-34.

Vasan RS, Benjamin EJ. Diastolic heart failure – no time to relax. *N Engl J Med* 2001;344:56-9.

Veliotis DGA, Woodiwiss AJ, Deftereos DAJ, Gray D, Osadchii O, Norton GR. Aldosterone receptor blockade prevents the transition to cardiac pump dysfunction induced by adrenoreceptor activation. *Hypertension* 2005;45:914-20.

Verdecchia P, Schillaci G, Borgioni C, Ciucci A, Gattobigio R, Zampi I, *et al.* Prognostic significance of serial changes in left ventricular mass in essential hypertension. *Circulation* 1998;97:48-54.

Weinberg EO, Lee MA, Weigner M, Lindpaintner K, Bishop SP, Benedict CR, *et al.* Angiotensin AT1 receptor inhibition. Effects on hypertrophic remodeling and ACE expression in rats with pressure-overload hypertrophy due to ascending aortic stenosis. *Circulation* 1997;95:1592-600.

Weinberg EO, Schoen FJ, George D, Kagaya Y, Douglas PS, Litwin SE, *et al.* Angiotensin-converting enzyme inhibition prolongs survival and modifies the transition to heart failure in rats with pressure overload hypertrophy due to ascending aortic stenosis. *Circulation* 1994;90:1410-22.

Wellner M, Dechend R, Park JK, Shagdarsuren E, Al-Saadi N, Kirsch T, *et al.* Cardiac gene expression profile in rats with terminal heart failure and cachexia. *Physiol Genomics* 2005;18:256-67.

Yee KM, Pringle SD, Struthers AD. Circadian variation in the effects of aldosterone blockade on heart rate variability and QT dispersion in congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:1800-7.

Zannad F, Alla F, Dousset B, Perez A, Pitt B. Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure: insights from the randomized aldactone evaluation study (RALES). Rales Investigators. *Circulation* 2000;102:2700-6.