

Maria do Carmo Fernandez Vailati

Alterações histológicas do miocárdio, rim e fígado de ratos  
(*Rattus norvegicus*) Wistar submetidos à infusão de angiotensina  
II. Influência na função ventricular esquerda e resposta ao  
tratamento com losartan e carvedilol

Departamento de Clínica Médica  
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU  
2001

**Maria do Carmo Fernandez Vailati**

*Alterações histológicas do miocárdio, rim e fígado de ratos  
(Rattus norvegicus) Wistar submetidos à infusão de angiotensina  
II. Influência na função ventricular esquerda e resposta ao  
tratamento com losartan e carvedilol*

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação  
“Fisiopatologia em Clínica Médica” da Faculdade  
Medicina de Botucatu, Universidade Estadual  
Paulista - UNESP, para obtenção do título Doutor.  
Área de Concentração: Cardiologia

Orientadora: **Beatriz Bojikian Matsubara**

Departamento de Clínica Médica  
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

2001

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ELZA NUMATA

Vailati, Maria do Carmo Fernandez

Alterações histológicas do miocárdio, rim e fígado de rato (*Rattus norvegicus*) Wistar submetidos à infusão de angiotensina II : influência na função ventricular esquerda e resposta ao tratamento com losartan e carvedilol / Maria do Carmo Fernandez Vailati. – 2001.

Tese (doutoramento) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2001.

Orientadora: Beatriz Bojikian Matsubara

1. Coração – Fisiopatologia – Estudos experimentais

CDD 616.12

Palavras-chave: Angiotensina II; Lesões histopatológicas; Losartan; Carvedilol; Função ventricular; Coração isolado de rato; Hipertensão arterial

## Eu quisera ver o mundo

Eu quisera ver o mundo  
como o vê Sérgio Bernardo:  
ver, no mundo, os muitos signos  
que vigiam sob as coisas.

Sentir, sob a forma, as formas,  
os segredos da matéria  
mais a textura dos sonhos  
de que se forma o real.

Ver a vida em plenitude  
e em seu mistério mais alto;  
decifrar a linha, a sombra,  
a mensagem não ouvida

mas que palpita na Terra.  
Eu quisera ter os olhos  
que assim penetram o arcano  
e o tornam (poder da imagem)

um conhecimento humano.

*Carlos Drummond de Andrade*

## Agradecimentos

Ao Prof. Luiz Shiguero Matsubara pelo auxílio no estudo do coração isolado.

À Prof<sup>a</sup> Noeme Sousa Rocha pela orientação, auxílio e incentivo constantes.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani, pelo auxílio na realização do estudo estatístico.

Ao amigo Nayro Augusto Xavier pela ajuda inestimável sempre que necessário.

Às amigas Renée Laufer Amorim e Maria Clorinda Soares Fioravanti pelo auxílio no estudo histopatológico, realização da imuno-histoquímica e apoio constantes.

Aos residentes da Patologia Veterinária Osimar Sanches de Carvalho e Sara Maria de Carvalho e Suzano pela ajuda e presteza durante a elaboração deste trabalho.

Ao amigo Laercio Martins De Stefano pelo auxílio na leitura dos traçados e total disponibilidade.

À amiga Maria Lúcia Gomes Lourenço pelo apoio e discussão dos resultados.

Aos funcionários do Laboratório Experimental de Cardiologia, José Carlos Georgete, Elenize Jamas, Vítor Marcos de Souza, Corina Julieta Corrêa e Geisa Cristina Bovolenta pelo auxílio durante a execução dos experimentos.

Às Tias da Escola Sementinha pela tranquilidade proporcionada para a realização deste trabalho.

Ao técnico do Toxican Paulo Roberto Cardoso pelo processamento do material para o estudo histopatológico.

À bibliotecária Elza Numata pela elaboração da ficha catalográfica e sugestões ao trabalho.

Às bibliotecárias Rosemary Cristina da Silva e Luciana Pizzani pela revisão das referências bibliográficas.

Ao professor de língua portuguesa José Celso Soares Vieira pela revisão do texto final.

A todos os animais utilizados para a realização do experimento.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Dedico este trabalho

Ao Criador pela sua obra, fonte inesgotável de conhecimento e sabedoria.

Aos meus pais que proporcionaram os meios para que eu pudesse iniciar minha trajetória.

Ao meu companheiro Jorge Luiz pelo carinho, paciência e cumplicidade.

Aos meus filhos José e Carolina que participaram deste trabalho com “total” proximidade.

À Prof<sup>a</sup> Denise Saretta Schwartz pela amizade, orientação e por ter despertado o fascínio pela Cardiologia.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Beatriz Bojikian Matsubara pela oportunidade e por ter acreditado em mim.

## ÍNDICE

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
1 – INTRODUÇÃO.....	5
2 – OBJETIVOS.....	16
2.1. – Objetivos primários.....	16
2.2 – Objetivos secundários.....	16
3 – MATERIAL E MÉTODOS .....	17
3.1. – Animais e ambiente de experimentação.....	17
3.2. – Composição dos grupos experimentais.....	17
3.3. – Medida do peso corpóreo e da pressão arterial sistólica caudal.....	20
3.4. – Avaliação morfológica.....	20
3.4.1. – Histologia.....	21
3.4.2. – Imunohistoquímica.....	22
3.4.3. – Histoquímica.....	22
3.5. – Avaliação funcional.....	23
3.5.1. – Estudo da função ventricular em coração isolado: preparação de Langendorff.....	23
3.5.2. – Aparato de perfusão e sistema de registro de pressões.....	25
3.5.3. – Protocolo experimental.....	28
3.5.4. – Calibração dos traçados.....	30
3.5.5. – Volume ventricular.....	30
3.5.6. – Porcentagem de água no miocárdio.....	30
3.5.7. – Parâmetros de função sistólica.....	31
3.5.8. – Parâmetros de função diastólica.....	32



3.6. – Análise estatística.....	33
4 – RESULTADOS.....	36
4.1. – Peso corpóreo, freqüência cardíaca e pressão arterial sistólica caudal.....	36
4.2. – Variáveis morfométricas cardíacas e porcentagem de água no miocárdio.....	37
4.3. – Estudo histológico.....	38
4.4. – Estudo funcional.....	40
5 – DISCUSSÃO.....	57
5.1. – Peso corpóreo, freqüência cardíaca e pressão arterial sistólica caudal.....	57
5.2. – Avaliação histológica de miocárdio, rim e fígado.....	66
5.3. – Variáveis morfométricas, cardíacas e porcentagem de água no miocárdio.....	74
5.4. – Estudo funcional.....	75
6 – CONCLUSÕES.....	80
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
ANEXOS.....	94

## RESUMO

Um aspecto pouco explorado na literatura, é o caráter sistêmico das alterações vasculares induzidas pela angiotensina II (All). Teoricamente, todos os tecidos podem ser afetados, visto que os receptores da All já foram identificados em vários órgãos. Os trabalhos que avaliam o efeito da All no miocárdio são concordantes no sentido de indicar lesões envolvendo vasos e tecido muscular. Não encontramos qualquer estudo que avaliasse o impacto dessas lesões na função ventricular, numa fase que precede a fibrose miocárdica.

Foram utilizados 65 ratos Wistar, machos, com aproximadamente 250g de peso corpóreo, divididos em quatro grupos: controle (n=16), ratos tratados com All (n= 17), ratos tratados com All + carvedilol (90 mg/kg/dia; n = 15) e All + losartan (30 mg/kg/dia; n = 17). A infusão contínua de All foi realizada na dose de 150 ng/min, através de mini-bombas osmóticas colocadas no subcutâneo no dorso do animal. O registro das pressões arteriais caudais (PA) dos animais de cada grupo foi obtido, aproximadamente, 24h antes da implantação da minibomba e antes da realização da eutanásia. Foram realizados cortes histológicos de miocárdio, rim e fígado para coloração pela hematoxilina-eosina e observação das áreas de necrose. A intensidade das lesões foi definida por meio de escores. Uma parte dos animais foi destinada ao estudo histológico e a outra ao estudo do coração isolado. Também foi realizada a técnica de imuno-histoquímica para identificação de macrófagos e a técnica vermelho-congo azul de toluidina para mastócitos e eosinófilos. A função ventricular foi avaliada no coração isolado (preparação de Langendorff). Os resultados foram comparados com os ratos do grupo controle, sem qualquer tratamento, por meio de ANOVA com nível de significância  $p < 0,05$ .

Houve aumento significativo da PA nos grupos All e All + carvedilol em relação ao controle (165 ± 30 mm Hg e 181 ± 35 mm Hg vs 126 ± 13 mm Hg,  $p < 0,01$ ). O losartan preveniu a hipertensão. A análise histopatológica mostrou inflamação perivascular e necrose da parede de arteríolas intramiocárdicas, renais e hepáticas, parcialmente prevenidas com a utilização de carvedilol e com losartan. Observamos que em todos os grupos a intensidade das lesões tissulares foi menor do que a intensidade das lesões vasculares, sem diferença estatística entre os grupos estudados. Foram identificados macrófagos e mastócitos em todos os tecidos, incluindo os controles. Não houve diferença estatística entre os grupos tratados e os controles quanto à função ventricular.

Concluiu-se que: 1) A All causa lesões vasculares em coração, Fígado e rim, indicando efeito vasculotóxico sistêmico; 2) No período estudado, as lesões vasculares são nitidamente mais acentuadas que as alterações tissulares, independente do órgão avaliado; 3) Existe efeito hepatotóxico direto da All, mais evidente na zona 3 do ácino hepático; 4) As alterações histológicas em miocárdio, causadas pela infusão contínua de All por 72 horas, não são suficientes para causar disfunção ventricular analisada no coração isolado; 5) Há proteção conferida pelo carvedilol, confirmando a participação de receptores  $\alpha$  e  $\beta$  - adrenérgicos no mecanismo de agressão induzida pela All; 6) O losartan, na dose utilizada, apresenta efeito protetor parcial.

Palavras-chave: Angiotensina II; lesões histopatológicas; losartan; carvedilol; função ventricular; coração isolado de rato; hipertensão arterial.

## ABSTRACT

The systemic aspect of vascular damage induced by angiotensin II (All) is poorly explored in the literature. Considering the presence of All in various organs, all these tissues might be affected by All. There is an agreement among the authors in relation to the effects of All on the myocardium as involving vessels and myocytes. There is no published data regarding the impact of these lesions on ventricular function preceding myocardial fibrosis.

Sixty five male Wistar rats, ( $250 \pm 20$ g) distributed in four groups were used: control (n=16), treated with All (n=17), with All + carvedilol (90 mg/kg/d, n=15) and All+ losartan (30 mg/kg/d, n=17). All was infused continuously at 150  $\mu$ g/min (for 72 hs) by subcutaneous osmotic pumps. Tail cuff blood pressure was recorded 24 hours before the mini-pump implantation and before euthanasia. Histological sections of the myocardium, kidney and liver were stained by haematoxylin and eosin and observed for presence of necrosis. The injury intensity was scored. Immunohistochemistry was used for macrophages identification and congo red toluidine blue for identification of mast cells and eosinophils. The ventricular function was evaluated in the isolated heart (Langendorff preparation). The results were compared with untreated control rats, by ANOVA and the statistical significance was set at  $p < 0,05$ .

Blood pressure was higher in the groups All and All + carvedilol compared to control ( $165 \pm 30$  mmHg e  $181 \pm 35$  mmHg vs  $126 \pm 13$  mmHg,  $p < 0,01$ ). Losartan prevented hypertension. Histopathological analysis showed perivascular inflammation and necrosis of arteriolar wall in the myocardium, kidney, and liver. Carvedilol and losartan partially protected the organs. The intensity of tissular lesions was less than the vascular lesions, without statistical difference among the groups. There were macrophages and mast cells in all tissues analyzed. There was no

difference between the treated groups and the ventricular function controls.

It was concluded that: 1) All causes vascular injury in the heart, kidney and liver, indicating a systemic vasculotoxic effect; 2) At 72 hours evaluation vascular lesions are more pronounced than tissular lesions, regardless the organ studied; 3) All has a direct hepatotoxic effect, that is more evident at zone 3 of the hepatic acinus; 4) These myocardial histological changes induced by continuous infusion of All do not cause ventricular dysfunction in the isolated heart; 5) Carvedilol protects the organs from All, suggesting the participation of  $\alpha$  and  $\beta$  - adrenergic receptors in the mechanism of All-induced damage; 6) Losartan partially protects the organs at the used dose.

Keywords: Angiotensin II; histological lesions; losartan; carvedilol; ventricular function; isolated heart; arterial hypertension.

# 1. Introdução

O Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA) contribui para a regulação do sistema cardiovascular, mantendo o equilíbrio hemodinâmico do organismo.

Observações recentes demonstraram que o SRAA parece desempenhar um importante papel na fisiopatologia das doenças cardiovasculares (Yamagishi et al., 1993).

O hormônio angiotensina II (All) é um dos mais potentes vasoconstritores conhecidos. Situações patológicas acompanhadas de queda da pressão arterial resultam em aumento dos níveis circulantes de All. Esse mecanismo de compensação envolve a liberação renal da enzima renina (Guyton, 1991).

Quando o fluxo sanguíneo renal está diminuído, as células justaglomerulares (localizadas na parede das arteríolas aferentes, imediatamente proximais aos glomérulos) secretam renina para o sangue. A renina é uma enzima que catalisa a conversão do angiotensinogênio em angiotensina I. A renina persiste no sangue por uma hora e continua a formar a angiotensina I durante todo o tempo. Poucos segundos após a formação de angiotensina I, verifica-se a ação da enzima conversora de angiotensina, formando o octapeptídeo angiotensina II. Essa conversão ocorre principalmente nos pulmões. A angiotensina II persiste no sangue por alguns minutos, sendo rapidamente inativada por numerosas e

diferentes enzimas teciduais e sangüíneas chamadas em conjunto de angiotensinases (Guyton, 1991).

Durante a sua permanência no sangue, a angiotensina II produz vários efeitos que podem elevar a pressão arterial. Um dos efeitos que ocorre com muita rapidez é a vasoconstrição sobretudo das arteríolas e, em menor extensão, das veias.

A córtex adrenal foi o primeiro tecido onde se identificaram receptores para a AII (Chiu et al., 1989; Whitebread et al., 1989).

A angiotensina II também exerce os seus efeitos através da ativação de receptores específicos presentes nos vasos, na adrenal, no cérebro, no fígado e nos rins (Chiu et al., 1989).

Além da vasoconstrição, os outros efeitos da AII estão relacionados principalmente aos volumes de líquido orgânico e, assim, são descritos: efeito direto sobre os rins, causando diminuição da excreção de água e sal, e estimulação da secreção de aldosterona pelo córtex supra-renal. Esse hormônio, por sua vez, também produz a diminuição da excreção de água e sal pelos rins. Ambos os efeitos tendem a elevar o volume sangüíneo, e este é um fator importante na regulação da pressão arterial a longo prazo (Guyton, 1991).

No que se refere ao coração, descrevem-se quatro efeitos principais da angiotensina II: ação inotrópica positiva direta sobre o miocárdio; efeito inotrópico adicional, resultante do aumento do tônus

simpático; aumento da frequência cardíaca; e vasoconstrição coronariana (Ikram,1996).

Estas ações da angiotensina II são mediadas pela ativação de receptores específicos que estão distribuídos nos tecidos alvo. Foram identificados receptores da angiotensina II no coração, nos vasos sanguíneos, nos rins e nas glândulas adrenais (Johnston, 1994). Segundo Chiu et al. (1989) e Whitebread et al. (1989), foi demonstrada a existência de, pelo menos, dois subtipos de receptores, denominados tipo I e tipo II ( $AT_1$  e  $AT_2$ ).

A maior parte dos efeitos biológicos da All, são mediados pelo receptor  $AT_1$ , embora outros subtipos tenham sido identificados (Timmermans et al., 1993).

Além dos efeitos sobre a função cardíaca, descritos anteriormente, muita atenção vem sendo dedicada às alterações morfológicas e estruturais do miocárdio, dependentes da angiotensina II.

Na insuficiência cardíaca, os níveis circulantes de norepinefrina e All estão aumentados, em resposta às reduções da pressão arterial sistêmica e do fluxo plasmático renal.

A importância fisiopatológica destas evidências reside no fato de que a ativação compensatória do sistema adrenérgico e RAA pode exacerbar o estado de insuficiência cardíaca. Esta exacerbação estaria relacionada a dois mecanismos: elevação da pós-carga pela vasoconstrição e lesão direta dos miócitos.



Em 1971, Gavras et al. descreveram em coelhos a associação entre níveis elevados de All exógena (intravenosa) e marcante necrose miocárdica. Nessa época, os mecanismos envolvidos nesse efeito não tinham sido esclarecidos. Lesões miocárdicas semelhantes foram observadas em pacientes renais crônicos submetidos a hemodiálise. Nesses pacientes, as áreas focais de necrose miocárdica não estavam associadas a lesões obstrutivas de coronárias (Gavras et al., 1975). Devido a isso, atribuiu-se as lesões à extrema vasoconstrição arterial. A necrose miocárdica foi descrita por outros investigadores em situações experimentais que cursam com elevação de All endógena (Giacomelli et al., 1976; Bhan et al., 1982; Tan et al., 1991; Rodrigues et al., 1992).

Giacomelli et al. (1976) estudaram por meio da microscopia ótica e eletrônica, o miocárdio e as artérias coronarianas de ratos Holtzman, submetidos a infusão intravenosa de angiotensina amida por quatro horas. Antes do sacrifício, os animais receberam injeção de solução contendo macromoléculas para detectar aumento da permeabilidade capilar. Os autores observaram que as artérias epicárdicas não demonstraram alterações morfológicas apreciáveis após a infusão de angiotensina, sendo, as principais alterações observadas nas artérias e arteríolas intramiocárdicas. Houve sinais de aumento da permeabilidade desses vasos, visto que ocorreu o extravasamento de macromoléculas através da parede dos vasos arteriais intramiocárdicos, tanto na presença quanto na ausência de lesões estruturais. Focos de lesão miocárdicas

estavam presentes. Nestas áreas, havia agregados de cromatina nuclear e perda de glicogênio das miofibrilas. Neutrófilos, eritrócitos e macrófagos foram observados ao redor da lesão das vênulas. As miofibrilas perderam seu arranjo estriado e exibiram severa vacuolização e debris celulares.

O efeito da All e das catecolaminas, sobre a vasculatura coronariana e do miocárdio de ratos, foi estudado por Bhan et al. (1982). Os autores administraram fentolamina (bloqueador de receptores  $\alpha$  adrenérgicos), na dose de 10 mg/kg de peso corpóreo, e associada ou não à administração de propranolol (bloqueador de receptores  $\beta$  adrenérgicos), na dose de 1mg/kg de peso corpóreo, seguido por infusão de angiotensina amida ( $1,7\mu\text{g}/\text{min}/\text{kg}$ ) durante duas horas. Os autores observaram que a pressão arterial foi aumentada nos animais que receberam All isoladamente ou em associação com o propranolol. A infusão de All por duas horas resultou em lesões de artérias intramiocárdicas, arteríolas e miócitos. As lesões vasculares intramiocárdicas nos animais hipertensos recebendo somente All, estavam associadas a alterações ultra-estruturais miocárdicas, semelhantes a lesões anóxicas ou isquêmicas. Alterações vasculares e miocárdicas similares, porém, menos severas, foram encontradas nos animais recebendo propranolol e All, apesar do aumento da pressão arterial e da vasoconstrição coronariana. O tratamento com fentolamina preveniu a vasoconstrição coronariana induzida pela All, sugerindo um papel importante da vasoconstrição na gênese da necrose miocárdica

observada nesses animais. Os autores observaram que as lesões vasculares por infusão de All podem ser produzidas na ausência de hipertensão ou liberação de catecolaminas, enquanto que as lesões miocárdicas parecem depender do aumento da pressão arterial e/ou da vasoconstrição coronariana associada a infusão de All.

O efeito tóxico direto da All sobre os miócitos foi demonstrado por Tan et al. (1991). Os autores realizaram infusões contínuas de All (200ng/min.) em ratos, por meio de minibombas osmóticas, implantadas na cavidade peritoneal e consideraram essa dose insuficiente para produzir elevação imediata da pressão arterial. Uma parte dos ratos recebeu injeções de propranolol (10 mg/kg, subcutâneo, três vezes ao dia) e fenoxibenzamina, (5 mg/kg, intramuscular, uma vez ao dia), bloqueador  $\alpha$  - adrenérgico, antes e durante a infusão de All. Os animais foram sacrificados um a quatro dias após, tendo recebido anticorpo monoclonal antimiosina para demonstrar o aumento da permeabilidade sarcolemal. Observaram que um a dois dias após o início da infusão de All, o número de miócitos marcados era máximo, havendo redução até o quarto dia. O exame histológico do miocárdio revelou sinais de miocitólise em toda secção do músculo, sem distribuição preferencial em regiões perivasculares ou subendocárdicas. Além disso, demonstraram que o bloqueio de receptores  $\alpha$  e  $\beta$  adrenérgicos não protegia o miocárdio das lesões. Os autores concluíram que a All causou um aumento da

permeabilidade sarcolemal e miocitólise, embora o mecanismo subjacente não pudesse ser esclarecido.

Rodrigues et al. (1992) realizaram um estudo em ratos submetidos à constrição de aorta abdominal, acima das artérias renais, produzindo hipertensão renovascular. Observaram lesões vasculares miocárdicas generalizadas e necrose miocárdica. Os autores concluíram que a lesão miocárdica do tipo isquêmica era secundária à lesão dos vasos.

O modelo de hipertensão renovascular em ratos também foi estudado por Okoshi et al., em 1997. Estes autores analisaram a morfologia e função do miocárdio hipertrofiado de ratos hipertensos, sacrificando-os na 4<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas de isquemia renal. Observaram necrose fibrinóide da parede das arteríolas intramiocárdicas com obstrução secundária do vaso. Essas lesões vasculares estavam relacionadas com necrose miocárdica isquêmica em áreas próximas. Descreveram que a reação inflamatória perivascular seria uma das alterações precoces nesse modelo experimental. Além disso, a agressão parecia continuada, visto que os animais sacrificados mais tardiamente, com oito semanas de evolução, apresentavam alterações histopatológicas características de processo cicatricial ao lado de lesões tipicamente agudas. A fibrose miocárdica foi associada à disfunção diastólica do músculo papilar isolado, com a preservação da função sistólica.

O caráter inflamatório da lesão miocárdica por All foi descrito por outros autores.

Nos trabalhos realizados por Ratasjka et al. (1994b) e Campbell et al. (1995) foram observadas áreas de necrose induzidas pela All caracterizadas histologicamente pela presença de macrófagos e linfócitos. No estudo de Ratasjka et al. (1994b), a infusão de All ocorreu por meio de minibombas implantadas no subcutâneo e a dose utilizada foi 150 ng/kg/min. As avaliações foram realizadas até 14 dias após o início da infusão. Houve acúmulo de células inflamatórias ao redor dos vasos a partir do segundo dia e até o final do experimento. Utilizando o mesmo modelo, Campbell et al. (1995) descreveram a presença de linfócitos e macrófagos a partir do segundo dia de infusão. A partir daí, somente os macrófagos permaneceram no interstício e ao redor dos vasos até 28 dias de segmento.

Em 1994, Kabour et al., pesquisaram se os efeitos cardiotoxicos da All eram mediados pelos receptores AT<sub>1</sub>. Para tal, eles estudaram ratos recebendo somente All (150 ng/min. em mini-bomba implantada no subcutâneo) e em combinação com o antagonista AT<sub>1</sub>, losartan (7,5 mg/dia, por via oral) que era administrado desde dois dias antes do início da infusão de All. Os animais foram avaliados no 2º e 9º dias. Os resultados indicaram que a necrose de miócitos que ocorreu secundariamente ao aumento da All foi mediada pelo receptor AT<sub>1</sub> e o antagonista deste receptor, losartan, foi capaz de prevenir a ocorrência das lesões. Os autores sugeriram a possibilidade da All causar a necrose de miócitos devido à liberação secundária de catecolaminas. A maioria

das áreas de necrose localizavam-se ao redor de artérias coronarianas intramiocárdicas sugerindo que as alterações da permeabilidade microvascular poderiam desempenhar um papel subsequente na necrose de miócitos. O infiltrado celular observado nas áreas mais recentemente lesadas continham macrófagos e células inflamatórias, que migravam da circulação em resposta à injúria dos miócitos.

Com o objetivo de determinar se a necrose de miócitos era induzida diretamente pela All ou indiretamente, via liberação de catecolaminas ou de aldosterona, Ratajska et al. (1994a) realizaram um estudo administrando All (150 ng/kg/min) a um grupo de ratos, por meio de minibombas osmóticas implantadas no tecido subcutâneo. Outros grupos de animais foram submetidos a adrenalectomia total, medulectomia bilateral ou a administração de espironolactona. Na presença de níveis aumentados de All, a medulectomia bilateral e a adrenalectomia total reduziram as injúrias de miócitos, sugerindo que os efeitos citotóxicos da All eram indiretamente relacionados com as catecolaminas circulantes, liberadas pela medula adrenal.

Henegar et al. (1995), utilizando a mesma preparação de infusão contínua de All, observaram que a dose capaz de promover a necrose de miócitos era de 150 ng/min. Estes mesmos autores sugeriram que a necrose de miócitos e a lesão vascular coronariana que ocorrem nos primeiros três dias após a elevação da angiotensina II circulante, não poderiam ser atribuídas a um aumento das catecolaminas séricas, uma

vez que seus níveis se elevaram significativamente somente após 14 dias. Os autores sugeriram a possibilidade da lesão precoce ser causada por liberação local de catecolaminas, uma vez que houve redução significativa das lesões miocárdicas e vasculares nos animais tratados com propranolol.

Enquanto esse aspecto permanece sem definição na literatura, vale ressaltar que a lesão miocárdica causada por catecolaminas pode ser mediada por receptores  $\alpha$  e  $\beta$  adrenérgicos. Portanto, o protocolo experimental que pretende avaliar a influência do sistema nervoso autônomo na lesão tissular causada pela All deve bloquear os dois tipos de receptores.

O carvedilol é um antagonista adrenoreceptor que, agindo por meio de bloqueio competitivo, modula não só a atividade dos receptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$ , mas também dos receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos presentes no miócito cardíaco (Ruffolo et al., 1993; Yoshikawa et al., 1996; Dunn et al., 1997). Esta droga foi colocada recentemente para uso clínico e até o momento não há informações na literatura sobre o seu efeito no modelo experimental de infusão crônica de All.

Os trabalhos que avaliam o efeito da All no miocárdio são concordantes no sentido de indicar lesões intensas e precoces, envolvendo vasos e tecido muscular. Curiosamente, não encontramos qualquer estudo que avaliasse o impacto dessas lesões na função ventricular.

Outro aspecto pouco explorado na literatura é o caráter sistêmico das alterações vasculares induzidas pela All. Teoricamente, todos os tecidos podem ser afetados, visto que os receptores da All já foram identificados no coração, nos vasos sanguíneos, nos rins, no fígado, no cérebro e nas glândulas adrenais (Chiu et al., 1989 e Whitebread et al., 1989). Da mesma forma, os receptores  $\alpha$  e  $\beta$  adrenérgicos estão presentes nos vasos da maioria dos órgãos.

Ao analisar as informações contidas na literatura, elaboramos a hipótese de que a lesão arterial coronariana associada ao edema e à necrose do miócito, levam à disfunção ventricular precoce, após a elevação anormal da All plasmática, numa fase que antecede o desenvolvimento da hipertrofia e fibrose miocárdicas. Além disso, consideramos que as alterações descritas no miocárdio podem ocorrer em outros órgãos, como fígado e rim, sugerindo um processo vasculotóxico sistêmico.



## **2. Objetivos**

### **2.1. *Objetivos primários***

- Analisar as alterações histológicas precoces de coração, fígado e rim, produzidas pela infusão de angiotensina II.
- Avaliar a influência dessas alterações na função ventricular esquerda.

### **2.2. *Objetivo secundário***

- Avaliar os efeitos do tratamento com losartan ou carvedilol nas alterações morfológicas de coração, fígado e rim, e funcionais do ventrículo esquerdo.

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1. Animais e ambiente de experimentação**

Foram utilizados *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, machos, com dois meses de idade e pesando aproximadamente 250g. Os animais eram provenientes do biotério de criação central da UNESP, campus de Botucatu e abrigados no biotério de experimentação do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu. As técnicas utilizadas e o manejo dos animais foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (Anexos). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais em ambiente com controle de luz (ciclos de 12 horas) e temperatura constante (21-24<sup>0</sup>C), umidade do ar de 55-65%, tempo de exaustão de 10 trocas de ar da sala/hora, recebendo dieta padrão para animais de laboratório (Purina®) e água *ad libitum*.

#### **3.2. Composição dos grupos experimentais**

Foram utilizados 65 animais divididos aleatoriamente em quatro grupos:

Grupo Controle (n=16): ratos controle negativo

Grupo All (n=17): ratos tratados com All

Grupo All+CV (n=15): ratos tratados com All + carvedilol (90 mg/kg/dia na água de beber)

Grupo All+Los (n=17): ratos tratados com All + losartan (30 mg/kg/dia na água de beber)

A administração de AII foi efetuada por meio de infusão contínua, via subcutânea e com o auxílio de minibombas osmóticas (modelo #2002, ALZA Corp.), implantadas na região dorsal. Esse procedimento era realizado após a sedação do animal com a associação de quetamina (50 mg/kg IM) e xilazina (10 mg/kg IM). Uma pequena incisão cirúrgica no dorso permitia a colocação do dispositivo que liberava continuamente 0,5µL/hora da solução contendo a droga, de modo a oferecer ao animal a dose de 150 ng/min de AII.

O carvedilol e o losartan foram administrados aos animais três dias antes do início da infusão contínua de AII. A concentração da droga na água foi definida após a verificação do volume médio de água consumido por animal, por dia. A utilização da fórmula comercial de ambas as drogas baseou-se em experiência prévia em outros estudos, demonstrando efeito terapêutico em ratos. A vantagem desta opção reside no fato de se evitar “conflito de interesse” criado pela obtenção do sal diretamente da indústria farmacêutica.

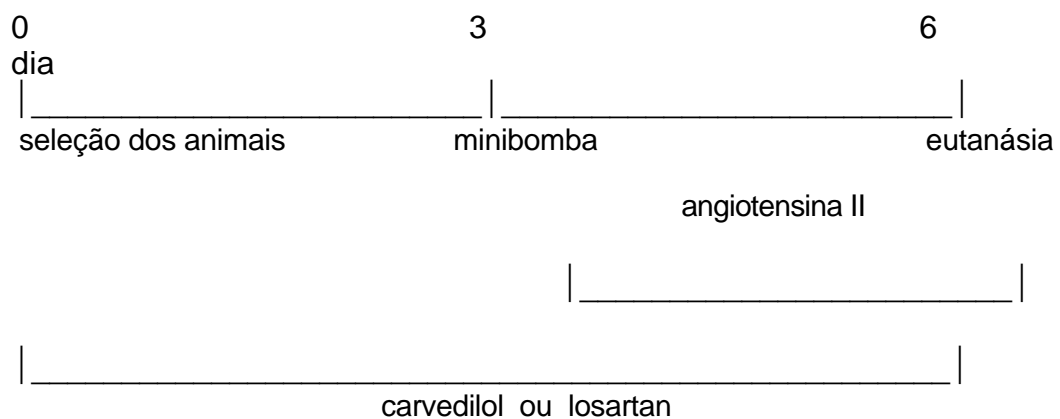
Após freqüentes observações em nosso laboratório, constatou-se que a ingestão diária de água por animal é de aproximadamente 50 a 60 mL. A presença do carvedilol ou do losartan na água de beber não interferiu na quantidade de água ingerida durante o protocolo experimental.

Para a definição da efetividade da dose do carvedilol a ser utilizada, foi composto um grupo de nove animais que receberam

carvedilol (90 mg/kg/dia, na água de beber) por seis dias. A pressão arterial caudal e a frequência cardíaca foram medidas antes do início do tratamento, em três dias consecutivos e, antes do sacrifício, em três dias consecutivos. Os valores correspondentes às pressões arteriais e frequências cardíacas antes e durante o tratamento, foram obtidos pela média aritmética de três medidas em dias consecutivos. Com a utilização da dose de 90 mg/kg, houve redução significativa tanto da pressão arterial quanto da frequência cardíaca.

A eutanásia foi efetuada aproximadamente 72 horas após o implante das minibombas osmóticas, por meio da utilização de pentobarbital sódico intraperitoneal e posterior toracotomia.

O protocolo experimental está esquematicamente representado abaixo:



### ***3.3. Medida do peso corpóreo e da pressão arterial sistólica caudal***

A medida do peso corpóreo (PC) foi efetuada em três momentos distintos do protocolo: na divisão aleatória dos grupos (PC<sub>0</sub>), antes da colocação da minibomba (PC<sub>i</sub>) e no dia da eutanásia (PC<sub>f</sub>).

Aproximadamente vinte e quatro horas antes da colocação das minibombas e antes da eutanásia, foram obtidos os registros da pressão arterial sistólica caudal dos animais, utilizando-se o polígrafo modelo RS 3200 da Gould e o esfigmomanômetro Narco Bio-Systems PE-300.

### ***3.4. Avaliação morfológica***

Para a avaliação histopatológica, foram selecionados nove animais do grupo controle, oito do grupo All, sete do grupo All + CV e oito do grupo All + Los. Esses animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg, IP), para a realização da toracotomia e laparotomia. Foram retirados coração, um dos rins e uma amostra do fígado e, em seguida, os ventrículos direito (VD) e esquerdo (VE) foram separados e pesados.

Uma secção coronal do VE de três a cinco mm de espessura, e fragmentos de VD, fígado e rim, foram preparados para o estudo histológico. Os tecidos foram fixados em formalina tamponada a 10% por um período de 48 horas. Após a fixação, o tecido foi incluído em blocos de parafina.

### *3.4.1. Histologia*

A partir dos blocos de parafina, foram realizados cortes histológicos de cinco micras para coloração com Hematoxilina-Eosina (HE). Os cortes histológicos corados pelo HE foram utilizados para a identificação de áreas de necrose de miócitos, infiltrado inflamatório e lesão vascular.

A avaliação das áreas de necrose tissular e vascular nos órgãos estudados foi realizada por meio de microscopia óptica (microscópio Zeiss), considerando-se 10 campos com magnificação de 200X. As lesões foram consideradas vasculares ou perivasculares quando observadas até uma distância de cinco  $\mu\text{m}$  do vaso; quando observadas além dessa medida, foram definidas como tissulares. A distância foi medida com o auxílio de um micrômetro óptico. A intensidade da lesão foi classificada pela utilização de escores considerando a porcentagem de campos apresentando as lesões da seguinte forma: ausente = 0 (0%); discreto = + (até 25%); moderado = ++ (até 50%) e acentuado = +++ (>50%). Posteriormente, a graduação utilizada foi substituída por números (0, 1, 2, 3, respectivamente) para a realização da análise estatística.

Os animais do grupo controle foram analisados inicialmente pelo patologista, avisado da procedência do animal. Essa medida permitiu que o pesquisador se familiarizasse com as características histológicas dos tecidos a serem avaliados. Tendo em vista a característica heterogênea dos ratos utilizados, as pequenas alterações perivasculares ou intersticiais encontradas nos animais do grupo controle, foram consideradas como

não provocadas pelas drogas utilizadas nos outros grupos. Assim, os tecidos provenientes destes animais receberam sempre escore zero.

A partir daí, todos os outros tecidos foram analisados pelo patologista, sem o conhecimento de qual grupo o animal era procedente. As discretas alterações observadas nos tecidos destes animais que se assemelhavam àquelas observadas nos controles, foram desconsideradas.

No anexo, são apresentados os quadros utilizados para a leitura das lâminas.

#### *3.4.2. Imuno-histoquímica*

As amostras de VE, VD, fígado e rim que apresentaram alterações significativas na coloração HE, foram selecionadas para a realização da imuno-histoquímica para a identificação de macrófagos.

Foi empregado o método de imunomarcagem para a evidenciação de macrófagos, utilizando-se a técnica de imuno-histoquímica avidina-biotina-peroxidase, proposta por Hsu et al., (1981).

#### *3.4.3. Histoquímica*

As amostras de VE, VD, fígado e rim que apresentaram alterações significativas na coloração HE, foram selecionadas para a realização da técnica de coloração vermelho Congo-azul de toluidina acidificada, como descrito por Tarpley et al., (1984).

A quantificação de macrófagos, mastócitos e eosinófilos foi realizada utilizando-se um analisador de imagem (Programa Image-Pro® Plus-Media Cybernetics) acoplado a um microscópio LEICA com uma câmera de captação de imagem LEICA MPS30. Foram selecionados 10 campos contendo vaso e 10 campos sem a presença de vasos, com magnificação de 400X, determinado-se desta forma a localização destas células como perivasculares e/ou tissulares, respectivamente. As células do grupo controle também foram quantificadas, visto que estes resultados foram necessários para o estabelecimento de um padrão para a comparação com os outros grupos estudados.

### ***3.5. Avaliação funcional***

#### *3.5.1. Estudo da função ventricular em coração isolado: preparação de Langendorff*

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg, IP), e medicados com heparina (1.000 UI, IP). Após a indução anestésica, cada animal foi colocado em decúbito dorsal na prancha cirúrgica, sendo os membros fixados com presilhas de borracha. Quando necessário, complementava-se a anestesia com dose adicional da droga injetada na veia jugular externa direita ou esquerda.

Efetou-se a esternotomia mediana, sob ventilação com pressão positiva, com oxigênio a 100%. A aorta ascendente foi dissecada e



isolada com fio de algodão; a veia cava inferior foi clampeada com o auxílio de uma pinça de Kelly, para interromper parte do retorno venoso ao ventrículo direito (VD), e um clipe vascular foi colocado na emergência da aorta para proteger a valva aórtica de possível lesão durante a canulação retrógrada da artéria. Com o auxílio de uma tesoura para microcirurgia, realizou-se uma pequena incisão na parede anterior da aorta ascendente para a introdução retrógrada da cânula perfusora que era fixada. O clampe da veia cava inferior e o clipe aórtico foram liberados e iniciou-se a perfusão miocárdica do coração, ainda *in situ*, com a solução nutriente de Krebs-Henseleit, sob temperatura e pressão de perfusão constantes (37°C e 75 mmHg, respectivamente). O coração, conectado à cânula perfusora e contraído isovolumetricamente, foi retirado e transferido para o aparato de perfusão de coração isolado tamanho 3, tipo 830 da Hugo Sachs Elektronik – Grunstasse, Germany. O acúmulo de líquidos no ventrículo direito foi evitado realizando-se uma pequena incisão do tronco da artéria pulmonar. A auriculeta esquerda foi retirada para a introdução de balão de látex na cavidade ventricular esquerda através da valva mitral. Esse balão, conectado ao transdutor de pressão P23XL permitiu a aferição do volume e da pressão ventriculares durante todo o experimento. A pressão no interior do balão foi considerada como correspondente à pressão intraventricular. O controle da frequência cardíaca (FC) foi obtido extirpando-se parte da musculatura atrial direita, seguido da colocação de eletrodo de marcapasso artificial,

modelo Hugo Sachs Elektronik – 79232, no interior do átrio direito para manter a FC em 250 batimentos por minuto.

### *3.5.2. Aparato de perfusão e sistema de registro de pressões*

A cânula de perfusão foi construída a partir de uma agulha metálica de 30 mm x 12 mm cujo bisel foi retirado. A parte remanescente da agulha foi sulcada em toda a sua circunferência para permitir a melhor fixação da cânula na aorta.

O balão de látex foi construído manualmente a partir de uma bexiga comum, tendo aproximadamente sete mm de comprimento e seis mm de largura. Antes de sua primeira utilização, este balão era mantido distendido com 20 mL de solução salina por, no mínimo, 15 dias. Esta medida garantia que o material se tornasse bastante complacente, não interferindo nas medidas de pressão ventricular. Uma das extremidades do balão foi fixada a um fio de algodão 0 atado a uma agulha de costura comum. Esta agulha serviu como um guia para a introdução do balão na cavidade do ventrículo esquerdo. Após ter sido colocado na cavidade, a porção distal do balão perfurava o ápex, fixando-o na posição ideal. A porção proximal do balão estava conectada a um cateter de polietileno (PE90) com 15 cm de comprimento, ligado a duas torneiras de três vias colocadas em série. A este dispositivo, acoplava-se uma seringa de Hamilton micrométrica com capacidade de 100  $\mu$ L, utilizada para o

preenchimento do balão; uma seringa de vidro com capacidade de três mL serviu como reservatório de soro fisiológico para a seringa micrométrica e um transdutor P23XL, ajustado no mesmo nível do coração isolado já acoplado ao sistema de registro de pressões (polígrafo da Gould, modelo Windowgraf).

#### *A solução nutriente de Krebs-Henseleit e o sistema de perfusão do coração isolado*

A composição da solução de nutrientes de Krebs-Henseleit era a seguinte (milimoles/litro): 115 NaCl; 5,4 KCl; 1,25 CaCl<sub>2</sub>; 1,2 MgSO<sub>4</sub>; 1,15 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O; 11 de glicose e 25 de NaHCO<sub>3</sub>. A esta solução, acrescentaram-se 15 mL de manitol a 20% por litro, para retardar o edema miocárdico (Zornoff et. Al., 1995). Antes de ser utilizada a solução, foi filtrada em filtro de acetato de celulose com poros de cinco micras. Durante a perfusão do coração, a pressão parcial de oxigênio (PO<sub>2</sub>) da solução foi mantida entre 550 mmHg e 600 mmHg, verificada por gasometria de amostras da solução. A pressão de perfusão e a temperatura foram mantidas constantes em 75 mmHg e 37°C, respectivamente.

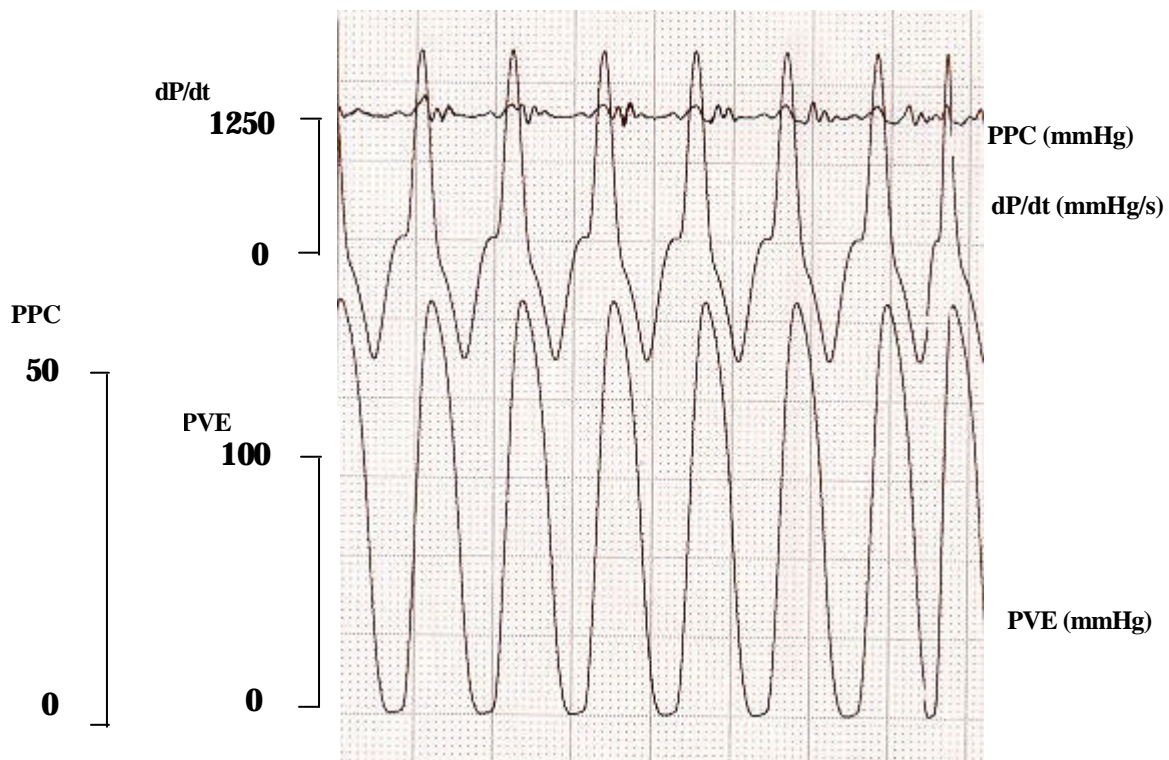
O aparato de perfusão era composto por uma câmara de vidro com parede dupla. Dentro desta câmara, a pressão era ajustável por meio de pressurização com carbogênio (95% de oxigênio e 5% de gás carbônico) que também serviu para a oxigenação da solução nutriente.

Imediatamente antes de alcançar a cânula perfusora, a solução passava por uma segunda câmara conectada ao transdutor de pressão P23XL, que registrava a pressão de perfusão coronariana. O compartimento entre as duas paredes de vidro continha água destilada, aquecida a 37° que circulava continuamente por todo o sistema.

#### *O sistema de registro de pressões*

Foi utilizado o polígrafo da Gould, conectado a um diferenciador de pressão e dotado de quatro canais. Foram registradas as curvas de pressão no interior do balão de látex, correspondentes à pressão ventricular esquerda; a derivada temporal desta pressão e a curva de pressão de perfusão coronariana.

Os registros foram efetuados em papel termo-sensível da Hewlett Packard, em velocidade de 50 mm/s (figura 1).



**V = 60 mL**

Figura 1. Registro obtido em um coração isolado, são apresentadas as curvas de pressão do ventrículo esquerdo (PVE), da derivada temporal dessa pressão (dP/dt) e da pressão de perfusão coronariana (PPC).

### 3.5.3. *Protocolo experimental*

Estando o coração acoplado ao aparato de perfusão e o balão de látex colocado no ventrículo esquerdo, deixou-se a preparação estabilizar por aproximadamente cinco minutos. Após este período, iniciou-se o preenchimento do balão com soro fisiológico. O volume inicial introduzido

era aleatório e suficiente para gerar a pressão diastólica de cinco mmHg a dez mmHg, de modo a desfazer possíveis pregas do balão.

Após a estabilização das curvas de pressão, esvaziou-se o balão, seguindo-se a novo preenchimento com soro fisiológico para a determinação do volume correspondente à pressão diastólica igual a zero, denominado de  $V_0$ . A partir daí, foram acrescentados, sucessivamente, volumes de 20  $\mu\text{L}$  até que a pressão diastólica final atingisse 25 mmHg. A cada acréscimo de volume, registraram-se as curvas de pressão intraventricular e as respectivas derivadas de pressão durante cinco a dez ciclos cardíacos. Todo o volume do balão foi retirado e repetiu-se o procedimento para garantir a reprodutibilidade dos dados obtidos e a estabilidade da preparação. Os valores não reprodutíveis foram desprezados.

Encerrado o experimento, os corações foram retirados do aparato de perfusão e separados os átrios dos ventrículos. Os átrios foram desprezados, os ventrículos direito e esquerdo (incluindo o septo) foram separados e pesados em balança analítica modelo Scientech SA120. Foram retirados dois fragmentos de cada ventrículo, um para conservação em freezer a  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  e outro para conservação em formalina tamponada a 10%.

#### *3.5.4. Calibração dos traçados*

Os traçados registrados durante o protocolo experimental foram calibrados determinando-se os valores da pressão diastólica final, do pico de pressão isovolumétrica do ventrículo esquerdo e os valores máximos positivo e negativo da derivada temporal de pressão (dP/dt). Foram calibrados de três a cinco batimentos cardíacos consecutivos não interrompidos por arritmias em cada volume ventricular estudado. A média aritmética dos valores observados resultou na pressão sistólica e diastólica para cada volume ventricular e suas respectivas derivadas temporais de pressão.

#### *3.5.5. Volume ventricular*

O volume da cavidade ventricular foi assumido como equivalente ao volume de soro fisiológico contido no balão de látex. O volume verificado quando a pressão diastólica era igual a zero foi denominado de  $V_0$ , o qual correspondeu ao volume ventricular quando a pré-carga era, teoricamente, nula.

#### *3.5.6. Porcentagem de água no miocárdio*

Foi obtida pela diferença entre o peso úmido e o peso seco do miocárdio do ventrículo esquerdo, dividida pelo peso úmido do músculo.

### *3.5.7. Parâmetros de função sistólica*

Como parâmetros de função sistólica, foram avaliados a primeira derivada temporal positiva máxima da pressão ventricular, a pressão isovolumétrica e o estresse desenvolvido.

#### *3Derivada temporal positiva da pressão ventricular*

A primeira derivada temporal positiva da pressão ventricular (+dP/dt, mmHg/s) reflete a velocidade máxima de ascensão da pressão ventricular, sendo utilizada como um índice de contratilidade miocárdica.

#### *3Pressão isovolumétrica*

Correspondeu à pressão sistólica máxima do ventrículo esquerdo, aferida nas pressões diastólicas 0 mmHg (Piso<sub>0</sub>, mmHg) e 25 mmHg (Piso<sub>25</sub>, mmHg).

#### *3Estresse desenvolvido*

O valor do estresse desenvolvido (Str<sub>25</sub>, g/cm<sup>2</sup>) foi obtido para todos os animais quando a pressão diastólica era igual a 25 mmHg. Este valor correspondeu à diferença entre o pico de estresse sistólico e o estresse diastólico.

Estresse ( $\sigma$ , g/cm<sup>2</sup>) foi calculado aplicando-se a fórmula (Weber et al., 1976):



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

onde PSVE, VVE e MVE são, respectivamente, pressão sistólica (mmHg), volume (mL) e massa (g) do ventrículo esquerdo, e 1,36 é o fator de conversão de mmHg em g/cm<sup>2</sup>.

### *3.5.8. Parâmetros de função diástolica*

Foram avaliados a derivada temporal negativa da pressão ventricular, a complacência ventricular e o índice de rigidez passiva do miocárdio.

#### *3Derivada temporal negativa da pressão ventricular*

A derivada temporal negativa da pressão ventricular (-dP/dt, mmHg/s), corresponde à velocidade máxima de decréscimo da pressão ventricular após a contração sistólica. Este parâmetro correspondeu ao índice de relaxamento do miocárdio.

#### *3Complacência ventricular*

A complacência ventricular ou distensibilidade da câmara ventricular foi avaliada utilizando-se o parâmetro  $\Delta V_{25}$ , que correspondeu à variação de volume ventricular necessária para elevar a pressão diastólica de 0 para 25 mmHg.

### *3 Rigidez passiva do miocárdio*

A rigidez passiva do miocárdio foi caracterizada pela força (estresse) necessária para deformar o miocárdio em 7%. Este valor foi escolhido porque correspondeu à maior deformação comum a todos os ventrículos estudados. Esta variável foi denominada  $\sigma_7$ , expressa em  $\text{g/cm}^2$ , a qual reflete a rigidez do miocárdio na diástole. O estresse e a deformação foram calculados aplicando-se as fórmulas (Weber et al., 1976):

$$\text{Estresse} = [1,36 \times \text{PDVE} \times \text{VDVE}^{2/3}] / [(\text{VDVE} + 0,943 \times \text{MVE})^{2/3} - \text{VDVE}^{2/3}];$$

$$\text{Deformação} = \{[\text{VDVE}^{1/3} + (\text{VDVE} + 0,943 \times \text{MVE})^{1/3}] / [V_0^{1/3} + (V_0 + 0,943 \times \text{MVE})^{1/3}] - 1\} \times 100$$

onde PDVE é a pressão diastólica do VE (mmHg); VDVE é o volume diastólico final (mL); MVE é a massa do VE (g),  $V_0$  é o VDVE correspondente a PDVE igual a zero, 1,36 é o fator de conversão de mmHg em  $\text{g/cm}^2$  e 0,943 é a densidade miocárdica.

### **3.6. Análise estatística**

O estudo longitudinal do peso corpóreo avaliado em quatro grupos experimentais e três momentos de observação, foi realizado pela análise de medidas repetidas envolvendo os perfis médios dos grupos, complementada com a construção dos intervalos de confiança simultâneos (Wichern & Johnson, 1992).

O estudo das variáveis  $PC_f$ ,  $PA_f$  e  $FC_f$  quanto à comparação dos grupos foi realizado considerando a técnica da análise de variância para o modelo com um fator, complementada com o teste de Tukey (Streiner & Norman, 1994).

A comparação entre os grupos para os dados morfométricos e para a porcentagem de água no miocárdio (PVE, PVD e  $\%H_2O$ ) foi efetuada empregando-se a técnica da análise de variância para o modelo com um fator (ANOVA), complementada com o teste de Tukey. (Streiner & Norman, 1994).

Os parâmetros de função sistólica  $+dP/dt$ ,  $PS_0$  e  $PS_{25}$  foram discutidos quanto à comparação dos grupos considerando a técnica da análise de variância para o modelo com um fator (ANOVA), complementada com o teste de Tukey. As variáveis  $Str_0$  e  $Str_{25}$ , por não apresentarem distribuição normal de probabilidade, foram analisadas pelo processo não paramétrico de Kruskal-Wallis, complementado com o teste de comparações múltiplas (Streiner & Norman, 1994).

Os parâmetros de função diastólica  $-dP/dt$ ,  $\%V$  e  $V_0$  foram estudados quanto à comparação dos grupos empregando-se a análise de

variância para o modelo com um fator (ANOVA), seguida do teste Tukey. Como a variável  $\sigma_7$  não apresentou distribuição normal de probabilidade, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, complementado com o teste de comparações múltiplas (Streiner & Norman, 1994).

A intensidade da lesão vascular e tissular não apresentou distribuição normal de probabilidade, portanto, os escores foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, complementado com o teste de comparações múltiplas (Streiner & Norman, 1994). O mesmo teste foi utilizado para a análise da contagem celular de macrófagos e mastócitos nas áreas perivascular e intersticial.

Quando o resultado do teste estatístico revelou significância, as indicações das diferenças foram apresentadas por meio de letras minúsculas. A interpretação foi feita considerando: duas médias (ou medianas) seguidas de pelo menos uma mesma letra e não revelaram diferença significativa ( $P > 0,05$ ).

No grupo All, foram realizadas medidas de associação entre os escores das lesões vasculares e tissulares, utilizando-se o coeficiente de correlação de Spearman.

Todas as discussões dos resultados das análises estatísticas foram efetuadas considerando-se o nível de 5% de significância.

## **4. Resultados**

### **4.1. *Peso corpóreo, frequência cardíaca e pressão arterial sistólica caudal***

Na tabela 1, são apresentados os valores médios e seus respectivos desvios padrão de peso corpóreo, frequência cardíaca e pressão arterial sistólica caudal.

O peso corpóreo final (g) do grupo controle foi significativamente maior comparado aos grupos All, All + CV e All + Los ( $275 \pm 16$  vs.  $260 \pm 26$ ,  $245 \pm 15$  e  $259 \pm 22$ ,  $P < 0,01$ ). Os grupos All e All+ CV apresentaram valores semelhantes ao All + Los e menores do que o grupo controle.

Houve aumento significativo da pressão arterial final (mmHg) nos grupos All e All + CV ( $165 \pm 30$  e  $181 \pm 30$ ,  $P < 0,01$ ) não havendo diferença estatística entre eles. Os grupos All + Los e controle ( $129 \pm 21$  e  $126 \pm 13$ ,  $P < 0,01$ ), apresentaram valores semelhantes e menores do que os grupos All e All + CV.

A frequência cardíaca (bpm) observada no grupo All + CV ( $342 \pm 55$ ) foi significativamente menor do que a observada nos grupos All ( $423 \pm 91$ ) e All + Los ( $413 \pm 56$ ).

Na figura 2, são apresentados os pesos corpóreos dos animais estudados durante as três fases do protocolo experimental:  $PC_0$ , peso dos animais no momento anterior ao início da droga (carvedilol ou losartan),

PC<sub>i</sub>, peso dos animais antes da colocação da minibomba e PC<sub>f</sub>, peso corpóreo no dia da eutanásia.

#### **4.2. Variáveis morfométricas cardíacas e porcentagem de água no miocárdio**

A tabela 2 mostra os valores das médias e seus respectivos desvios padrão das variáveis morfométricas cardíacas e porcentagem de água no ventrículo esquerdo.

O peso do ventrículo esquerdo observado no grupo controle ( $0,68 \pm 0,1$  g) foi semelhante ao do grupo All ( $0,69 \pm 0,1$  g) não havendo diferença estatística entre eles. O mesmo foi observado entre os grupos All + CV ( $0,61 \pm 0,1$  g) e All + Los ( $0,59 \pm 0,1$  g). Esses dois grupos apresentaram valores significativamente menores do que os grupos controle e All. O peso do ventrículo esquerdo normalizado para o peso corpóreo foi semelhante entre os grupos. Houve diferença estatística quanto ao peso do ventrículo direito entre os grupos. Os grupos All + CV ( $0,19 \pm 0,03$ ) e All + Los ( $0,19 \pm 0,1$  g) apresentaram valores semelhantes ao All ( $0,21 \pm 0,03$  g) e menores do que o o grupo controle ( $0,23 \pm 0,1$  g).

A porcentagem de água no ventrículo esquerdo foi semelhante entre os grupos, não havendo diferença estatística entre eles.

### **4.3 Estudo histológico**

Na tabela 3, são apresentadas as medianas e suas respectivas semi-amplitudes interquartílicas dos escores de lesão vascular em ventrículo esquerdo, ventrículo direito, fígado e rim.

Os animais do grupo controle não apresentaram alterações histopatológicas relevantes em nenhum dos órgãos estudados. As lesões encontradas em ventrículo esquerdo foram mais evidentes no grupo All comparado ao controle e All + CV ( $9,5 \pm 2,1$  vs.  $0,0 \pm 0,0$  e  $2,0 \pm 0,5$ , respectivamente,  $P < 0,01$ ). Embora a análise estatística não tenha demonstrado diferença significativa entre os grupos All e All + Los, foi evidente a menor intensidade das lesões no segundo grupo. Assim, consideramos que houve proteção parcial do losartan contra o efeito vasculotóxico da All. Da mesma forma, em ventrículo direito foi encontrado o maior escore de lesões no grupo All ( $9,5 \pm 1,8$   $P < 0,01$ ) em relação ao controle ( $0,0 \pm 0,0$   $P < 0,01$ ). O grupo All + CV ( $2,0 \pm 0,5$ ,  $P < 0,01$ ) apresentou a menor intensidade de lesões e o grupo All + Los ( $4,0 \pm 1,9$ ,  $P < 0,01$ ) apresentou valor intermediário, semelhante aos grupos All e All + CV. Tanto o carvedilol como o losartan, não previniram completamente as lesões.

A intensidade das lesões vasculares em espaço porta foi semelhante em All ( $3,0 \pm 3,0$ ), All+CV ( $1,0 \pm 1,0$ ) e All+Los ( $3,0 \pm 1,5$ ) e todos foram significativamente maiores em relação ao grupo controle ( $0,0 \pm 0,0$ ,  $P < 0,01$ ) indicando menor efeito protetor nesse segmento específico

da rede arterial. Ocorreram mais lesões em veia terminal no grupo All, quando comparado ao grupo controle ( $6,0 \pm 2,9$  vs.  $0,0 \pm 0,0$ ,  $P < 0,01$ ). O tratamento com carvedilol preveniu completamente o efeito tóxico da All ao redor da veia terminal. O escore de lesão nessa região específica do fígado, apresentou valor intermediário entre os observados nos grupos All e controle, sem diferença estatística entre eles.

As lesões vasculares renais foram significativamente mais intensas no grupo All em relação ao grupo controle ( $8,5 \pm 3,8$  vs.  $0,0 \pm 0,0$ ,  $P < 0,01$ ). O carvedilol conferiu proteção estatisticamente significativa ( $1,0 \pm 0,5$ ,  $P < 0,01$  vs. All). O escore obtido no grupo All + Los ( $3,5 \pm 2,5$ ) apresentou valor estatisticamente maior que o do grupo controle e comparável com All e All+CV.

Na tabela 4, são apresentadas as medianas e suas semi-amplitudes interquartílicas dos escores de lesão tissular em ventrículo esquerdo, ventrículo direito, fígado e rim. Observou-se que em todos os grupos a intensidade das lesões tissulares foi evidentemente menor do que a intensidade das lesões vasculares anteriormente descritas, não havendo diferença estatística entre os grupos estudados. Estes resultados estão ilustrados nas figuras 3 a 8.

É importante ressaltar que as lesões vasculares ocorreram de forma indiscriminada. Das correlações entre escores realizadas, somente duas apresentaram significância estatística e são apresentadas nas figuras 9 e 10. Na figura 9, podemos observar associação positiva e



significante do escore de lesão vascular do ventrículo direito e ventrículo esquerdo e na figura 10 entre ventrículo esquerdo e espaço porta.

#### *Imuno-histoquímica para a identificação de macrófagos*

No miocárdio, rim e fígado, foram observadas células imunoreativas para o anticorpo marcador de macrófago em ratos (figuras 11 e 12). Essas células estavam presentes nos tecidos dos animais dos quatro grupos experimentais.

#### *Coloração específica para a identificação de mastócitos e eosinófilos*

A presença de mastócitos foi observada no miocárdio, rim e fígado de animais de todos os grupos, como ilustram a figura 12 e 13. A presença de eosinófilos ocorreu raramente e independente do grupo experimental. Não houve diferença significativa entre os grupos quanto ao número de macrófagos e mastócitos encontrados.

#### **4.4. Estudo funcional**

A tabela 5 mostra as variáveis da função sistólica obtidas “in vitro”.

Os valores de  $+dP/dt$ ,  $Piso_0$  e  $Piso_{25}$  são expressos pela média e seu respectivo desvio padrão, enquanto que os valores de  $Str_0$  e  $Str_{25}$  são expressos pelas mediana e semi-amplitude interquartilica.

A  $+dP/dt$  e a  $P_{iso_0}$  foi semelhante entre os grupos e não apresentou diferença estatística entre eles. Houve tendência estatística ( $P = 0,06$ ) quanto aos valores de  $P_{iso_0}$ , provavelmente indicando redução do seu valor no grupo All + Los.

A  $P_{iso_{25}}$  foi significativamente reduzida no grupo All + Los em relação ao grupo All ( $118 \pm 17$  vs.  $148 \pm 32$ ,  $P < 0,05$ ). Os grupos controle e All + CV foram semelhantes e não houve diferença estatística entre estes grupos e os demais.

O estresse desenvolvido quando a pressão diastólica foi igual a 0 mmHg e igual a 25 mmHg foi semelhante entre os grupos.

A tabela 6 mostra os parâmetros da função diastólica obtidos “in vitro”. Os valores de  $-dP/dt$  e  $\% \Delta V$  são expressos pela média e desvios padrão, enquanto que a variável  $\sigma_7$  é expressa pela mediana e semi-amplitude interquartílica. Nesta tabela, são apresentados também os valores de  $V_0$ , expressos pelas médias e desvios padrão, correspondente ao volume ventricular quando à pressão diastólica era igual a zero.

A primeira derivada temporal negativa da pressão ventricular foi significativamente reduzida no grupo All + Los ( $1750 \pm 592$  mmHg/s) em relação ao grupo All ( $2306 \pm 297$  mmHg/s,  $P < 0,05$ ) sem outras diferenças entre os grupos. O volume ventricular correspondente à pressão diastólica igual a zero foi semelhante entre os grupos. Da mesma forma, a variável  $\sigma_7$  utilizada como indicador de rigidez passiva miocárdica foi estatisticamente semelhante nos quatro grupos.

**Tabela 1.** Valores médios e seus respectivos desvios padrão de peso corpóreo final ( $PC_f$ ), frequência cardíaca final ( $FC_f$ ) e pressão arterial sistólica caudal final ( $PA_f$ ), obtidos nos grupos controle, angiotensina II (150  $\eta$ g/min.), angiotensina II + carvedilol (90 mg/kg) e angiotensina II + losartan (30 mg/kg). São apresentados os respectivos resultados dos testes estatísticos da comparação dos grupos.

Variável	Grupo				Resultado do teste estatístico	
	Controle	All	All + CV	All + Los	F	P
$PC_f$ (g)	275 $\pm$ 16 (c) n = 16	260 $\pm$ 26 (b) n = 17	245 $\pm$ 15 (a) n = 15	259 $\pm$ 22 (ab) n = 17	5,68	<0,01
$FC_f$ (bpm)	394 $\pm$ 67 (ab) n = 12	423 $\pm$ 91 (b) n = 13	342 $\pm$ 55 (a) n = 15	413 $\pm$ 56 (b) n = 17	4,20	<0,01
$PA_f$ (mmHg)	126 $\pm$ 13 (a) n = 16	165 $\pm$ 30 (b) n = 17	181 $\pm$ 35 (b) n = 15	129 $\pm$ 21 (a) n = 17	17,40	<0,01

Testes estatísticos: ANOVA e Tukey.

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os grupos ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 2.** Valores da variáveis morfométricas cardíacas obtidos nos corações “in vitro”, dos animais dos grupos controle, angiotensina II (150  $\eta$ g/min.), angiotensina II + carvedilol (90 mg/kg) e angiotensina II + losartan (30 mg/kg). São apresentadas as médias com seus respectivos desvios padrão e o resultado do teste estatístico da comparação dos grupos.

Variável	Grupo				Resultado do teste estatístico	
	Controle	All	All + CV	All + Los	F	P
PVE (g)	0,68 $\pm$ 0,1 (b) n = 12	0,69 $\pm$ 0,1 (b) n = 9	0,61 $\pm$ 0,1 (a) n = 11	0,59 $\pm$ 0,1 (a) n = 13	3,74	<0,05
PVD (g)	0,23 $\pm$ 0,1 (b) n=12	0,21 $\pm$ 0,03 (ab) n=9	0,19 $\pm$ 0,03 (a) n=11	0,19 $\pm$ 0,1 (a) n=13	2,88	<0,05
PVE/PC (mg/g)	2,48 $\pm$ 0,3 (a) n=12	2,66 $\pm$ 0,2 (a) n=9	2,55 $\pm$ 0,3 (a) n=11	2,41 $\pm$ 0,3 (a) n=13	2,50	0,07
$H_2O_{VE}$ (%)	77 $\pm$ 9 (a) n=7	81 $\pm$ 0,8 (a) n=7	78 $\pm$ 3 (a) n=7	82 $\pm$ 8 (a) n=6	0,61	>0,05

PVE e PVD, pesos dos ventrículos esquerdo e direito (g), respectivamente, peso do ventrículo esquerdo normalizado para o peso corpóreo (mg/g) e %  $H_2O_{VE}$ , porcentagem de água no ventrículo esquerdo. Testes estatísticos: ANOVA e Tukey. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os grupos ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 3.** Escores de lesão vascular em ventrículo esquerdo (VE), ventrículo direito (VD), fígado (E.P., espaço porta e V.T., veia terminal) e rim. São apresentadas as medianas e suas semi-amplitudes interquartílicas e o resultado do teste estatístico da comparação dos grupos. Os valores entre parênteses correspondem aos escores mínimo e máximo respectivamente da intensidade das lesões.

Variável	Grupo				Resultado do teste estatístico
	Controle n = 9	All n = 8	All+CV n = 7	All+Los n = 8	
VE	0,0 ± 0,0 (a) (0,0;0,0)	9,5 ± 2,1 (c) (4,0;13,0)	2,0 ± 0,5 (b) (1,0;3,0)	4,0 ± 2,4 (bc) (1,0;10,0)	25,85 (P<0,01)
VD	0,0 ± 0,0 (a) (0,0;0,0)	9,5 ± 1,8 (c) (4,0;13,0)	2,0 ± 0,5 (b) (1,0;3,0)	4,0 ± 1,9 (bc) (2,0;10,0)	27,01 (P<0,01)
E.P.	0,0 ± 0,0 (a) (0,0;0,0)	3,0 ± 3,0 (b) (0,0;8,0)	1,0 ± 1,0 (b) (0,0;2,0)	3,0 ± 1,5 (b) (0,0;5,0)	11,61 (P<0,01)
V.T.	0,0 ± 0,0 (a) (0,0;0,0)	6,0 ± 2,9 (b) (2,0;11,0)	0,0 ± 0,0 (a) (0,0;1,0)	2,0 ± 1,4 (ab) (1,0;5,0)	24,28 (P<0,01)
Rim	0,0 ± 0,0 (a) (0,0;0,0)	8,5 ± 3,8 (c) (3,0;13,0)	1,0 ± 0,5 (ab) (0,0;2,0)	3,5 ± 2,5 (bc) (0,0;10,0)	22,11 (P<0,01)

Teste estatístico: Kruskal-Wallis.

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os grupos (P<0,01).

**Tabela 4.** Escores de lesão tissular em ventrículo esquerdo, ventrículo direito, fígado e rim. São apresentadas as medianas com suas semi-amplitudes interquartílicas e o resultado do teste estatístico da comparação dos grupos. Os valores entre parênteses correspondem aos escores mínimo e máximo respectivamente da intensidade das lesões.

Variável	Grupo				Resultado do teste estatístico
	Controle n = 9	All n = 8	All+CV n = 7	All+Los n = 8	
VE	0,00 ± 0,00 (0,00;0,00)	1,00 ± 3,00 (0,00;6,00)	0,00 ± 2,50 (0,00;5,00)	0,00 ± 0,00 (0,00;0,00)	4,25 (P>0,05)
VD	0,00 ± 0,00 (0,00;0,00)	0,00 ± 4,00 (0,00;8,00)	0,00 ± 0,50 (0,00;1,00)	0,00 ± 0,00 (0,00;0,00)	1,09 (P>0,05)
Fígado	0,00 ± 0,00 (0,00;0,00)	0,00 ± 0,50 (0,00;1,00)	0,00 ± 0,50 (0,00;1,00)	0,00 ± 0,00 (0,00;0,00)	0,42 (P>0,05)
Rim	0,00 ± 0,00 (0,00;0,00)	0,00 ± 1,50 (0,00;3,00)	2,00 ± 1,50 (0,00;3,00)	0,00 ± 0,50 (0,00;1,00)	6,65 (P>0,05)

VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito.

Teste estatístico: Kruskal-Wallis.

**Tabela 5.** Valores das variáveis funcionais sistólicas do ventrículo esquerdo, obtidos nos corações isolados, contraindo isovolumetricamente, dos animais dos grupos controle, angiotensina II (150  $\eta$ g/min.), angiotensina II + carvedilol (90 mg/kg) e angiotensina II + losartan (30 mg/kg). São apresentadas as médias com seus respectivos desvios padrão ou as medianas com suas semi-amplitudes interquartílicas, e o resultado do teste estatístico da comparação dos grupos.

Variável	Grupo				Resultado do teste estatístico	
	Controle	All	All + CV	All + Los	F	P
+ dP/dt (mmHg/s)	3552 $\pm$ 628 (a) n = 8	4333 $\pm$ 710 (a) n = 9	4336 $\pm$ 847 (a) n = 8	3508 $\pm$ 1179 (a) n = 9	2,40	>0,05
PS <sub>0</sub> (mmHg/s)	120 $\pm$ 24 (a) n = 8	146 $\pm$ 25 (a) n = 9	143 $\pm$ 33 (a) n = 8	110 $\pm$ 41 (a) n = 9	2,71	0,06
PS <sub>25</sub> (mmHg/s)	131 $\pm$ 22 (ab) n = 8	148 $\pm$ 17 (b) n = 9	145 $\pm$ 21 (ab) n = 8	118 $\pm$ 32 (a) n = 9	2,94	<0,05
Str <sub>0</sub> (g/cm <sup>2</sup> )	48 $\pm$ 10 (a) n = 8	68 $\pm$ 17 (a) n = 9	77 $\pm$ 23 (a) n = 8	50 $\pm$ 31 (a) n = 9	4,14	>0,05
Str <sub>25</sub> (g/cm <sup>2</sup> )	74 $\pm$ 22 (a) n = 8	95 $\pm$ 16 (a) n = 9	102 $\pm$ 18 (a) n = 8	75 $\pm$ 31 (a) n = 9	4,14	>0,05

+ dP/dt: primeira derivada temporal de pressão ventricular esquerda; Piso<sub>0</sub> e Piso<sub>25</sub>: pressão isovolumétrica correspondente à pressão diastólica igual a 0 e 25 mmHg, respectivamente; Stress<sub>0</sub> e Stress<sub>25</sub>: valor do estresse desenvolvido quando a pressão diastólica era igual a 0 e 25 mmHg, respectivamente.

Testes estatísticos: ANOVA + Tukey para + dP/dt, PS<sub>0</sub>, PS<sub>25</sub> e Kruskal-Wallis + Comparações múltiplas para Str<sub>0</sub> e Str<sub>25</sub>.

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos (P<0,05).

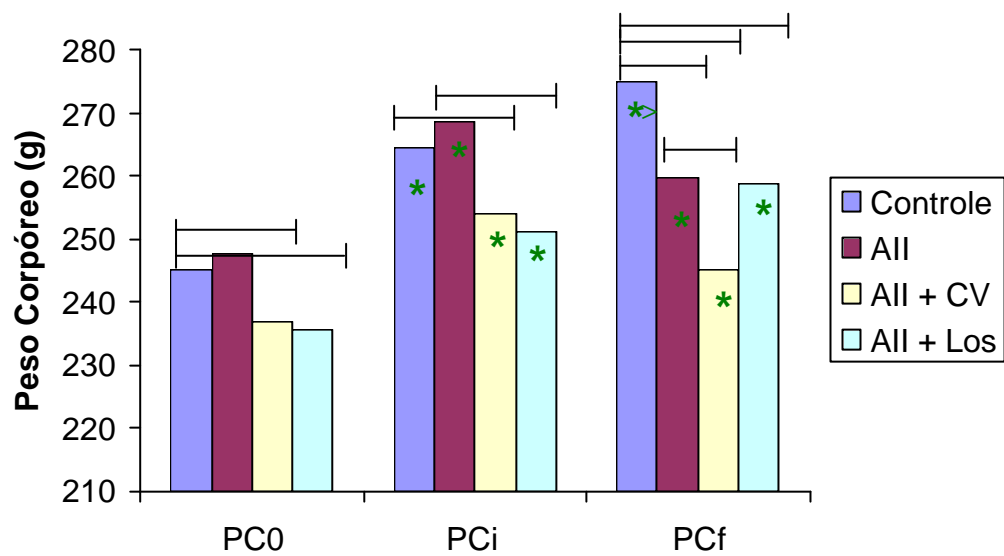
**Tabela 6.** Valores das variáveis funcionais diastólicas obtidos nos corações isolados, contraindo isovolumetricamente, dos animais dos grupos controle, angiotensina II (150  $\eta$ g/min.), angiotensina II + carvedilol (90 mg/kg) e angiotensina II + losartan (30 mg/kg). São apresentadas as médias com seus respectivos desvios padrão ou as medianas com suas semi-amplitudes interquartílicas, e o resultado do teste estatístico da comparação dos grupos.

Variável	Grupo				Resultado do teste estatístico	
	Controle	All	All + CV	All + Los	F	P
- dP/dt (mmHg/s)	1797 $\pm$ 409 (ab) n = 8	2306 $\pm$ 297 (b) n = 9	2164 $\pm$ 408 (ab) n = 8	1750 $\pm$ 592 (a) n = 9	3,31	<0,05
$\Delta$ V (%)	81 $\pm$ 19 (a) n = 8	74 $\pm$ 19 (a) n = 9	71 $\pm$ 18 (a) n = 8	74 $\pm$ 25 (a) n = 9	0,37	>0,05
$\sigma_7$ (g/cm <sup>2</sup> )	11 $\pm$ 3 (a) n = 7	12 $\pm$ 3 (a) n = 9	14 $\pm$ 4 (a) n = 8	12 $\pm$ 5 (a) n = 9	2,99	>0,05
V0 ( $\mu$ L)	99 $\pm$ 20 (a) n = 8	104 $\pm$ 25 (a) n = 9	103 $\pm$ 21 (a) n = 8	103 $\pm$ 28 (a) n = 9	0,09	>0,05

- dP/dt: primeira derivada temporal negativa da pressão ventricular (mmHg/s); %  $\Delta$ V: porcentagem de variação de volume necessária para elevar a pressão diastólica de 0 para 25 mmHg ;  $E_7$ : pré-carga necessária para causar deformação miocárdica de 7% e V0, volume ventricular correspondente à pressão diastólica igual a zero.

Testes estatísticos: ANOVA + Tukey para - dP/dt e %  $\Delta$ V, e Kruskal-Wallis + Comparações múltiplas para  $\sigma_7$ .

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os grupos (P<0,05).



\*  $p < 0,05$  vs PC<sub>0</sub>

=  $p < 0,05$  vs PC<sub>i</sub>

**Figura 2** Pesos corpóreos dos animais estudados durante as três fases do protocolo experimental: PC<sub>0</sub>, peso dos animais no momento anterior ao início da droga (carvedilol ou losartan), PC<sub>b</sub>, peso dos animais antes da colocação da minibomba e PC<sub>f</sub>, peso corpóreo no dia da eutanásia. As barras horizontais indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre as colunas marcadas.

**Figura 3.** Miocárdio de rato sem tratamento (controle): ausência de infiltrado inflamatório (A), HE – 250X; miocárdio de rato tratado com All: presença de arterite intensa (B). HE – 200X.



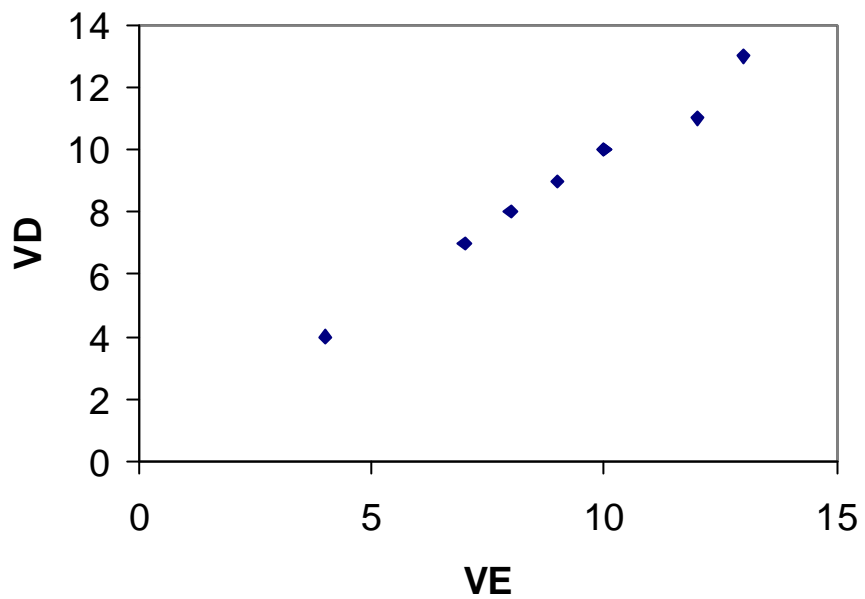
**Figura 4.** Miocárdio de rato tratado com All + CV: presença de arterite discreta (A); miocárdio de rato tratado com All + Los: presença de infiltrado inflamatório discreto (B). HE – 250X.

**Figura 5.** Espaço porta de rato sem tratamento (controle): ausência de infiltrado inflamatório (A); espaço porta de rato tratado com All: presença de infiltrado inflamatório moderado (B). HE – 200X.

**Figura 6.** Espaço porta de rato tratado com All + CV: presença de infiltrado inflamatório moderado (A); espaço porta de rato tratado com All + Los: presença de infiltrado inflamatório moderado (B). HE – 200X.

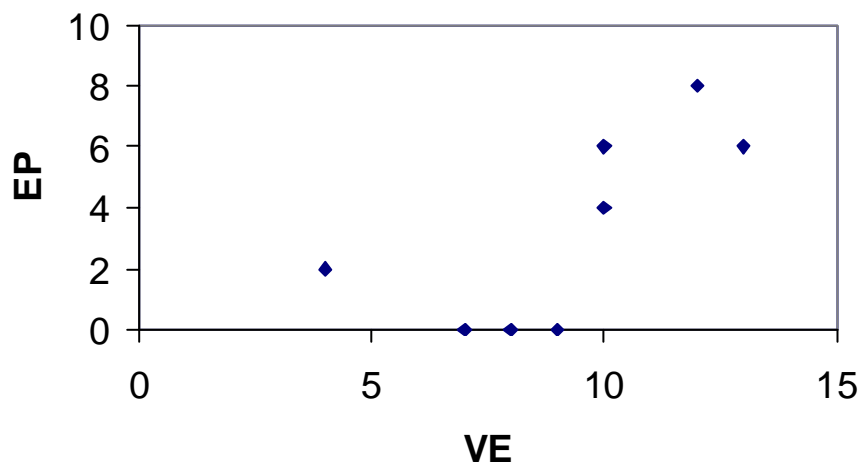
**Figura 7.** Rim de rato sem tratamento (controle): ausência de infiltrado inflamatório (A); rim de rato tratado com All: presença de arterite moderada e infiltrado inflamatório mononuclear (B). HE – 250X.

**Figura 8.** Rim de rato tratado com All + CV: presença de arterite discreta (A); rim de rato tratado com All + Los: presença de infiltrado inflamatório discreto (B). HE – 250X.



**P < 0,001; r = 1,00**

**Figura 9.** Correlação dos escores das lesões vasculares entre ventrículo esquerdo e ventrículo direito, obtida no grupo All.



**P = 0,02; r = 0,77**

**Figura 10.** Correlação dos escores das lesões vasculares entre ventrículo esquerdo e espaço porta, obtida no grupo All.

**Figura 11.** Miocárdio de rato tratado com AII (A), rim de rato tratado com AII (B): presença de células imunoreativas para o anticorpo marcador de macrófago (setas). Imuno-histoquímica – 200X.

**Figura 12.** Espaço porta de rato tratado com AII (A): presença de células imunoreativas para o anticorpo marcador de macrófago (setas). Imunohistoquímica. Miocárdio de rato tratado com AII (B): presença de mastócitos (setas). Vermelho Congo – Azul de Toluidina – 200X.



**Figura 13.** Rim de rato tratado com All (A) e espaço porta de rato tratado com All (B): presença de mastócitos (setas). Vermelho Congo – Azul de Toluidina – 200X.

## **5. Discussão**

### ***5.1. Peso corpóreo, frequência cardíaca e pressão arterial sistólica caudal***

A diferença de peso corpóreo observada entre os grupos All e All+Los no momento PC<sub>0</sub>, embora significativa, foi considerada fortuita, uma vez que a seleção dos animais para compor os grupos foi aleatória. É preciso salientar que os animais de menor peso no início do estudo eram aqueles que receberiam alguma droga na água de beber nos três dias subsequentes e que precederam a colocação da bomba. Logo, poder-se-ia suspeitar de que o tratamento com o carvedilol ou losartan naquele período, teria influenciado o ganho de peso dos animais. No entanto, durante os três dias em que houve a ingestão de alguma droga, sem a infusão de All, os animais apresentaram ganho de peso semelhante aos do grupo controle. Assim, as variações no ganho de peso no período subsequente não podem ser atribuídas ao carvedilol ou losartan, propriamente dito.

A observação da diminuição, no ganho de peso corpóreo dos animais infundidos por All, sugere que essa droga causou retardo de crescimento dos animais. O tratamento com carvedilol não anulou esse efeito. Contrariamente, o tratamento com losartan preveniu o atraso de crescimento dos animais.

Yamagishi et al. (1993) estudaram ratos Wistar submetidos a infarto miocárdico experimental e observaram diminuição do peso

corpóreo dos animais que receberam um antagonista do receptor AT<sub>1</sub> TCV-116 (1 mg/kg), durante três semanas através de sonda gástrica.

Jalil et al. (1999), utilizando um modelo de hipertensão renovascular em ratos Sprague-Dawley, verificaram redução significativa do peso corpóreo nos animais com isquemia renal unilateral, independente do tratamento com losartan (30 mg/kg). Os autores discutiram a possibilidade deste efeito estar relacionado à All e ser independente da pressão sangüínea.

Brink et al. (1996) realizaram estudo experimental em ratos Sprague-Dawley e verificaram que os animais infundidos por All na dose de 500 ng/kg/min., até 14 dias, apresentaram redução dos níveis plasmáticos de IGF-1 e sua ligação com as proteínas após uma e duas semanas. Estes autores observaram perda de peso acentuada, evidente a partir de 1-2 dias, sugerindo anorexia provocada pela droga. A utilização de losartan (25 mg/kg/dia) inibiu completamente a perda de peso nestes animais, sugerindo que o efeito anorexigênico da All é mediado pelo receptor AT<sub>1</sub>.

Ratajska et al. (1994a) observaram diminuição do peso corpóreo em ratos Sprague-Dawley infundidos com All (150 ng/kg/min.) em relação ao grupo controle, durante um, sete ou 14 dias de administração da droga. Moreau et al. (1997) estudaram ratos Wistar Kyoto submetidos à infusão de All durante duas semanas na dose de 200 ng/kg/min. e

observaram redução do peso corpóreo destes animais. Os autores não discutiram esses resultados.

Kabour et al. (1995) observaram redução do peso corpóreo em ratos Sprague-Dawley com hipertensão renovascular e também não discutiram se a variação foi dependente da ação da elevação da All. Porém, os autores verificaram prevenção desse efeito com o uso de doses terapêuticas do inibidor da enzima conversora de All, sugerindo que a perda de peso foi consequência do efeito dessa substância. Outro estudo realizado por Wiener et al. (1979), utilizando ratos Wistar Kyoto com hipertensão renovascular, apresentou resultados semelhantes e estes também não foram discutidos.

Contrariamente, Griffin et al. (1991), utilizando 200 ng/kg/min. de All em ratos Sprague-Dawley durante 10 a 12 dias, não observaram variação de peso corpóreo em animais recebendo All.

Da mesma forma, Dostal et al. (1992) obtiveram os mesmos resultados estudando ratos submetidos a infusão de All (30 ng/min.) durante sete e 14 dias.

Himura et al. (1993) estudaram cães sem raça definida, submetidos à insuficiência cardíaca experimental e observaram aumento significativo do peso corpóreo nos animais que desenvolveram insuficiência cardíaca direita. Estes resultados não foram discutidos pelos autores. É possível que esta diferença tenha ocorrido devido ao desenvolvimento de ascite

nos animais, diferentemente daqueles com insuficiência cardíaca esquerda, cujos pesos corpóreos foram semelhantes ao controle.

A observação de que o tratamento com carvedilol não impediu a perda de peso corpóreo sugere que esse efeito não está relacionado com a mediação de receptores adrenérgicos secundária a elevação da All.

Não é possível descartar que a perda de peso corpóreo esteja relacionado, ao menos em parte, ao estado hipertensivo dos animais, tendo em vista que os menores pesos ocorreram nos grupos com hipertensão.

#### *Freqüência cardíaca*

O aumento da freqüência cardíaca (FC) observado no grupo All seria esperado. A All apresenta efeito cronotrópico positivo direto e indireto. O efeito cronotrópico direto e os efeitos indiretos resultantes da interação entre a All e o sistema nervoso autônomo já foram amplamente discutidos na literatura, em estudos realizados em animais de laboratório (Ferrario et al., 1972; Fujii et al., 1985; Zimmerman et al., 1984).

Alguns autores sugerem que os efeitos cronotrópicos indiretos da All ocorrem não só devido à ativação simpática, mas também pela inibição da bradicardia induzida pelo barorreflexo (Krasney et al., 1965; Lee et al., 1980).

O efeito cronotrópico positivo não foi observado por outros autores que avaliaram a resposta à infusão contínua de All em humanos

(Goldsmith et al., 1990) e em ratos (Moreau et al., 1997), em acordo com os nossos achados.

A frequência cardíaca observada no grupo All + CV foi significativamente menor do que a observada nos grupos All e All + Los, refletindo o efeito betabloqueador do carvedilol.

A ação beta-bloqueadora do carvedilol foi estudada por Nagano et al. (1993), utilizando infusão intravenosa contínua de 0,5 mg/kg/h do medicamento, em ratos. Nesse estudo, o carvedilol apresentou ação bloqueadora significativa do receptor beta, mas não tão pronunciada quanto a verificada com o uso de propranolol. Utilizando a mesma dose de carvedilol durante 72 horas, porém, associada à administração de adrenalina, Irlbeck et al. (1996) obtiveram resultados semelhantes.

A administração de carvedilol na dose de 1 mg/kg, intravenoso, em ratos Sprague-Dawley, foi capaz de bloquear os efeitos cronotrópicos positivos de várias drogas (Willette et al., 1999). Smith et al. (1992) obtiveram resultados semelhantes utilizando a mesma dose da droga administrada de forma aguda e crônica (um e oito dias, respectivamente).

Watanabe et al. (2000) estudaram as propriedades cardioprotetoras do carvedilol em ratos Lewis com cardiomiopatia dilatada, induzida por miocardite auto-imune. A droga foi administrada por via oral durante dois meses, nas doses de 2 e 20 mg/kg/dia. Os autores observaram diminuição da frequência cardíaca nas duas doses utilizadas.

Barone et al. (1998), utilizando uma dose maior de carvedilol, 1200 ou 2400 ppm (30 mg ou 60 mg/dia, respectivamente) na dieta de ratos espontaneamente hipertensos, concluíram que houve uma discreta redução (10-18%) da frequência cardíaca dos animais estudados. Esses resultados são semelhantes aos obtidos no presente estudo, onde a redução da FC nos animais tratados com carvedilol em associação com a All, foi em média equivalente a 13%, em relação aos controles. Essa diferença, porém, não foi significativa. É preciso reforçar o fato de que o carvedilol preveniu a taquicardia induzida por All. Assim, apesar da ausência de testes específicos para avaliar o efeito bloqueador do carvedilol, assumimos que esse efeito ocorreu.

A frequência cardíaca dos animais tratados com losartan foi semelhante ao do grupo All. Esse resultado indica que o efeito cronotrópico positivo, não envolve a estimulação de receptores AT<sub>1</sub>. A possibilidade de efeito cronotrópico do losartan foi descartada pelas informações da literatura sobre estudos que avaliaram a frequência cardíaca e a atividade barorreflexa de ratos hipertensos tratados com essa droga (Catanzaro et al.,1998; Catanzaro et al., 1999, Farah al., 2000).

### *Pressão arterial*

A infusão subcutânea contínua de All causou hipertensão arterial significativa após três dias e níveis pressóricos semelhantes foram obtidos por outros autores (Wiener et al., 1979; Tan et al., 1991).

O efeito pressor da All é dependente da dose e do tempo de infusão da droga. A dose utilizada de 150 ng/min de All através de minibombas, é conhecida por causar necrose de miócitos e também foi usada por outros pesquisadores (Tan et al., 1991; Geenen et al., 1993; Kabour et al., 1994; Henegar et al., 1995).

Alguns autores utilizaram protocolos de infusão aguda de All como Giacomelli et al. (1976), que produziram hipertensão aguda em ratos Holzman após infusão intravenosa de angiotensina amida (1,7 µg/min./kg) durante quatro horas. Outros autores como Dostal et al., 1992; Geenen et al., 1993 e Brink et al., 1996, produziram hipertensão com a utilização de infusão contínua de All.

A ação pressora da All foi observada conforme o esperado, nos animais do grupo All. Os valores de pressão sistólica foram superiores a 150 mm Hg em 12 dos 17 animais estudados. Esses resultados estão de acordo com outros autores que avaliaram modelos experimentais semelhantes (Tan et al, 1991; Dostal et al., 1992; Brink et al., 1996).

Tan et al. (1991) utilizaram a dose de 200 ng/min. de All por meio de minibomba (IP) em ratos Sprague-Dawley durante um período de um a quatorze dias. Os autores não observaram aumento significativo da



pressão arterial durante os primeiros três dias de infusão. Posteriormente, um aumento gradual foi observado alcançando o pico no décimo dia de tratamento, com níveis de pressão sistólica que excediam 200 mm Hg.

Dostal et al. (1992) infundiram 30 ng/min. de All em ratos Sprague-Dawley durante sete ou 14 dias e observaram aumento significativo da pressão arterial nos dois períodos de administração da droga. As pressões arteriais dos ratos infundidos por 14 dias foram maiores do que as do período de sete dias.

Brink et al. (1996) realizaram estudo experimental em ratos Sprague-Dawley e verificaram que os animais infundidos por All na dose de 500 ng/kg/min. até 14 dias, apresentaram aumento da pressão arterial comparados ao grupo controle. No entanto, esta hipertensão foi observada em apenas 8% dos animais até o terceiro dia, e em 42% até o 14º dia. A utilização de losartan (25 mg/kg/dia) reduziu a pressão arterial no 6º dia. Estes dados são concordantes com Moreau et al. (1997) que estudaram ratos Wistar Kyoto submetidos à infusão de All durante duas semanas na dose de 200 ng/kg/min. e também observaram aumento significativo da pressão arterial. Griffin et al. (1991), utilizando a mesma dose de All em ratos Sprague-Dawley por 10 dias, produziram um lento efeito pressor de 52 mmHg comparado com os animais do grupo controle. O aumento da pressão arterial também foi observado por Catanzaro et al. (1998), que realizaram estudo experimental em ratos e verificaram que os

animais infundidos por All intravenosa na dose de 3,5 ng/min. durante 14 dias, apresentaram hipertensão.

Contrariamente, Ratajska et al. (1994a) não observaram aumento significativo da pressão arterial em ratos Sprague-Dawley com infusão contínua de All (150 ng/kg/min.) em relação ao grupo controle, durante um, sete ou 14 dias de administração da droga. A justificativa dos autores para a ausência da hipertensão foi a dose considerada subpressora. Portanto, a All, em situações experimentais comparáveis ao presente estudo mostrou causar hipertensão dependente da dose e do tempo de tratamento.

Classicamente, a All é considerada um vasoconstritor potente. A vasoconstrição ocorre por mediação de receptores  $AT_1$  localizados na parede dos vasos e na maioria dos órgãos e sistemas.

Recentemente, alguns autores sugeriram que o efeito tissular da All ocorreria por liberação local de catecolaminas (Henegar et al., 1995). A interação destes hormônios com os receptores  $\beta$  adrenérgicos é que seria responsável pelos efeitos da All no tecido. Se esse raciocínio fosse verdadeiro para o efeito vasoconstritor, seria esperada a vasoconstrição dependente de liberação de catecolaminas. Nesse caso, a catecolamina poderia ligar-se a receptores  $\alpha$  e  $\beta$  adrenérgicos. No caso de vasos, a maior concentração é de receptor  $\alpha_1$ . Portanto, a vasoconstrição deveria ser prevenida pelo carvedilol. No entanto, nossos resultados descartam

essa possibilidade, tendo em vista que a hipertensão desenvolvida pelos animais do grupo All + CV foi comparável ao grupo All.

Nossos resultados estão em acordo com os achados de Bhan et al. (1982) que avaliaram as pressões sangüíneas de ratos Wistar-Kyoto submetidos ao tratamento com bloqueadores dos receptores adrenérgicos. Os autores observaram que a pressão sangüínea não foi afetada pela injeção de propranolol, enquanto que a subsequente infusão de All resultou em um aumento significativo da pressão arterial, descartando o papel dos  $\beta$  bloqueadores no mecanismo de hipertensão.

A ausência de hipertensão no grupo All + Los demonstrou o efeito protetor da droga, reforçando o conceito de que o efeito pressor da All se faz por mediação de receptor  $AT_1$ . Este fato está de acordo com as observações de vários autores que demonstraram o efeito de prevenção da hipertensão arterial induzida pelo aumento de All exógena ou endógena (Kabour et al., 1995; Jalil et al., 1999; Catanzaro et al., 1999).

## ***5.2. Avaliação histológica de miocárdio, rim e fígado***

O grupo All apresentou lesões perivasculares evidentes, independente do órgão avaliado. Estas lesões podem ser descritas de uma forma subjetiva como menos intensas em fígado, mas, mesmo nesse caso, houve diferença significativa em relação ao grupo controle. Portanto, parece existir no fígado algum mecanismo natural de proteção contra os efeitos da All. Seria interessante avaliar a densidade de receptores para

All no miocárdio, rim e fígado para melhor justificar estas diferenças e pesquisar a possibilidade da ocorrência de mecanismos locais que modulam a lesão e que diferem de órgão para órgão.

A presença de correlação positiva e significativa entre os escores de lesão induzida por All em miocárdio do ventrículo esquerdo e do ventrículo direito não foi descrita previamente. Porém, é bem conhecido na literatura o envolvimento do ventrículo direito na remodelação miocárdica provocada pela ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (Weber et al., 1992). Esse envolvimento do ventrículo direito tem sido o principal argumento para a afirmação de que as lesões perivasculares e miocárdicas são conseqüentes ao efeito humoral da droga e não ao efeito mecânico da hipertensão. Mais interessante foi a observação da correlação positiva e significativa entre os escores de lesão de ventrículo esquerdo e de espaço porta hepático. Essa associação não foi descrita anteriormente e sugere fortemente o efeito vasculotóxico sistêmico da All, não restrito a órgãos-alvo.

Um achado interessante foi a ausência de correlação entre a intensidade de lesão vascular miocárdica e vascular renal. Os resultados aqui obtidos não permitiram conclusão definitiva sobre esse ponto, mas pode-se sugerir que o mecanismo final de agressão varia de animal para animal e depende do órgão avaliado. No entanto, Gavras et al. em 1971, observaram lesão renal em coelhos que receberam infusão aguda de All.

A hipótese de lesão vasculotóxica sistêmica da angiotensina II é reforçada pelos achados de outros autores. Cao et al. (1999) estudaram a mediação da hipertrofia vascular mesentérica em ratos recebendo All durante 14 dias.

Merecem atenção especial as alterações observadas em torno da veia terminal hepática. Embora esta lesão tenha sido descrita em associação com os vasos, é preciso salientar que não foi observado comprometimento da parede vascular propriamente dita, mas sim dos hepatócitos dessa região do ácino hepático.

A resposta hepatotóxica induzida por um agente químico depende da concentração da substância que atinge os hepatócitos através da circulação sanguínea do ácino. Os compostos hepatotóxicos produzem padrões característicos de morte celular em zonas específicas do ácino, devido à expressão diferenciada de enzimas e aos gradientes de concentração dos tóxicos e co-fatores, no sangue que circula ao longo do ácino (Kedderis, 1996). Deve ser considerado ainda, que os hepatócitos da zona 1, localizam-se mais próximos aos vasos aferentes recebendo assim as maiores quantidades de oxigênio e nutrientes. As células da zona 2 localizam-se na região intermediária e as da zona 3, próximos à veia terminal, portanto, recebem quantidades menores de oxigênio e nutrientes (Rappaport, 1973). Os hepatócitos da zona aferente (zona 1) e eferente (zona 3) diferem também na sua capacidade metabólica, devido à distribuição diferenciada das enzima, especialmente o citocromo P450,

que tem sua maior expressão nos hepatócitos da zona 3 (Jungerman & Katz, 1989). Finalizando, a presença de necrose dos hepatócitos observada neste estudo sugere um efeito hepatotóxico direto da All, mais evidente na zona 3 em decorrência das particularidades anatômicas e bioquímicas do ácino hepático.

O tratamento com o carvedilol atenuou as lesões vasculares em todos os tecidos analisados. No entanto, este grupo ainda apresentou mais lesões em miocárdio e rim do que o grupo controle, indicando que o efeito protetor não foi completo. Portanto, esses resultados sugerem que a lesão vascular seria causada por mediação  $\alpha_1$  e  $\beta$ , mas que outros mecanismos de lesão podem estar envolvidos, por exemplo, efeito direto via receptor  $AT_1$ . Contrariamente, Tan et al. em 1991 realizaram bloqueio  $\alpha$  e  $\beta$  e não observaram proteção ao utilizar propranolol e fenoxibenzamina, respectivamente. Estes achados podem ter ocorrido devido à forma de administração dessas drogas que ocorreu antes e durante a infusão de All, diferindo do nosso estudo onde os animais começaram a ingerir a droga na água de beber três dias antes da colocação das minibombas.

Embora tenha sido assumido que a dose utilizada de carvedilol apresentou efeito terapêutico, não é possível descartar a possibilidade de alguma ação mediada por receptores adrenérgicos. Isto é, permanece a questão sobre o efeito protetor adicional de doses mais elevadas. No entanto, esse não foi o objetivo deste trabalho que procurou avaliar a

intermediação de receptores  $\alpha$  e  $\beta$  nas lesões causadas por All em diferentes órgãos.

Outra possibilidade é que a lesão causada por All, pelo menos em parte, pode depender do fator mecânico hipertensão. Nesse caso, os animais recebendo carvedilol, porém, hipertensos, teriam alguma agressão induzida pelo nível pressórico elevado. Essa possibilidade ajudaria ainda a explicar a completa proteção da lesão veia terminal hepática pelo carvedilol. Uma vez que essa região não está submetida ao regime de hipertensão, restaria apenas o fator neuro-humoral como mecanismo de agressão e, nesse caso, ele seria mediado por receptores  $\alpha$  e  $\beta$  adrenérgicos. No entanto, alguns estudos onde foram utilizadas doses subpressoras de All, indicaram que os mecanismos que levam à necrose são independentes dos efeitos hipertensivos da All (Tan et al., 1991; Ratajska et al., 1993).

De acordo com este fato, Bhan et al., 1982 utilizando infusão aguda de All, encontraram evidências de que os agentes humorais poderiam provocar lesão vascular mesmo na ausência de hipertensão arterial.

A elevação persistente da PA após a utilização do carvedilol sugere efeito mediado por receptor  $AT_1$ . A proteção das lesões pelo carvedilol sugere efeito mediado por receptores adrenérgicos. Portanto, no modelo experimental que utiliza a infusão crônica de All, a vasoconstrição tem mediação  $AT_1$  e a lesão perivascular tem mediação adrenérgica e  $AT_1$ .

A utilização do antagonista dos receptores AT<sub>1</sub>, losartan, foi eficaz em atenuar as lesões quando avaliadas subjetivamente. Isto está de acordo com Kabour et al. (1994), que conseguiram prevenir a ocorrência das mesmas, utilizando uma dose semelhante àquela utilizada no presente estudo. Merece discussão a ausência da demonstração estatística desse efeito protetor. Foi interpretado que a variabilidade individual associada ao número relativamente pequeno de animais, contribuiu para esse resultado. A análise dos escores, caso a caso (tabela 2 do anexo), permitiu identificar que no grupo All, sete dos oito animais analisados apresentaram escores em ventrículo esquerdo maiores que cinco. No grupo All + Los, apenas dois animais apresentaram esses valores. Um raciocínio semelhante pode ser aplicado ao ventrículo direito e demais órgãos avaliados. Portanto, concluímos que o losartan apresentou efeito protetor parcial o qual variou de animal para animal.

A intensidade das lesões tissulares foi evidentemente menor do que a intensidade das lesões vasculares. Entretanto, a ausência de diferença estatística entre os grupos, dificultou a discussão sobre o efeito protetor das drogas utilizadas, ou mesmo das possíveis vias de agressão.

Em relação aos mecanismos fisiopatológicos envolvidos, poderíamos sugerir que as lesões tissulares que ocorreram, seriam secundárias à lesão vascular e, portanto, dependentes delas. Outra possibilidade é que a lesão tissular tenha ocorrido por ação direta da All,



mas de forma pouco intensa, não demonstrável em uma análise quantitativa como a utilizada no presente estudo.

Devido às várias evidências na literatura confirmando a lesão de miócitos nesse modelo experimental, devemos sugerir que essa lesão de fato ocorreu, mas sem a possibilidade de demonstração estatística, na avaliação pela microscopia óptica. Também consideramos que avaliações em protocolos mais prolongados poderiam evidenciar lesões mais pronunciadas.

A angiotensina II tem sido recentemente descrita como um importante estimulador na produção de radicais livres, além de ativar os mecanismos inflamatórios (Luft, 2001).

O envolvimento de reação inflamatória celular na remodelação miocárdica que segue a uma agressão cardíaca foi estudado em vários modelos experimentais (Kabour et al., 1994; Sun et al., 1994; Campbell et al., 1995).

Campbell et al. (1995) observaram nas áreas de necrose miocárdica induzida por All a presença de macrófagos e linfócitos, tanto no parênquima quanto na região ao redor dos vasos, desde o segundo dia até a sexta semana de evolução. Os neutrófilos foram identificados do segundo ao quarto dia. A presença de macrófagos perivasculares em miocárdio de ratos foi detectada por Ratajska et al., (1994b) no segundo dia de infusão de All. Os mesmos autores, observaram ocasionalmente neutrófilos, não tendo sido descritos linfócitos ou eosinófilos.

Foram identificados macrófagos e mastócitos em miocárdio, rim e fígado, em todos os grupos estudados, contrariando os achados de outros autores que atribuíram a lesão miocárdica induzida pela All, entre outros fatores, à presença de número aumentado dessas células (Kabour et al., 1994).

Os macrófagos são encontrados na maior parte dos órgãos, alguns dos quais são especializados e completamente diferenciados para o local onde residem. As principais funções dos macrófagos na mediação da reação inflamatória são a fagocitose, secreção de produtos pró-inflamatórios como a interleucina – 1, o fator de necrose tumoral, o fator ativador de plaquetas, as prostaglandinas e componentes do complemento. Além disso, elaboram enzimas como as dos lisossomas, além de proteases e lipases. Entretanto, essas enzimas, além de proteger, podem mediar a lesão celular. Os linfócitos T são responsáveis pela imunidade mediada por célula e os linfócitos B, pela resposta humoral. Os grânulos dos mastócitos possuem histamina e serotonina, importantes vasodilatadores que participam da fase aguda da inflamação e das respostas de hipersensibilidade tipo I (Ringler, 1997)

A maioria dos trabalhos da literatura não realizou a quantificação das células inflamatórias, apenas identificou as células presentes nos diferentes momentos avaliados. A descrição de aumentos na celularidade foi baseada na análise qualitativa. Hinglais et al. (1994) realizaram a quantificação de macrófagos e linfócitos no miocárdio de ratos

comparando áreas com lesão e sem lesão em relação à raça e idade., objetivando relacionar estas alterações com a fibrose miocárdica. Portanto, este modelo experimental não pode ser comparado ao nosso.

Outro aspecto relevante é o fato de lesões tissulares serem causadas pela ativação celular, independente do número de células inflamatórias. Essa ativação celular não pode ser identificada por técnica de imuno-reação, como a utilizada no presente estudo. Além disso, seria interessante a realização de um estudo temporal evolutivo onde a celularidade fosse avaliada em outros momentos.

No presente estudo, a maior celularidade não dependeu de polimorfonucleares, macrófagos ou mastócitos. Portanto, pode-se afirmar com alguma segurança que as células envolvidas eram linfócitos ou plasmócitos. A identificação definitiva, porém, exigiria a aplicação de técnicas mais específicas.

### ***5.3. Variáveis morfométricas cardíacas e porcentagem de água no miocárdio***

#### *Pesos dos ventrículos esquerdo e direito*

A hipertrofia cardíaca ocorre por estimulação neuro-hormonal (Teerlink, 1996) e por sobrecarga crônica de pressão (Weber et al., 1987; Okoshi et al., 1997). No entanto, o tempo referido na literatura para a detecção de hipertrofia do ventrículo esquerdo em modelos experimentais

que envolvem a elevação exógena ou endógena de All em ratos é de 10 dias (Lever et al., 1992). Portanto, a ausência de variação dos pesos ventriculares era esperada.

#### *Porcentagem de água no ventrículo esquerdo*

É sabido que o aparato para estudo do coração isolado, perfundido por solução de Krebs promove edema miocárdico. Uma vez que havia lesões vasculares importantes nos grupos experimentais, houve a preocupação de que esses corações apresentassem edema adicional quando estudados no aparato, devido ao maior extravasamento da solução nutriente pelos vasos lesados. Se isso fosse um fenômeno importante, poderia haver disfunção diastólica ventricular causada pelo edema e não pelo protocolo experimental, propriamente dito. O fato de não ter sido identificada uma porcentagem de água mais elevada nos grupos com lesão vascular, permitiu que fosse descartada esta possível fonte de erro.

#### **5.4. Estudo funcional**

A angiotensina II afeta o coração através de importantes interações com o sistema nervoso autônomo. Existe um efeito direto sobre o miocárdio ventricular e um efeito inotrópico adicional resultante do aumento do tônus simpático. Além disso, a All também interage com o

sistema parassimpático inibindo o tônus vagal, contribuindo desta forma para o aumento da contratilidade (Ikram, 1996).

Assim, a ação inotrópica positiva resultante da infusão de All seria esperada, o que não ocorreu. Essa observação permite sugerir algumas possíveis explicações. Inicialmente, existem controvérsias sobre o efeito inotrópico da All dependendo da espécie animal. Resultados contrastantes têm sido publicados a respeito do efeito inotrópico da All, dependendo do modelo experimental e da espécie utilizada. O efeito inotrópico positivo cardíaco descrito em hamsters, gatos e coelhos, ainda não foi confirmado em outras espécies (Baker et al., 1992; Huizer et al., 1992).

Ishihata e Endoh (1995), estudaram o efeito inotrópico da All “in vitro” no miocárdio de ratos, coelhos, cães e *ferrets*, com o objetivo de esclarecer os mecanismos responsáveis pelas variações deste efeito entre estes animais e observaram que a All apresentou efeito inotrópico apenas em coelhos.

Traquandi e Riva (1998), utilizaram o modelo do coração isolado em ratos e observaram um efeito inotrópico dose-dependente induzido pela All.

Outra possibilidade relaciona-se com a preparação utilizada para o estudo da função ventricular. Os modelos utilizados para o estudo “in vivo” e “in vitro” da função ventricular em ratos infundidos pela All são bastante diversificados. A preparação de Langendorff é classicamente utilizada no

mundo todo para o estudo “in vitro” das propriedades mecânicas e eletrofisiológicas do coração (Curtis et al., 1986).

Traquandi e Riva (1998), utilizando essa preparação, estudaram os efeitos da administração de All no perfusato em ratos antes e após isquemia miocárdica e não observaram redução significativa da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo nos animais antes da isquemia, indicando ausência de efeito inotrópico direto.

Neste modelo experimental, é importante considerar ainda que a All exógena pode ter sido lavada do tecido pelo perfusato ou inativada enzimaticamente pelas angiotensinas, no período imediato que precedeu o estudo da função, após a retirada do coração do tórax do animal, justificando desta forma a ausência de efeito.

A pressão isovolumétrica correspondente à pressão diastólica igual a 25 mmHg (Piso<sub>25</sub>) foi semelhante entre os grupos em relação ao grupo controle. A diferença encontrada entre os grupos All + Los e All poderia sugerir que o primeiro tem menor contratilidade, em relação ao segundo. Porém, é preferível interpretar esse resultado com cautela. A contratilidade é uma propriedade complexa que envolve vários fatores e não pode ser quantificada por um único índice, mesmo nessa preparação “in vitro”, onde fatores como a pré-carga e a pós-carga são facilmente controlados. Tendo em vista que os demais indicadores não mostraram diferenças entre os dois grupos, preferimos assumir que não houve variação real da contratilidade. Em estudo prévio realizado em nosso

laboratório, foi analisado um grupo de ratos recebendo lisinopril (10 mg/kg) por oito semanas. O tratamento com este inibidor da enzima conversora de All não levou a alterações na contratilidade dos corações estudados. Estes resultados são concordantes com os nossos achados no que se refere à ausência de efeito inotrópico pelo losartan.

Outra possibilidade que pode ser considerada é a presença de um efeito inotrópico positivo promovido pela All e um efeito inotrópico negativo de All + Los, ou seja, estes grupos teriam efeitos inotrópicos opostos, discretos e não demonstráveis estatisticamente. A contraposição destes efeitos permitiu a demonstração estatística da diferença.

Em relação ao grupo All + CV, observamos valores semelhantes ao grupo controle e bem próximos aos do grupo All. Diferentemente o grupo All + Los apresentou menores valores da  $P_{25}$  quando comparado ao All + CV. Isto pode ter ocorrido devido à ação do carvedilol em receptores alfa e beta adrenérgicos, não interferindo nos receptores da All e conseqüentemente na contratilidade.

Mesmo tendo ocorrido algum efeito inotrópico nos grupos estudados, esse efeito não foi intenso o suficiente para ser demonstrado estatisticamente.

A primeira derivada temporal negativa da pressão ventricular ( $-dP/dt$ ) foi a única variável de função diastólica analisada que refletiu a fase ativa desse período do ciclo cardíaco. Nenhum dos grupos experimentais diferiu do controle, indicando que as alterações histológicas

não foram suficientes para prejudicar o relaxamento na preparação do coração isolado. Não é possível descartar que o coração "in vivo" tivesse alterações funcionais secundárias às lesões vasculares. É preciso salientar a diferença entre os grupos All e All + Los e cabe o mesmo raciocínio desenvolvido com relação à sístole. Isto é, All e losartan teriam efeitos discretos, mas opostos, no relaxamento, só evidenciável quando foram contrapostos os dois grupos, sem relação com o controle.

Os resultados da função sistólica e diastólica analisados em conjunto, indicaram que as alterações histológicas em miocárdio produzidas pela All não causaram disfunção ventricular imediata. Outros estudos utilizando diferentes protocolos experimentais também sugeriram que a função é comprometida após a lesão miocítica instalada. Okoshi et al. (1997) analisaram a função miocárdica de ratos hipertensos com isquemia renal unilateral. Após quatro semanas de evolução, não foi possível demonstrar alterações funcionais sistólicas e diastólicas apesar das evidentes lesões miocíticas.

Outro aspecto a ser salientado é que no presente estudo as alterações histológicas foram predominantemente concentradas ao redor dos vasos, estando os miócitos relativamente bem preservados. Assim, nas condições experimentais utilizadas, onde a oferta de oxigênio e nutrientes é grande, a possível insuficiência arterial causada pelas lesões histológicas poderia ser anulada, explicando a ausência de disfunção ventricular.



## 6. Conclusões

- 1) A All causa lesões vasculares em coração, fígado e rim, indicando efeito vasculotóxico sistêmico;
- 2) As lesões vasculares foram nitidamente mais acentuadas que as alterações tissulares, independente do órgão avaliado;
- 3) Existe efeito hepatotóxico direto da All, mais evidente na zona 3 do ácino hepático;
- 4) As alterações histológicas em miocárdio, causadas pela infusão contínua de All por 72 horas, não foram suficientes para causar disfunção ventricular analisada no coração isolado;
- 5) Houve proteção conferida pelo carvedilol, confirmando a participação de receptores  $\alpha$  e  $\beta$  – adrenérgicos no mecanismo de agressão induzida pela All;
- 6) O losartan, na dose utilizada, apresentou efeito protetor parcial, o qual variou de animal para animal.

## 7. Referências Bibliográficas<sup>1</sup>

BARONE, F. C., CAMPBELL, W. G., NELSON, A. H. Carvedilol reverts severe hypertensive cardiomyopathy and remodeling. *J. Hypertens.*, v.16, p.871-84, 1998.

BAKER, K. M., BOOZ, G. W., DOSTAL, D. E. Cardiac actions of angiotensin II: role of an intracardiac renin-angiotensin system. *Annu. Rev. Physiol.*, v.54, p.227-41, 1992.

BHAN, R. D., GIACOMELLI, F., WIENER, J. Adrenoreceptor blockade in angiotensin-induced hypertension: effect on rat coronary arteries and myocardium. *Am. J. Pathol.*, v.108, p.60-71, 1982.

BRINK, M., WELLEN, J., DELAFONTAINE, P. Angiotensin II causes weight loss and decreases circulating insulin-like growth factor I in rats through a pressor-independent mechanism. *J. Clin. Invest.*, v.97, p. 2509-16, 1996.

---

<sup>1</sup> UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. **Normas para publicações da UNESP**. São Paulo: Editora UNESP, 1994. v.2: Referências Bibliográficas. BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

CAMPBELL, S. E., JANICKI, J. S., WEBER, K. T. Temporal differences in fibroblast proliferation and phenotype expression in response to chronic administration of angiotensin II or aldosterone. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, v. 27, p.1545-60, 1995.

CAO, Z., DEAN, R., WU, L. et al. Role of angiotensin receptor subtypes in mesenteric vascular proliferation and hypertrophy. *Hypertension*, v.34, p.408-14, 1999.

CATANZARO, Hu L., LARAGH J. H., SEALEY, J. E. Delayed recovery of hypertension after single dose losartan in angiotensin II-infused conscious rats. *J. Hypertens.*, v.17, p.1443-50, 1999.

CATANZARO, Hu L., PITARRESI, T. M., LARAGH J. H. et al. Identical hemodynamic and hormonal responses to 14-day infusions of renin or angiotensin II in conscious rats. *J. Hypertens.*, v.16, p.1285-98, 1998.

CHIU, A. T., HERBLIN, W. F., McCall, D. E. et al. Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.165, p.196-203, 1989.

CURTIS, M. J., MACLEOD, B. A., TABRIZCHI, R. et al. An improved perfusion apparatus for small animal hearts. *J. Pharmacol. Methods*, v.15, p.87-94, 1986.

DOSTAL, D. E., BAKER, K. M. Angiotensin II stimulation of left ventricular hypertrophy in adult rat heart. *Am. J. Hypertens.*, v.5, p. 276-80, 1992.

DUNN, C. J., LEA, A. P., WAGSTAFF, A. J. Carvedilol. A reappraisal of its pharmacological properties and therapeutic use in cardiovascular disorders. *Drugs*, v.54, p.161-85, 1997.

FARAH, V. M. A., MOREIRA, E. D., USHIZIMA, M. et al. Acute AT<sub>1</sub> receptor blockade does not improve the depressed baroreflex in rats with chronic renal hypertension. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.33, p.1491-6, 2000.

FERRARIO, C. M., GILDENBERG, P. L., McCUBBIN, J. W. Cardiovascular effects of angiotensin mediated by the central nervous system. *Circ. Res.*, v.30, p.257-62, 1972.

FUJII, A. M., VATNER, S F Direct vs. indirect pressor and vasoconstrictor actions of angiotensin II in conscious dogs. *Hypertension*, v.7, p.253-61, 1985.

GAVRAS, H., LEVER, A. F., MACADAM, R. F. et al. Acute renal failure, tubular necrosis, and myocardial infarction induced in the rabbit by intravenous angiotensin II. *Lancet*, v.2, p. 19-22, 1971.

GAVRAS, H., LEVER, A. F., MACADAM, R. F. et al. Angiotensin and norepinephrine induced myocardial lesions: experimental and clinical studies in rabbits and man. *Am. Heart J.*, v.89, p.321-32, 1975.

GEENEN, D. L., MALHOTRA, A., SCHEUER, J. Angiotensin II increases cardiac protein synthesis in adult rat heart. *Am. J. Physiol.*, v.265, p.238-43, 1993.

GIACOMELLI, F., ANVERSA, P., WIENER, J. Effect of angiotensin-induced hypertension on rat coronary arteries and myocardium. *Am. J. Pathol.*, v.84, p.111-38, 1976.

GOLDSMITH, S., HASKING, G. J. Suppressor angiotensin II infusions do not stimulate sympathetic activity in humans. *Am. J. Physiol.*, v.258, p.179-82, 1990.

GRIFFIN, S. A., BROWN, W. C. B., MACPHERSON, F. et al. Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. *Hypertension*, v.17, p.626-35, 1991.

GUYTON, A. C. *Textbook of medical physiology*. 8.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1991. 1014p.

HENEGAR, J. R., SCHWARTZ, D. D., JANICKI, J. S. Ang II-related myocardial damage: role of cardiac sympathetic catecholamines and  $\beta$ -receptor regulation. *Heart Circ. Physiol.*, suppl., p.534-41, 1998.

HENEGAR, J. R., BROWER, G. L., KABOUR, A. et al. Catecholamine response to chronic ANG II infusion and its role in myocyte and coronary vascular damage. *Am. J. Physiol.*, v.269, p.1564-9, 1995.

HIMURA, Y., FELTEN, S. Y., KASHIKI, M. et al. Cardiac noradrenergic nerve terminal abnormalities in dogs with experimental congestive heart failure. *Circulation*, v.88, p.1299-309, 1993.

HINGLAIS, N., HEUDES, D., NICOLETTI, A. et al., Colocalization of myocardial fibrosis and inflammatory cells in rats. *Lab. Invest.*, v.70, p.286-94, 1994.

HSU, S. M., RAINE, L., FANGE, R. H. A comparative study of the peroxidase – antipeoxidase method and avidin biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am. J. Clin. Pathol.*, v.75, p. 734-41, 1981.

HUIZER, T., MEER, van der, JONG, J. W. Captopril inhibits angiotensin I induced coronary flow reduction in isolated rat Heart but has no effect on contractility or energy metabolism. *Eur. Heart J.*, v.13, p.109-14, 1992.

IKRAM, H. The renin-angiotensin-aldosterone system and cardiac ischaemia. *Heart*, v.76, suppl.3, p.60-7, 1996.

IRLBECK, M., MUHLING O., IWAI, T. et al. Different response of the rat and right heart to norepinephrine. *Cardiovasc. Res.*, v.31, p.157-62, 1996.

ISHIHATA, A., ENDOH, M. Species-related differences in inotropic effects of angiotensin II in mammalian ventricular muscle: receptors, subtypes and phosphoinositide hydrolysis. *Br. J. Pharmacol.*, v.114, p.447-53, 1995.

JALIL, J. E., EBENSPERGER, R., MELÉNDEZ, J. et al. Effects of antihypertensive treatment on cardiac IGF-1 during prevention on ventricular hypertrophy in the rat. *Life Sci.*, v.64, p.1603-12, 1999.

JOHNSTON, C. I. Tissue angiotensin converting enzyme in cardiac and vascular hypertrophy, repair, and remodeling. *Hypertension*, v.23, p.258-68, 1994.

JUNGERMANN, K., KATZ, N. Functional specialization of different hepatocyte populations. *Physiol. Rev.*, v.70, p.708-64, 1989.

KABOUR, A., HENEGAR, J. R., JANICKI, S. Angiotensin II (All)-induced myocyte necrosis: role of the All receptor. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, v.23, p.547-53, 1994.

KABOUR, A., HENEGAR, J. R., DEVINENI, V. R. et al. Prevention of angiotensin II induced myocyte necrosis and coronary vascular damage by lisinopril and losartan in the rat. *Cardiovasc. Res.*, v.29, p.543-8, 1995.

KEDDERIS, G. L. Biochemical basis of hepatocellular injury. *Toxicol. Pathol.*, v.24, p.77-83, 1996.

KRASNEY, J. A., PAUDLER, F. T., SMITH, D. C. et al. Mechanisms of cardioaccelerator action of angiotensin. *Am. J. Physiol.*, v.209, p. 539-44, 1965.



LEE, W. B., ISMAY, M. J., LUMBERS, E. R. Mechanisms by which angiotensin II affects the heart rate of the conscious sheep. *Circ. Res.*, v.47, p.286-92, 1980.

LEVER, A. F., LYALL, F., MORTON, J. J. et al. Angiotensin II, vascular structure and blood pressure. *Kidney Int.*, v.41, p.S51-5, 1992.

LUFT, F. C. Mechanisms and cardiovascular damage in hypertension. *Hypertension*, v.37, p.594-8, 2001.

MOREAU, P., d'Uscio L. V., SHAW, S. et al. Angiotensin II increases tissue endothelin and induces vascular hypertrophy. *Circulation*, v.96, p.1593-7, 1997.

OKOSHI, M. P., MATSUBARA, L. S., FRANCO, M. et al. Myocyte necrosis is the basis for fibrosis in renovascular hypertensive rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.30, p.1135-44, 1997.

NAGANO T., OHARROW S., SPONER G. et al. Norepinephrine-induced changes in rat-heart function, metabolism, and weight are antagonized by carvedilol. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, v.21, p.530-6, 1993.

RAPPAPORT, A. M. Microcirculatory hepatic units. *Microvasc. Res.*, v.6, p.212-28, 1973.

RATAJSKA A., CAMPBELL S. E., WEBER, K.T. Angiotensin II and myocardial scarring: response in intact and adrenalectomized rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, v.25, p.78, 1993.

RATAJSKA, A., CAMPBELL, S. E., CLEUTJENS, J. P. M. et al. Angiotensin II and structural remodeling of coronary vessels in rats. *J. Lab. Clin. Med.*, v.124, p.408-15, 1994a.

RATAJSKA A., CAMPBELL S. E., SUN, Y. et al. Angiotensin II associated cardiac myocyte necrosis: role of adrenal catecholamines. *Cardiovasc. Res.*, v.28, p.684-90, 1994b.

RINGLER, D. J. Inflammation and Repair. In: JONES, T. C., HUNT, R. D., KING, N. W. *Veterinary pathology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997. p.113-20.

RODRIGUES, M. A. M., BREGAGNOLLO, E. A., MONTENEGRO, M. R. et al. Coronary vascular and myocardial lesions due to experimental constriction of the abdominal aorta. *Int. J. Cardiol.*, v.35, p.253-7, 1992.

RUFFOLO Jr., R. R., BROL, A., FEUERSTEIN, G. Z. Cardioprotective potential of carvedilol. *Cardiology*, v.82, p.24-8, 1993.

SMITH, E. F., SLIVJAK, M. J., GAGNON, R. Single and repeated doses of the vasodilatador beta-adrenergic antagonist, carvedilol, block cirazoline-mediated and isoproterenol-mediated hemodynamic-responses in the conscious rat. *Cardiovasc. Drug Ther.*, v.6, p.499-504, 1992.

STREINER, D. L., NORMAN, G. R. *Biostatistics: the bare essentials*. St. Louis: Mosby Year Book, 1994. 260p.

SUN, Y., CLEUTJENS, J. P. M., DIAZ-ARIAS, A. A. et al. Cardiac angiotensin converting enzyme and myocardial fibrosis in the rat. *Cardiovasc. Res.*, v.28, p.1423-32, 1994.

TAN, L. B., JALIL, J. E., PICK, R. et al. Cardiac myocyte necrosis induced by angiotensin II. *Circ. Res.*, v.69, p.1185-95, 1991.

TARPLEY, J. E., MESCHTER, C. L., TYLER, D. E. Modified congo-red acidified toluidine blue stain: a new technique for simultaneous staining of eosinophils and mast cells in paraffin tissue section. *J. Histotechnol.*, v.7, p. 141-2, 1984.

TEERLINK, J. R. Neurohumoral mechanisms in heart failure: a central role for the rennin-angiotensin system. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, v.27, p.1-8, 1996.

TIMERMMANS, P. B. M. W. M., WONG, P. C., CHIU, A. T. et al. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol. Rev.*, v.45, p.205-51, 1993.

TRAQUANDI, C., RIVA, E. Cardiac Effects of Angiotensin I and Angiotensin II: dose-response studies in the isolated heart. *Pharmacol. Res.*, v.37, p.57-65, 1998.

YAMAGISHI, H., KIM, S., NISHIKIMI, T. et al. Contribution of cardiac renin-angiotensin system to ventricular remodelling in myocardial-infarcted rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, v.25, p.1369-80, 1993.

YOSHIKAWA, T., PORT, J. D., ASANO, K. et al. Cardiac adrenergic receptor effects of carvedilol. *Eur. Heart J.*, v.17, p.8-16, 1996.

WATANABE, K., OHTA, Y., NAKAZAWA, M. et al. Low dose carvedilol inhibits progression of heart failure in rats with dilated cardiomyopathy. *Br. J. Pharmacol.*, v.130, p.1489-95, 2000.

WEBER, K. T., JANICKI, J. S., REEVES, R. C. Factors influencing left ventricular shortening in isolated canine heart. *Am. J. Physiol.*, v.230, p. 419-26, 1976.

WEBER, K. T., CLARK, W. A., JANICKI, J. S. et al. Physiologic versus pathologic hypertrophy and the pressure-overloaded myocardium. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, v.10, p.37-49, 1987.

WEBER, K. T., FACC, P. A., ARMSTRONG, P. W. et al. Remodeling and reparation of the cardiovascular system. *J. Am. Coll. Cardiol.*, v. 20, p.3-16, 1992.

WICHERN, D. W., JOHNSON, R. A. *Applied multivariate statistical analysis*. 3. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1992. 642p.

WHITEBREAD, S., MELE, M., KAMBER, B. et al. Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.163, p.284-91, 1989.

WIENER, J., GIACOMELLI, F., LOUD, A.V. et al. Morphometry of cardiac hypertrophy induced by experimental renal hypertension. *Am. J. Cardiol.*, v.22, p.919-29, 1979.

WILLETTE, R. N., AIYAR, N., YUE, T. L. et al. In vitro and in vivo characterization of intrinsic sympathomimetic activity in normal and heart failure rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.289, p.48-53, 1999.

ZIMMERMAN, B. G., SYBERTZ, E. J., WONG, P. C. Interaction between sympathetic and renin-angiotensin system. *Hypertension*, v.2, p.581-7, 1984.

ZORNOFF L. A. M., PAIVA, S. A. R., TORNERO, M. T. T., et al. Influência do acréscimo de manitol à solução nutriente no desempenho mecânico e no grau de edema miocárdico de corações isolados de ratos. *Arq. Bras. Cardiol.*, v.64, p.225-9, 1995.

Tabela 1. Valores individuais de peso corpóreo final ( $PC_f$ ), pressão arterial final ( $PA_f$ ) e frequência cardíaca (FC), relativos aos grupos Controle, All, All + CV e All + Los.

Animal	$PC_f$ (g)	$PA_f$ (mmHg)	FC (bpm)
controle	274	120	---
controle	275	120	---
controle	279	150	---
controle	265	125	---
controle	271	120	316
controle	312	120	375
controle	279	130	260
controle	277	130	375
controle	278	145	428
controle	264	130	461
controle	301	130	400
controle	278	125	500
controle	276	140	428
controle	249	90	375
controle	247	120	353
controle	277	125	462
All	271	155	---
All	271	170	---
All	269	215	---
All	268	160	---
All	206	160	375
All	309	170	375
All	243	180	428
All	208	210	500
All	248	120	600
All	289	125	545
All	248	140	500
All	271	120	375
All	274	195	333
All	253	180	375
All	268	135	318

Continua

Tabela 1. Continuação

All	274	170	462
All	249	200	315
All + CV	260	180	428
All + CV	233	210	400
All + CV	256	170	375
All + CV	224	140	250
All + CV	255	155	300
All + CV	249	130	400
All + CV	243	200	333
All + CV	215	130	318
All + CV	223	180	300
All + CV	256	180	353
All + CV	253	190	316
All + CV	252	230	400
All + CV	261	240	250
All + CV	252	225	333
All + CV	245	160	375
All + Los	238	160	545
All + Los	265	100	428
All + Los	290	115	375
All + Los	280	135	353
All + Los	291	160	333
All + Los	274	100	400
All + Los	238	120	400
All + Los	283	120	428
All + Los	225	140	353
All + Los	220	120	500
All + Los	233	120	428
All + Los	259	150	375
All + Los	263	170	400
All + Los	253	120	400
All + Los	254	120	400
All + Los	272	120	400
All + Los	260	120	500

---

(---) dados perdidos



Tabela 2. Valores individuais dos escores das lesões perivasculares em ventrículo esquerdo (VE), ventrículo direito (VD), espaço porta (EP), veia terminal (VT) e rim, relativos aos grupos Controle, All, All + CV e All + Los.

Animal	VE	VD	EP	VT	RIM	TOTAL
controle	0	0	0	0	0	0
controle	0	0	0	0	0	0
controle	0	0	0	0	0	0
controle	0	0	0	0	0	0
controle	0	0	0	0	0	0
controle	0	0	0	0	0	0
controle	0	0	0	0	0	0
controle	0	0	0	0	0	0
controle	0	0	0	0	0	0
All	13	13	6	9	9	50
All	12	11	8	8	8	50
All	8	8	0	12	12	35
All	10	10	4	11	11	44
All	9	9	0	13	13	36
All	10	10	6	5	5	34
All	4	4	2	3	3	15
All	7	7	0	4	4	22
All + CV	1	1	2	1	1	5
All + CV	3	3	1	1	1	8
All + CV	2	2	2	2	2	8
All + CV	1	1	0	0	0	2
All + CV	1	1	0	0	0	2
All + CV	2	2	1	0	0	6
All + CV	2	2	2	1	1	7
All + Los	7	4	4	4	4	23
All + Los	1	2	3	10	10	17
All + Los	5	4	1	4	4	15
All + Los	4	4	0	2	2	11
All + Los	4	3	1	1	1	10
All + Los	10	10	5	7	7	37
All + Los	1	8	3	0	0	15
All + Los	4	4	4	3	3	18

Tabela 3. Valores individuais dos escores das lesões tissulares em ventrículo esquerdo (VE), ventrículo direito (VD), fígado e rim, relativos aos grupos Controle, All, All + CV e All + Los.

Animal	VE	VD	FÍGADO	RIM	TOTAL
controle	0	0	0	0	0
controle	0	0	0	0	0
controle	0	0	0	0	0
controle	0	0	0	0	0
controle	0	0	0	0	0
controle	0	0	0	0	0
controle	0	0	0	0	0
controle	0	0	0	0	0
controle	0	0	0	0	0
All	1	0	0	0	1
All	2	4	0	3	9
All	0	0	0	0	0
All	0	0	1	0	1
All	6	0	0	0	6
All	4	8	0	0	12
All	0	0	0	0	0
All	0	0	0	0	0
All + CV	1	0	0	1	2
All + CV	0	0	0	0	0
All + CV	0	0	0	2	2
All + CV	5	1	0	2	8
All + CV	0	0	0	0	0
All + CV	0	0	0	2	2
All + CV	0	0	1	3	4
All + Los	0	0	0	0	0
All + Los	0	0	0	1	1
All + Los	0	0	0	0	0
All + Los	0	0	0	0	0
All + Los	0	0	0	1	1
All + Los	0	0	0	0	0
All + Los	0	0	0	0	0
All + Los	0	0	0	0	0

Quadro 1. Quadro utilizado para a realização da leitura das lâminas das lesões vasculares

Lesão	Identificação: P 2138/98 (Controle) Rato 1			
	VE	VD	Fígado *	Rim
Vascular				
Edema celular				
Esteatose				
Congestão				
Infiltrado celular inflamatório				
NTA				
Apoptose				
Necrose focal				
Outros				

\*Fígado=espaço porta; Fígado=veia terminal

Ausente = 0 (0 %); Discreto = + (25 %); Moderado = ++ (50 %); Acentuado = +++ (100 %)

Quadro 2. Quadro utilizado para a realização da leitura das lâminas das lesões tissulares.

Lesão	Identificação: P 2142 (Controle) Rato 5			
	VE	VD	Fígado	Rim
Tissular				
Edema celular				
Esteatose				
Congestão				
Infiltrado celular inflamatório				
NTA				
Apoptose				
Necrose focal				
Outros				

Fígado=lesões >5 mm do vaso

Ausente = 0 (0 %); Discreto = + (25 %); Moderado = ++ (50 %); Acentuado = +++ (100 %)

NOTA: Para cada item estudado, serão atribuídos os escores 0, 1, 2 ou 3, de acordo com a análise histopatológica.