Aurélia Araújo Fernandes

AVALIAÇÃO DA CONTRATILIDADE VENTRICULAR DIREITA 7 E 60 DIAS APÓS INFARTO DO MIOCÁRDIO EM RATOS COM E SEM INSUFICIÊNCIA CARDÍACA E MESMA ÁREA DE CICATRIZ

Tese apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo para a obtenção do Título de Doutora em Ciências Fisiológicas pelo programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Vitória

2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Universidade Federal do Espírito Santo
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

AURÉLIA ARAÚJO FERNANDES

AVALIAÇÃO DA CONTRATILIDADE VENTRICULAR DIREITA 7 E 60 DIAS APÓS INFARTO DO MIOCÁRDIO EM RATOS COM E SEM INSUFICIÊNCIA CARDÍACA E MESMA ÁREA DE CICATRIZ

Orientadora:
Prof. Dra. Ivanita Stefanon

Banca Examinadora:
Prof. Dra. Alessandra Simão Padilha
Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo
Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereita
Prof. Dr. Leonardo Antônio Mamede Zornoff

Suplentes:
Prof. Dra. Silvana Meyrelles
Prof. Dr. José Geraldo Mill

Fernandes, Aurélia Araújo, 2010

AVALIAÇÃO DA CONTRATILIDADE VENTRICULAR DIREITA 7 E 60 DIAS APÓS INFARTO DO MIOCÁRDIO EM RATOS COM E SEM INSUFICIÊNCIA CARDÍACA E MESMA ÁREA DE CICATRIZ [Vitória] 2010

106 p., 29,7cm (UFES, M. Sc., Ciências Fisiológicas, 2009)

Tese, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF.

Orientação: Prof. Dra. Ivanita Stefanon, UFES

1. Infarto do Miocárdio 2. Insuficiência Cardíaca 3. Contratilidade 4. Ratos

AVALIAÇÃO DA CONTRATILIDADE VENTRICULAR DIREITA 7 E 60 DIAS APÓS INFARTO DO MIOCÁRDIO EM RATOS COM E SEM INSUFICIÊNCIA CARDÍACA E MESMA ÁREA DE CICATRIZ

Aurélia Araújo Fernandes

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas- Fisiologia Cardiovascular.

Aprovado em: ____ / ____ / _____

_____

Profa. Dra. Ivanita Stefanon - Orientadora, PPGCF-UFES

_____

Profa. Dra. Alessandra Simão Padilha

_____

Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo, PPGCF-UFES

_____

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira, PPGDI-UFES

_____

Prof. Dr. Leonardo Antônio Mamede Zornoff

_____

Coordenador do PPGCF: Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, Maio de 2010

Dedico este trabalho à minha orientadora Ivanita Sfetanon por todo seu auxílio

e ao meu marido, Leonardo, pelo mais leal companheirismo

SUMÁRIO

Abreviaturas e símbolos..... 1

Resumo..... 2

Abstract..... 4

1. INTRODUÇÃO.....

1.1. Insuficiência cardíaca.....

1.2. Área de infarto.....

1.3. Alterações no transiente de Ca^{2+} na insuficiência cardíaca.....

1.4. O Modelo Utilizado para o Estudo do Infarto do Miocárdio e Insuficiência Cardíaca.....

2. OBJETIVOS.....

2.1. Objetivo geral.....

2.2. Objetivo específico.....

3. MATERIAIS E MÉTODOS.....

3.1. Animais experimentais e Indução do Infarto do Miocárdio.....

3.2. Medidas hemodinâmicas e Avaliação Ponderal.....

3.3. Avaliação da Área de Infarto do Miocárdio.....

3.4. Avaliação da Contratilidade do Ventrículo Direito.....

3.5. Avaliação da expressão das proteínas contráteis pelo método de Western Blot.....

4. RESULTADOS.....

4.1. Medidas hemodinâmicas e avaliação ponderal.....

4.2. Medida da área de infarto.....

4.3. Estudos *in vitro* da mecânica dos ventrículos.....

4.4. Avaliação das correlações da força com os indicadores de IC.....

4.5.Avaliação das Proteínas Envolvidas no Transiente de Ca^{2+}.....

5. DISCUSSÃO.....

6. CONCLUSÃO.....

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....

Abreviaturas e símbolos

AI	Área de infarto
AMP_c	Adenosina monofosfato cíclica
DP/dT	Primeira derivada temporal da pressão intraventricular
FC	Freqüência cardíaca
IC	Insuficiência cardíaca
IM	Infarto do miocárdio
Inf	Grupo infartado sem insuficiência cárdica
$_{i}$NOS	Óxido nítrico sintase induzível
Isso	Isoproterenol
$L_{máx}$	Comprimento ótimo
NCX	Trocador Na^{+}/Ca^{2+}
PC	Peso corporal
PDfVE	Pressão diastólica final no ventrículo esquerdo
PKA	Proteína quinase A
PLB	Fosfolambam
PLB^{B}	Fosfolambam fosforilada
PP/PC	Razão entre o peso do pulmão e o peso corporal
PPP	Potenciação pós-pausa
RS	Retículo sarcoplasmático
VD	Ventrículo direito
VD/PC	Razão entre o peso do ventrículo direito e o peso corporal
VE	Ventrículo esquerdo
VE/PC	Razão entre o peso do ventrículo esquerdo e o peso corporal

RESUMO

RESUMO

AVALIAÇÃO DA CONTRALIDIDADE VENTRICULAR DIREITA 7 E 60 DIAS APÓS INFARTO DO MIOCÁRDIO EM RATOS COM E SEM INSUFICIÊNCIA CARDÍACA E MESMA ÁREA DE INFARTO

A insuficiência cardíaca (IC) é a principal causa de mortalidade e morbidade após o infarto do miocárdio (IM). Tem com características a redução do débito cardíaco, o aumento da pressão venosa e o remodelamento cardíaco, o qual culmina com dano gradual da função cardíaca. Freqüentemente, a IC esquerda leva a disfunção diastólica ventricular direita e este evento associa-se ao maior risco de admissões hospitalares. Tem sido proposto que a avaliação da função ventricular direita propicia um prognóstico mais eficiente do desenvolvimento, evolução e instalação da IC após o IM. O objetivo deste estudo foi avaliar a contratilidade do ventrículo direito (VD) nas fases inicial (1 semana) e tardia (8 semanas) após IM, em animais que se subdividiram em: infartado com IC (grupo IC) e sem IC (grupo Inf). Os animais foram anestesiados com mistura Xilasina (10 mg/Kg) e Quetamina (50 mg/Kg), i.m., e o IM foi induzido cirurgicamente através da oclusão da artéria coronariana descendente anterior esquerda, a 5 mm de sua origem. Após 1 e 8 semanas os animais foram anestesiados com uretana (1,2 g/Kg. i.p.), e cateterizados para a realização das medidas pressóricas intraventricular e arterial. Os registros foram obtidos através de um transdutor de pressão modelo TSD 104 A acoplado a um sistema Biopac MP 100. Tiras do VD foram retiradas e montadas em preparação de contração isométrica e nutridas com solução de Krebs normal, mantidas a 30^{o}C, e estimuladas eletricamente (0,5 Hz; 80 mV). Todos os protocolos foram aprovados pelo comitê de ética local CEUA-EMESCAM. Ambos os grupos tiveram a mesma área de cicatriz de infarto (entre 30 e 45%). A área de cicatriz não se correlacionou com os sinalizadores da IC (pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDfVE), aumento da razão peso do pulmão e peso corporal (PP/PC) e hipertrofia do VD) nem com a contratilidade das tiras do VD. A PDfVE estava elevada no grupo IC e inalterada no grupo Inf, nas fases inicial (IC=15 ± 1*; Inf=5,2 ± 0,8; Sham=3,7 ± 0,6 mmHg) e tardia do

IM (IC=16 ± 2,5*; Inf=7,5 ± 0,7; Sham=5,2 ± 0,5 mmHg), *P<0,05 ANOVA uma via, post hoc Tukey. No grupo IC, houve hipertrofia do VD e aumento da razão PP/PC apenas na fase tardia. O peso corporal foi menor no grupo IC na fase inicial, mas igual aos grupos sham e Inf na fase tardia. Contudo, houve correlação negativa entre a força desenvolvida pelas tiras do VD e o peso corporal nas fases inicial e tardia após IM. As respostas inotrópicas ao Ca^{2+} e ao isoproterenol estavam preservadas no grupo IC 1 semana após IM e prejudicadas após 8 semanas. Inversamente, o grupo infartado, sem IC, teve prejuízo destas respostas na fase inicial e manteve sua funcionalidade normal na fase tardia. As expressões das proteínas envolvidas no transiente de Ca^{2+} (SERCA-2a, fosfolambam total, fosfolambam fosforilada e trocador Na^{+}/Ca^{2+}) não foram diferentes entres os grupos na fase inicial. Na fase tardia, porém, houve aumento da expressão da SERCA-2a e da razão SERCA/PLB apenas no grupo Inf. Os resultados apresentados neste estudo demonstram que a disfunção do VD, em ratos com IC, apenas se manifesta tardiamente (2,5 mM de $CaCl_2$: Sham 8 semanas= 157 ± 18,4; Inf 8 semanas= 138 ± 17,3; IC 8 semanas= 62 ± 10,3*#; P<0,05; 10^{-5} M de Iso: Sham 8 semanas= 149 ± 14; Inf 8 semanas= 137 ± 18,7; IC 8 semanas= 58 ± 8,1*# P<0,05) . Sendo assim, na fase inicial, os animais com IC preservaram a função contrátil do VD (2,5 mM de $CaCl_2$: Sham 1 semana= 186 ± 8,3; Inf 1 semana= 135 ± 11,7; IC 1 semana= 158 ± 13,1*; P<0,05; 10^{-5} M de Iso: Sham 1 semana= 145 ± 9,9; Inf 1 semana= 108 ± 10,8*+; IC 1 semana= 166 ± 12 P<0,05). Os animais sem IC preservaram a função contrátil na fase tardia, e apresentaram aumento da expressão da SERCA-2a. A diferença na capacidade de resposta inotrópica diante de uma ativação β-adrenérgica entre os grupos infarto, com e sem IC, poderia envolver os mecanismos de *upregulation* e *downregulation* dos receptores β-adrenérgicos.

ABSTRACT

ABSTRACT

RIGHT VENTRICLE CONTRACTILITY ASSESSMENT 7 AND 60 DAYS AFTER MYOCARDIAL INFARCTION IN RATS WITH OR WITHOUR HEART FAILURE AND SAME SCAR SIZE

Heart failure (HF) is the major cause of death and morbidity after myocardial infarction (MI) that can result in reduced cardiac output, increased venous pressure and cardiac remodeling. Usually, the left ventricle failing causes right dysfunction being related to greater risk of hospitalization. It has been suggested that assessment of right ventricle (RV) function is of important value to prognostic of HF after MI. Therefore, the aim of this study was to assess right ventricle contractility early (one week) and late phase (eight weeks) after MI. MI with signal of HF (HF group) and without signal of HF (Inf group) were compared to a sham-operated group (sham). Wistar male rats were anaesthetized with Ketamine (50 mg/kg) and Xylazine (5 mg/kg), *i.m.*, and MI was induced through left coronary artery ligation at 3 mm of its origin. After 1 and 8 weeks the rats was anaesthetized with urethane (1.2 g/kg *i.p.*) and a catheter was inserted into the aorta and left ventricle to pressures measurements using a pressure transducer (TSD 104A) coupled to a Biopac MP100 system. Strips from the right ventricle were removed and attached to an isometric transducer and superfused at 30ºC with Krebs solution, stimulated at 0.5 Hz and 80 mV. The experimental protocols were approved by the local animal ethics committee (CEUA-EMESCAM). Both infarct groups presented same scar size (Inf 1 week= 32.4 ± 3; HF 1 week=33.7 ± 2.2; Inf 8 weeks= 26.5 ± 1.1; HF 8 weeks= 25 ± 0.9). The scar size did not have correlation with HF signals (left ventricle end diastolic pressure (LVEDP), increased lung weight and body weight ratio (LW/BW) and right ventricle to body weight ratio (RV/BW) neither with RV contractility. The LVEDP increased in HF group but not in the Inf group early (1 week: HF=15 ± 1*; Inf=5.2 ± 0.8; Sham=3,7 ± 0,6 mmHg) and late after MI (8 weeks: Hf=16 ± 2.5*, Inf- 7.5 ± 0.7; Sham= 5.2 ± 0.8 mmHg), *P< 0.05 ANOVA one way, post hoc Tukey. In the HF group LW/BW and RV/BW ratio was increased in the late phase, but not in the early phase after MI. The body weight was smaller in the HF group at 1 week, but similar to sham

and Inf 8 weeks after MI. Therefore, there was a negative correlation between force development in the RV strips and body weight in both early and late phase after MI. The inotropic response~~s~~ to Ca^{2+} and Isoproterenol were preserved in HF group one week after MI and reduced at 8 weeks (8 weeks; $CaCl_2$ 2.5 mM: sham= 157 ± 18.4; Inf= 138 ± 17.3; HF= 62 ± 10.3 g/g P<0.05; Isoproterenol 10^{-5} M: sham = 149 ± 14; Inf = 137 ± 18.7; HF = 58 ± 8.1 g/g P<0.05). Inversely, in the Inf group, the positive intropic response was reduced in the early phase and reduced in the late phase (1 week; $CaCl_2$ 2.5 mM: Sham= 186 ± 8.3; Inf = 135 ± 11.7; HF= 158 ± 13.1 g/g; P<0.05; Isoproterenol 10^{-5} M: Sham= 145 ± 9.9; Inf= 108 ± 10.8; HF= 166 ± 12 g/g P<0.05). The Ca^{2+} handling proteins expression (sarcoplasmatic reticulum calcium pump (SERCA-2a), phosfolamban (PLB total), PLB phosphorylated and Na^{+}/Ca^{2+} exchange) were not different among the groups in the early phase. But, in the late phase there was a SERCA-2a overexpression and an higher SERCA/PLB ratio just in the Inf group. In conclusion, the scar size did not correlate with HF signals neither with RV contractility. The RV dysfunction was found in the late phase after MI in rats with HF. However, the rats with HF maintain the RV function in early phase after MI. The infarct rats without HF maintained the RV contractility and increase SERCA-2a expression in the late phase after MI. The different inotropic β-adrenergic response between the groups with and without HF could be induced by different mechanisms involving upregulation and downregulation of the β-receptors during the early and late phase after MI.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Insuficiência Cardíaca

A insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome complexa em que ocorre dano gradual da função cardíaca acarretando um alto índice de morbidade e mortalidade na população mundial. Cerca de 25% das hospitalizações de idosos com 65 anos ou mais tem como causa a insuficiência cardíaca (Lyon *et al*., 2009). Caracterizada pela redução do débito cardíaco e aumento da pressão venosa, a IC é acompanhada de alterações moleculares que, por sua vez, conduzem a uma deterioração progressiva do coração e morte prematura dos cardiomiócitos levando a inabilidade da bomba cardíaca em suprir sangue de modo adequado para atender às demandas metabólicas dos tecidos (Seixas-Cambão & Leite-Moreira, 2009).

Cardiopatias como hipertensão, insuficiência valvar, miocardiopatia dilatada e infarto do miocárdio majoritariamente evoluem com IC. No entanto, o infarto do miocárdio (IM) é a principal etiologia da IC em humanos devido a sua alta incidência na população e também pela melhora no seu diagnóstico e tratamento o que vem possibilitando um aumento no número de sobreviventes após sofrer tal injúria (Francis *et al*., 2001; Lacey & Tabberer, 2005; Heart Disease and Stroke Statistic, 2006).

O IM é uma injúria irreversível causada pela isquemia prolongada em consequência da oclusão total ou parcial de uma ou mais artérias coronárias. O IM causa, no ventrículo, efeitos imediatos e em longo prazo, em que a isquemia do miocárdio, ocorrida inicialmente, progride com remodelamento ventricular e disfunção da bomba cardíaca (Pfeffer *et al*., 1985). O enrijecimento da parede ventricular na área infartada e a dilatação da câmara ventricular são seguidos de hipertrofia compensatória e fibrose da porção não infartada do miocárdio. Tais mudanças ocorridas, em longo prazo no miocárdio, tornam-se mal-adaptativas levando ao aumento do estresse de parede e da demanda de oxigênio e diminuição da contratilidade, o que leva a instalação e progressão da doença (Sun & Weber, 2000; Lacey & Tabberer, 2005).

A conseqüente disfunção da bomba cardíaca pode se dever tanto à disfunção sistólica quanto diastólica. A disfunção sistólica deve-se à

incapacidade do coração em ejetar sangue, sob pressão adequada, para a aorta e tronco pulmonar, ocasionada pela diminuição da contratilidade miocárdica. A disfunção diastólica relaciona-se ao esvaziamento inadequado devido ao comprometimento do enchimento e relaxamento ventriculares (Figueroa & Peters, 2006). Na IC crônica as disfunções sistólica e diastólica são mais apropriadamente definidas em termos da alteração da arquitetura ventricular (tamanho e forma da cavidade e espessura da parede). A IC sistólica do ventrículo esquerdo caracteriza-se, em termos arquiteturais, por um coração dilatado (hipertrofia excêntrica), enquanto que a IC diastólica, tipicamente, se expressa por um ventrículo de paredes espessadas, não complacentes com dimensões reduzidas (hipertrofia concêntrica) (Seixas-Cambão & Leite-Moreira, 2009).

Os mecanismos propostos para explicar o aparecimento da disfunção ventricular são complexos, mas destacam-se: modificações no movimento de cálcio, alterações da via β-adrenérgica, modificações das proteínas contráteis, prejuízo da resposta dos miofilamentos ao Ca^{2+}, redução da freqüência de formação de pontes cruzadas, morte celular, acúmulo de colágeno, alterações das metaloproteases, aumento do estresse oxidativo, déficit energético, modificações das proteínas do citoesqueleto, da membrana e da matriz e alterações da geometria ventricular (Daniels *et al*., 2007; Zornoff *et al*., 2008, Stefanon *et al*., 2009).

A insuficiência cardíaca esquerda pode culminar com um prejuízo na função ventricular direita. A hipótese de que o remodelamento ventricular esquerdo poderia afetar a função do ventrículo direito foi aventada já em 1910 (Voelkel *et al*., 2006). Atualmente tem se mostrado que a disfunção diastólica ventricular direita, em pacientes com IC esquerda, está associada com o aumento do risco de admissões hospitalares (Haddad *et al*., 2008).

A fração de ejeção do ventrículo direito e a disfunção ventricular direita representam prognósticos fortes e independentes de mortalidade em doenças cardíacas, especialmente na IC (Groote *et al*., 1998; Zornoff *et al*., 2000; Haddad *et al*., 2008). Em um estudo com humanos, Di Salvo *et al*., (1995) mostraram que a avaliação da fração de ejeção ventricular direita em pacientes com IC classe funcional II, III e IV de acordo com a *New York Heart Association* foi melhor prognóstico da gravidade da IC do que a medida do pico de

consumo de oxigênio (pico de VO_2) tanto no repouso quanto no exercício. Este mesmo estudo sustenta a hipótese de que a capacidade em realizar exercícios em pacientes com avançada IC pode, de fato, estar mais relacionada com o desempenho do ventrículo direito do que a do ventrículo esquerdo. Já Groote *et al*., (1998) relataram que a fração de ejeção ventricular direita é um prognóstico independente da sobrevivência em pacientes com IC estável e moderada.

Na IC a disfunção do ventrículo direito se desenvolve em associação com a disfunção do ventrículo esquerdo. A insuficiência ventricular esquerda aumenta a pós-carga do ventrículo direito por aumentar a pressão venosa pulmonar. A dilatação ventricular esquerda restringe a função diastólica ventricular direita e a disfunção ventricular esquerda reduz a pressão de perfusão coronariana no ventrículo direito (Juilliere *et al*., 1997; Voelkel *et al*., 2006).

A função diastólica do ventrículo direito é frequentemente anormal em pacientes com IC e um dos mecanismos que levam ao seu prejuízo é a hipertensão pulmonar secundária ao aumento prolongado da pressão atrial. As alterações nesta câmara ventricular podem ocorrer em uma relação de muita proximidade com as alterações no ventrículo esquerdo que acompanham o IM e tal relação pode ser evidenciada pela hipertrofia do ventrículo direito que ocorre em uma fase muito precoce após a doença cardíaca isquêmica (Zornoff *et al*., 2002). Contudo, a avaliação da função ventricular direita possui um importante papel na determinação dos sintomas e prognóstico da IC (Yu *et al*., 1996, Zornoff *et al*., 2000). No entanto, pouco se tem estudado sobre a função contrátil ventricular direita, *in vitro* e *in vivo,* após o IM em corações em que as modificações hemodinâmicas tenham se instalado no ventrículo esquerdo.

1.2. Área de Infarto do Miocárdio

Um importante determinante do prognóstico do infarto é o tamanho da área de cicatriz. Como bem descrito na literatura, grandes infartos induzem a um processo de remodelamento cardíaco que geram mudanças morfológicas, histológicas e moleculares de ambas as áreas, infartada e remanescente ao infarto (Pfeffer *et al*., 1979, Pfeffer *et al*., 1991).

A formação da cicatriz de infarto tem início já nas primeiras horas da ocorrência da injúria. Logo após a necrose tecidual a reparação é rapidamente iniciada para reconstruir o miocárdio infartado e manter a integridade estrutural do ventrículo. Inicialmente forma-se edema, as células inflamatórias são atraídas até o local da injúria, são ativados peptídeos regulatórios e ocorre a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese). Seguido do processo inflamatório, há proliferação de fibroblastos e deposição de colágeno formando todo o tecido cicatricial. As alterações do tecido conectivo são vistas aos 40 minutos após a oclusão experimental da coronária em ratos e a degradação do colágeno já passa a ser significante durante as primeiras semanas após o infarto (Fishbein *et al*., 1978; Pfeffer & Braunwald 1990; Sun & Weber 2000; Ertl & Frantz 2005). Depois de várias semanas, uma sólida cicatriz é formada com uma estrutura estável de colágeno. O tamanho da cicatriz de infarto é algo dinâmico já que a perda do miocárdio viável é progressiva após a injúria, portanto a região infartada pode expandir ou contrair durante as primeiras semanas mesmo após o término da perda tecidual (Ertl & Frantz 2005).

O desempenho ventricular após o IM está relacionado com a extensão da perda tecidual. Segundo Pfeffer *et al*., (1979) grandes infartos em ratos, envolvendo mais de 46% do ventrículo esquerdo resultam no prejuízo da função ventricular esquerda, já infartos moderados (31 a 46%) e pequenos (4 a 30%) não alteram os índices cardíacos. Mathey *et al*., (1974) mostraram que grandes infartos se associam a altas pressões arteriais diastólicas pulmonares e alta mortalidade em humanos. Anversa *et al*. (1985) relataram a relação direta entre o tamanho da área de infarto e a *performance* ventricular em modelos de animais, bem como ocorre em humanos, mostrando que após grandes infartos em ratos há redução do débito cardíaco, redução da pressão desenvolvida no ventrículo, hipertrofia do tecido remanescente, os quais são fatores que contribuem para a deterioração das propriedades fisiológicas do ventrículo infartado. Fletcher *et al*. (1981) demonstraram em ratos pós infartados o aumento do volume diastólico final do ventrículo esquerdo o qual ocorre em função do tamanho do IM, destacando, portanto, que o grau de dilatação ventricular correlaciona-se com o prejuízo da performance cardíaca e este por sua vez, está relacionado com o tamanho do IM.

Fica evidente que o tamanho do IM apresenta relações muito íntimas com as repercussões hemodinâmicas que a oclusão da coronária pode ocasionar. No entanto, o método utilizado para a determinação do tamanho do infarto é uma variável importante que deve ser considerada para as inferências neste modelo experimental, já que a medida do tamanho de cicatriz do IM pode variar de acordo com o emprego do método.

Há quatros diferentes métodos empregados experimentalmente para se quantificar a área de cicatriz: 1) determinação da área infartada em relação à área do ventrículo esquerdo, determinada por histologia ou por planimetria; 2) histologia com a determinação do perímetro interno da região infartada em relação ao perímetro total da cavidade; 3) histologia com a determinação das circunferências epicárdicas e endocárdicas dos segmentos infartados e não infartados e por fim, 4) ecocardiograma com a determinação do perímetro interno da região infartada em relação ao perímetro total da cavidade (Minicucci *et al*., 2007).

A determinação da área de infarto em relação à área do ventrículo esquerdo medida por histologia ou planimetria é capaz de subestimar em aproximadamente 15% o tamanho da cicatriz (Minicucci *et al*., 2007). As medidas realizadas utilizando os perímetros internos são capazes de superestimar o tamanho do IM bem como a medida por ecocardiograma já que áreas de aderência podem ser interpretadas como regiões hipocinéticas, mas que são, portanto, áreas não infartadas (Minicucci *et al*., 2007; Zornoff *et al*., 2008). Frente às divergências no emprego do método para medida do IM, Minicucci *et al*. (2007) avaliaram qual o mais fidedigno para realizar a distinção entre pequenos e grandes infartos e concluíram que a avaliação utilizando o perímetro interno da região infartada em relação ao perímetro total da cavidade apresentou uma sensibilidade de 96 % e especificidade de 65 % na quantificação da área de cicatriz.

1.3. Alterações no transiente de Ca^{2+} na Insuficiência Cardíaca

Sabe-se que a homeostase anormal de Ca^{2+} contribui para a instalação da disfunção no miocárdio hipertrofiado subseqüente ao desenvolvimento da falência cardíaca (Houser *et al*., 2000). As mudanças no transiente de Ca^{2+} que ocorrem nos corações insuficientes são uma via final e comum para a

deterioração progressiva e o desenvolvimento da IC. Alguns estudos suportam a hipótese de que a transição para a hipertrofia cardíaca, característica da IC, ocorre associada à incapacidade de se manter normais o balanço de Ca^{2+} (Hasenfuss *et al*., 1997; Frank *et al*., 2003; Bers, 2006; Armoundas *et al*., 2007; Mork *et al*., 2009).

Durante o potencial de ação cardíaco, o influxo de Ca^{2+} ocorre através da membrana sarcolemal, via canais de Ca^{2+} do tipo-L. A elevação difusa do Ca^{2+} intracelular preenche os espaços subsarcolemais, onde os túbulos-T e o retículo sarcoplasmático (RS) juncional estão em proximidade. A abertura dos canais que liberam Ca^{2+}, chamados receptores de rianodina presentes no RS juncional, dispara a liberação adicional de Ca^{2+} estocado no RS (liberação de Ca^{2+}-Ca^{2+} induzida), o qual ativa as proteínas contráteis induzindo a contração muscular (Bers & Despa 2006). A fração de Ca^{2+} liberada pelo RS depende do conteúdo de Ca^{2+} do mesmo e da magnitude do disparo da liberação de Ca^{2+} através dos receptores de rianodina. O transiente de Ca^{2+} gerado em decorrência da liberação Ca^{2+} do RS varia com a espécie, estimando-se que em mamíferos como coelhos 77% do Ca^{2+} disponível para a contração é originário do RS e em ratos este valor é de 92% (Bers 2000). Outras duas condições que geram variação no transiente de Ca^{2+} é o avanço da idade e a instalação de doenças cardíacas como a IC (Orchard & Brette 2008).

A sinalização do Ca^{2+} entre a superfície da membrana sarcolemal e o RS é anormal na IC. Assim, a corrente de Ca^{2+} através dos canais de Ca^{2+} tipo-L é menos efetiva para disparar a liberação de Ca^{2+} do RS em miócitos hipertrofiados e insuficientes e também por haver mudanças estruturais nos túbulos-T onde os canais de Ca^{2+} do tipo L estão em maior população (Orchard &. Brette, 2008). Outras inferências quanto redução na liberação de Ca^{2+} em corações insuficientes tem sido feitas quanto à anormalidade no nível de fosforilação dos receptores de rianodina interferindo na probabilidade de abertura destes canais (Bers, 2006).

O relaxamento do miócito depende do declínio na concentração de Ca^{2+} intracelular para possibilitar a dissociação deste íon dos miofilamentos contráteis. O efluxo de Ca^{2+} do citosol ocorre principalmente via bomba de Ca^{2+} do RS, a SERCA-2a, a qual capta Ca^{2+} novamente para o interior do RS. O trocador Na^{+}/Ca^{2+} contribui para o efluxo de Ca^{2+} já que transporta um íon Ca^{2+}

para o meio extracelular em troca de 3 íons Na^+ para o meio intracelular (Bers & Despa, 2006). A captação de Ca^{2+} para dentro do RS realizada pela SERCA-2a e o efluxo de Ca^{2+} realizado através do trocador Na^+/Ca^{2+} são dois mecanismos que trabalham juntos para o retorno deste íon aos níveis diastólicos (Ahlers *et al.,* 2005). No entanto, a importância quantitativa destes mecanismos na remoção do Ca^{2+} varia com a espécie, sendo que em ventrículos de coelhos, a SERCA-2a remove 70% e o trocador Na^+/Ca^{2+} 28% deste íon. Já em ventrículos de ratos, a atividade da SERCA-2a é maior do que em coelhos, sendo esta bomba responsável pela remoção de 92% do Ca^{2+} e apenas 7% é feita pelo trocador Na^+/Ca^{2+}. Em humanos, esta remoção é semelhante a de coelhos (Hasenfuss, 1998; Bers & Despa, 2006).

Torna-se evidente que as ações coordenadas entre os canais de Ca^{2+} tipo-L do sarcolema, a SERCA-2a e o trocador Na^+/Ca^{2+} permitem ao miócito manter o balanço normal de Ca^{2+} batimento a batimento. No entanto, tem se visto em modelos experimentais e em humanos com IC, que a quantidade de Ca^{2+} liberada a partir do RS é menor que o normal (Ahlers *et al.* 2005). A diminuição no conteúdo de Ca^{2+} do RS não somente reduz a quantidade máxima de Ca^{2+} disponível para ser liberado durante a contração, como também prejudica o disparo da liberação de Ca^{2+}-Ca^{2+} induzida através dos receptores de rianodina (Stern, 1992). O que não se sabe é a causa pela qual a quantidade de Ca^{2+} do RS está diminuída na IC. Especula-se que os mecanismos envolvidos possam se dever à redução da captação de Ca^{2+} pela SERCA-2a, pelo aumento na extrusão de Ca^{2+} pelo trocador Na^+/Ca^{2+}ou aumento no vazamento de Ca^{2+} pelo RS (Bers *et al*., 2003).

Há estudos que mostram uma depressão da captação de Ca^{2+} do RS através SERCA-2a (Houser *et al.* 2000; Hasenfuss & Pieske, 2002; Ahlers *et al.*, 2005). Estudos realizados por Afzal e Dhalla (1992), com frações de membrana isoladas do ventrículo esquerdo (VE) de ratos em 4, 8 e 16 semanas após IM mostraram uma diminuição na velocidade máxima da captação de Ca^{2+} pelo RS sem alteração da afinidade da SERCA-2a por este íon. A redução na velocidade máxima de captação de Ca^{2+} ocorre pela diminuição no RNAm e da quantidade de SERCA-2a após IM e no estágio final da IC humana (Zarain-Herzberg *et al*., 1996).

A fosfolambam é uma fosfoproteína regulatória com 52 aminoácidos capaz de modular a atividade de transporte de Ca^{2+} pela SERCA-2a. Tal fosfoproteína é uma inibidora reversível da SERCA-2a e associada a esta, a fosfolambam a inibe de recaptar Ca^{2+} para o RS. A fosforilação da fosfolambam é garantida pela proteína kinase A ou pela proteína kinase dependente de Ca^{2+}-calmodulina. Quando fosforilada a fosfolambam deixa de inibir a SERCA-2a e a recaptação de Ca^{2+} para dentro do RS torna-se possível durante a diástole cardíaca (Waggoner *et al*., 2009). Desta forma, a fosfolambam é uma importante reguladora do relaxamento do miocárdio durante a diástole, por acelerar a remoção intracelular de Ca^{2+}, além de contribuir na manutenção do conteúdo de Ca^{2+} sarcoplasmático (Couchonal & Anderson, 2008).

O aumento da expressão da fosfolambam está associado com a diminuição da afinidade da SERCA-2a pelo Ca^{2+} (Frank *et al*., 2003). Parte-se do pressuposto que a razão SERCA-2a/fosfolambam no miócito cardíaco exercem um papel importante na regulação da contratilidade miocárdica (Koss *et al*., 1996). As alterações na expressão da fosfolambam têm sido analisadas em paralelo com as alterações da expressão da SERCA-2a (Frank *et al*., 2003), em que a superexpressão da fosfolambam leva a diminuição da expressão da SERCA-2a (Boknik *et al*., 1999). Alguns estudos indicam que a razão SERCA-2a/PLB está diminuída na IC, fato que se deve ao aumento da expressão da fosfolambam e diminuição da expressão da SERCA-2a nestes corações. (Hajjar *et al*., 1997; Meyer *et al*., 1999 ; Ito *et al*., 2000; Armoundas *et al*., 2007).

Sob condições normais, o Ca^{2+} entra nos miócitos vindo do meio extracelular gerando um gradiente eletroquímico. No potencial de repouso da membrana e concentração intracelular de Na^{+} há energia suficiente para gerar um gradiente eletroquímico para promover a remoção de Ca^{2+} a partir do trocador Na^{+}/Ca^{2+}. Este é um importante mecanismo para promover o efluxo de Ca^{2+} em miócitos cardíacos humanos (Bers 2000, Bers 2006).

Quando a membrana é despolarizada e/ou há aumento de Na^{+} intracelular, a energia do gradiente eletroquímico do Ca^{2+} é suficiente para produzir a entrada de Ca^{2+} via modo reverso do trocador Na^{+} /Ca^{2+}, o que contribui para a elevação do Ca^{2+} intracelular na fase inicial do platô do

potencial de ação. A força que movimenta este trocador advém do gradiente eletroquímico do Na^+ (Blaustein & Lederer 1999; Bers, 2000; Bers, 2006). Um aspecto importante do funcionamento deste trocador é seu efeito sobre contratilidade do miocárdio. O aumento do Na^+ intracelular, pode induzir a uma elevação da razão entre o Ca^{2+} intracelular e o Ca^{2+} extracelular. Esse efeito aumenta a contratilidade, pois há uma retenção do Ca^{2+} dentro da célula. Tal mecanismo explica bem o fato de que agentes que inibam a Na^+/K^+-ATPase, como os glicosídeos digitálicos, produzem efeito inotrópico positivo (Dipolo & Beaugé, 2006). Inversamente, a redução de Na^+ intracelular favorece o efluxo de Ca^{2+}, via este trocador, reduzindo a contratilidade miocárdica (Katz 1992).

É evidente que o aumento na abundância e na atividade do trocador Na^+/Ca^{2+} na IC está associado com a homeostase alterada de Ca^{2+}. Há estudos que discutem que o aumento do modo reverso do trocador Na^+/Ca^{2+} contribuiu para anormalidades no transiente de Ca^{2+} em miócitos humanos insuficientes (Bers, 2000; Armoundas *et al*., 2007). Sugere-se que o aumento na atividade do trocador Na^+/Ca^{2+} na fase inicial da IC é compensatório uma vez que há redução na função da SERCA-2a. O modo reverso do trocador Na^+/Ca^{2+} e a SERCA-2a trabalham em conjunto para produzir o decaímento de Ca^{2+}. No entanto, em ratos a relação de transporte SERCA2a/ trocador Na^+/Ca^{2+} é maior e o efluxo de Ca^{2+} via trocador Na^+/Ca^{2+} é pequeno (<5%), o que contribui minimamente para o decaimento de Ca^{2+} mesmo quando há superexpressão do trocador Na^+/Ca^{2+} (Bers, 2000).

A homeostase de Ca^{2+} é também comprometida na IC devido ao desvio no balanço da atividade da SERCA-2a e do trocador Na^+/Ca^{2+} (diminuição da razão SERCA2a/ trocador Na^+/Ca^{2+}) (Houser *et al*, 2000). Tal idéia é apoiada por recentes observações que mostram que a diminuição na quantidade de SERCA-2a/ trocador Na^+/Ca^{2+} está associada com redução da sobrecarga de Ca^{2+} do RS, com decaimento lento do transiente de Ca^{2+} e uma relação força-frequência negativa. Um desequilíbrio da razão SERCA e trocador Na^+/Ca^{2+} pode produzir também uma persistente diminuição da carga de Ca^{2+} do RS.

Conjuntamente, as modificações moleculares e celulares contribuem para diminuir a função da bomba cardíaca na IC. Músculos cardíacos insuficientes mostram redução da capacidade de restabelecer os níveis diastólicos de Ca^{2+} e associada a esta condição ocorre a falência do músculo

durante o ciclo de contração e relaxamento. Estes músculos apresentam redução da amplitude do Ca^{2+} transiente associada à diminuição da produção de força e redução da carga de Ca^{2+} do RS (Gwathmey *et al*., 1987; Lehnart *et al*., 2009). Ademais, o Ca^{2+} possui um papel central na regulação da contratilidade, contudo, as alterações da regulação do Ca^{2+} no miócito estão envolvidas na disfunção mecânica e arritmogênese presentes na IC (Bers 2000).

Análises e inferências das proteínas envolvidas no transiente de Ca^{2+} são constantemente avaliadas nos ventrículos esquerdos de corações insuficientes sendo estas avaliações mais raramente estudadas nos ventrículos direito. Com isso, o presente estudo foi desenvolvido para avaliar a condição da câmara cardíaca direita frente à injúria sofrida pós-IM tendo como um dos focos principais a avaliação da função ventricular direita e sua associação com as alterações das principais proteínas envolvidas com o transporte do Ca^{2+}, tais como a SERCA-2a, a fosfolambam, a fosfolambam fosforilada e o trocado Na^{+}/Ca^{2+} em dois modelos de animais infartados: aqueles que desenvolveram a insuficiência cardíaca e aqueles que não desenvolveram a IC.

1.4. O Modelo Utilizado para o Estudo do Infarto do Miocárdio e Insuficiência Cardíaca

O modelo de insuficiência cardíaca em ratos após infarto do miocárdio induzido pela ligadura da artéria coronária simula a causa mais comum de IC em humanos. Além disso, permite uma precisão na avaliação do tempo de curso dos eventos, das modificações neurohumorais sistêmicas e da função ventricular com a progressão da IC (Francis *et al*., 2001).

Para se produzir e estudar o infarto do miocárdio, ratos têm sido utilizados quase que exclusivamente por apresentarem uma série de vantagens, entre elas ser de fácil manuseio, mais econômicos, ter pequenos corações e cumprir as etapas de evolução do IM rapidamente o que diminui o tempo de observação do estudo. Este modelo experimental, descrito a partir da década de 40, tem provido informações no que concerne à morfologia, bioquímica, eletrofisiologia e propriedades mecânicas do infarto do miocárdio, além das mudanças hemodinâmicas que ocorrem subsequentemente à

oclusão da coronária bastante semelhantes às dos humanos (Fishbein *et al*., 1978; Zornoff *et al*., 2008).

A ligação da artéria coronária esquerda no rato resulta na reprodução da seqüência de mudanças no miocárdio após o infarto, mudanças estas muito similares em humanos, que, portanto, se desenvolvem mais rapidamente. Tal rapidez na evolução pode estar relacionada ao pequeno tamanho corporal do rato e também à alta taxa de metabolismo neste roedor (Fishbein *et al*., 1978).

Já é bem estabelecido na literatura que o IM leva a complexas alterações na arquitetura ventricular envolvendo áreas infartadas e não infartadas. Estas alterações são frequentemente referidas como remodelamento ventricular que por sua vez, afetam a função ventricular e o prognóstico do infarto (Pfeffer & Braunwald, 1990).

Neste modelo, a hipertrofia do ventrículo esquerdo é um evento precoce podendo ser detectada já no terceiro dia após o procedimento cirúrgico. Já por volta da terceira a quarta semanas o grau de hipertrofia aumenta entre 30 e 60%. Semelhante ao ventrículo esquerdo, a hipertrofia do ventrículo direito pode ser vista já ao terceiro dia e atinge o percentual de 30% ao final de um mês (Zornoff *et al*., 2008).

A partir deste modelo experimental, estudos prévios, realizados em nosso laboratório por Pereira *et al*. (2005) mostraram a subdivisão dos ratos infartados, com similares áreas de cicatriz, naqueles com sinais de insuficiência cardíaca e sem sinais de insuficiência cardíaca 4 semanas após sofrerem o IM. Os ratos sem sinais de IC pós-IM mantiveram preservadas as funções cardíacas, enquanto aqueles que apresentaram sinais de IC tiveram estas funções prejudicadas. Posterior a esta subdivisão, os mesmos autores demonstraram que esses dois modelos apresentaram diferentes mecanismos envolvendo o controle do tônus vascular. Brevemente, os resultados destes autores consistem em que ratos com IC apresentaram hiporreatividade à fenilefrina, aumento da liberação de óxido nítrico basal e relaxamento normal dependente do endotélio. Nos ratos infartados sem sinais de IC houve prejuízo do relaxamento dependente do endotélio, um aumento da resposta à fenilefrina e liberação normal de óxido nítrico basal.

Outro grupo de pesquisadores utilizando o modelo experimental em questão também classificou os animais em infartados com sinais de IC e

infartados sem sinais de IC. Para isso, estes estudiosos pesaram o pulmão e corrigiram pelo peso corporal obtendo-se a razão peso do pulmão e peso corporal representada por LW/BW e os ratos com sinais de IC apresentaram a LW/BW ≥ LW/BW $_{sham}$ + 2 SD (desvio padrão), o que sugere aumento do volume de fluido na vasculatura pulmonar. Ademais, este estudo mostrou que associado ao aumento do peso pulmonar os ratos insuficientes eram letárgicos, dispnéicos e tinham um edema de pata. Por outro lado, ratos sem o aumento do peso pulmonar não apresentaram qualquer destes sinais. Um fato relevante deste estudo foi que os grupos infartados com ou sem sinais de IC apresentaram mesma área de cicatriz (Davidoff *et al*., 2004).

Pelo exposto, é possível verificar que a partir do modelo experimental de infarto, em ratos, tem-se criado novas possibilidades de estudo, uma vez que são gerados dois grandes grupos de animais, aqueles com sinais de insuficiência cardíaca, como já bem consolidado na literatura e aqueles sem sinais de insuficiência cardíaca.

A proposta de estudar animais infartados sem a instalação da insuficiência cardíaca e com áreas de infarto similares àqueles que apresentam os sinais da doença consiste na análise dos mecanismos que se encontram preservados para a manutenção da função da bomba cardíaca o que poderá implicar em medidas terapêuticas futuras para a prevenção do desenvolvimento da doença logo após o episódio do infarto.

Frente à hipótese de que há diferenças no desempenho ventricular das subdivisões do modelo experimental do infarto do miocárdio, este estudo comparou o funcionamento dos ventrículos direito dos ratos infartados com e sem IC e mesma área de infarto na fase aguda (após uma semana da cirurgia) e na fase crônica (oito semanas da cirurgia) ao infarto. As comparações foram realizadas através da avaliação funcional e molecular. Esta última consistiu na medida das expressões das principais proteínas envolvidas no transiente de cálcio, como a SERCA-2a, a fosfolambam e fosfolambam fosforilada e o trocador Na^{+}/Ca^{2+}.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a contratilidade do ventrículo direito em ratos nas fases inicial (1 semana) e tardia (8 semanas) após infarto agudo do miocárdio, em animais que apresentem ou não sinais de insuficiência cardíaca com mesma área de cicatriz.

2.2. Objetivos Específicos

Os animais serão avaliados 1 e 8 semanas após cirurgia para medir:

1. As pressões arterial e intraventriculares e a freqüência cardíaca;
2. A área de cicatriz do infarto pelos métodos histológico e planimétrico;
3. A contratilidade de tiras de ventrículo direito “in vitro” usando a técnica de contração isométrica.
4. As expressões protéicas da SERCA-2a, da Fosfolambam, da Fosfolambam fosforilada e do Trocador Na^{+}/Ca^{2+} dos grupos infartados com e sem insuficiência cardíaca no ventrículo direito.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais experimentais e Indução do Infarto do Miocárdio

Para realização deste estudo, foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando entre 200 e 230 gramas, cedidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciência Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo.

Para o procedimento de indução do infarto do miocárdio os animais foram anestesiados com mistura de Cetamina (50 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg) intramuscular. Em seguida foi realizada a tricotomia do hemitórax esquerdo e posteriormente a toracotomia deste mesmo lado entre o terceiro e quarto espaço intercostal, onde o coração causava impacto à palpação. Os músculos peitoral e intercostais foram divulsionados, as costelas separadas e o coração gentilmente exteriorizado por compressão lateral do tórax para visualização da artéria coronária descendente anterior esquerda. Em seguida, a artéria foi ligada, entre a borda do átrio esquerdo e o sulco da artéria pulmonar, a aproximadamente 3 milimetros distalmente à sua origem, através do uso de fio mononylon 6,0 (figura 1). Após o coração ter sido colocado no lugar e o tórax fechado, através de uma ligadura em bolsa previamente preparada, os animais retomavam a respiração normal. O procedimento cirúrgico do infarto, após abertura do tórax durava no máximo 30 segundos (Selye *et al*. 1960 modificado por Mill *et al*., 1990). Através de tal procedimento visamos obter infartos transmurais, nos quais a necrose miocárdia envolve a espessura total da parede livre do ventrículo esquerdo, sem comprometimento do septo interventricular (Pfeffer *et al*., 1979). Após a cirurgia, os animais foram observados e ao acordar foram mantidos em gaiolas passando por ciclos claro-escuro com acesso livre a água e ração balanceada. A mortalidade dos animais nos primeiros 30 minutos foi de aproximadamente 40%. Durante as 24 horas do procedimento a mortalidade variou entre 10 a 30% daqueles que sobreviveram após os 30 minutos iniciais. O grupo controle (Sham) foi submetido ao mesmo procedimento cirúrgico, exceto pela ligação da artéria

coronariana. Este protocolo foi aprovado pelo CEP número 005/2007 pelo Comitê de Ética no Uso de Animas-EMESCAM.

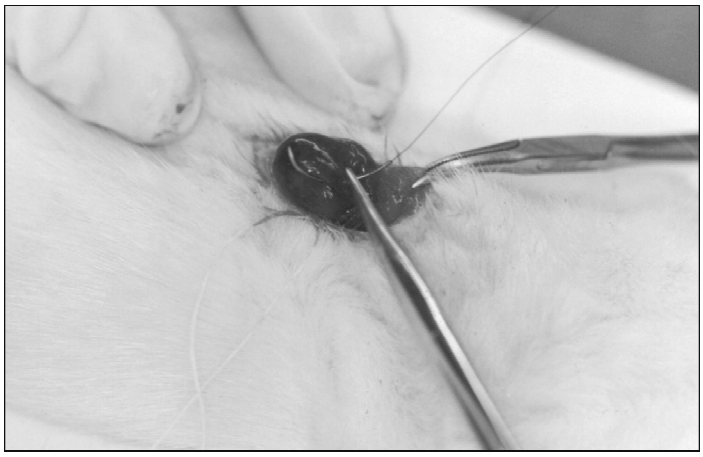

Figura 1: Procedimento para **i**ndução do infarto do miocárdio. Oclusão da artéria coronária descendente anterior esquerda. A artéria é ligada, entre a borda do átrio esquerdo e o sulco da artéria pulmonar a aproximadamente 3 milimetros distalmente à sua origem, através do uso de fio mononylon 6,0.

3.2. Medidas hemodinâmicas e Avaliação Ponderal

Os estudos hemodinâmicos foram realizados após uma e oito semanas da indução do IM ou cirurgia fictícia (Sham). Para isso, os animais foram mantidos sob plano anestésico com uretana (1,2 g/kg *i.p*.). A artéria carótida direita foi canulada com cateter de polietileno (PE-50) e este conectado a um transdutor de pressão TSD 104 A ligado ao sistema de aquisição de dados (MP100 Byopac Systems, Inc; CA). As medidas de pressão arterial média (PAM em mmHg), pressão arterial sistólica (PAS em mmHg), pressão arterial diastólica (PAD em mmHg), freqüência cardíaca (em batimento por minuto) e as derivadas de pressão positiva e negativa (dP/dt± em mmHg/s) foram realizadas. Em seguida o cateter foi introduzido no interior do VE para medida da pressão diastólica final (PDfVE em mmHg) e pressão sistólica no VE (PSVE em mmHg).

Após avaliação dos parâmetros hemodinâmicos os animais foram sacrificados através de deslocamento cervical. Em seguida o tórax foi aberto para a exposição e remoção do coração e pulmões. Os pulmões foram reservados e o coração foi colocado em solução nutridora. Sob perfusão contínua com a solução, através do coto da aorta, foi realizada a dissecação de uma tira do ventrículo direito. Posterior à dissecação, as câmaras ventriculares foram separadas e pesadas para avaliação indireta do índice de hipertrofia. O peso da tira do ventrículo direito foi adicionado ao peso da câmara. Os pesos úmidos dos ventrículos direito e esquerdo foram corrigidos pelo peso corporal do animal.

Para a avaliação da instalação da congestão pulmonar presente na IC, os pulmões foram dissecados e pesados. O peso úmido foi corrigido pelo peso corporal obtendo-se a razão peso do pulmão e peso corporal (PP/PC).

3.2.1. Separação dos Grupos Experimentais:

Após a avaliação hemodinâmica e as avaliações ponderais, os animais foram separados dentro de 3 grupos: grupo Sham, que sofreu cirurgia fictícia, grupo infarto sem insuficiência cardíaca e grupo com IC.

O critério obedecido para que os animais infartados fossem considerados como insuficientes foi a PDfVE ≥ a 15 mmHg. Os outros critérios foram considerados sinalizadores da IC como o aumento de + 2 desvios padrões da razão peso do pulmão e peso corporal em relação ao grupo Sham ($PP/PC_{IC} \geq PP/PC_{sham}$ + 2 DS) e a presença de hipertrofia do VD calculada pelo aumento da razão peso do VD e peso corporal ≥ a 0,8 mg/g (Anversa *et al*., 1985; Francis *et al*., 2001; Daviddof *et al*., 2004; Pereira *et al*., 2005). Aproximadamente quarenta por cento de todos os animais infartados apresentaram pelo menos dois sinais de IC a uma semana e os três sinais de IC a oito semanas após IM.

3.3. Avaliação da Área de Infarto do Miocárdio

A quantificação da área de infarto foi realizada através de dois diferentes métodos. O primeiro método utilizado foi a medida da área de infarto por

planimetria. Nesta técnica a visualização do tecido infartado foi realizada por transluminação em que o ventrículo esquerdo era posicionado contra a luz a fim de se diferenciar o tecido infartado do tecido remanescente. Esta distinção é possível pela área de cicatriz se apresentar fina e fibrosa, podendo ser facilmente diferenciada do tecido remanescente, mesmo uma semana após IM. Após a visualização, o tecido remanescente foi minuciosamente separado da área de cicatriz. As duas fatias foram posicionadas sobre papel milimetrado e contornadas. As medidas foram realizadas por contagem dos pontos com a área calculada em mm^2. A soma das áreas do ventrículo esquerdo remanescente e a cicatriz corresponderam a área total e a área de cicatriz foi calculada pela porcentagem da área total (Mill *et al*., 1990) (Figura 2).

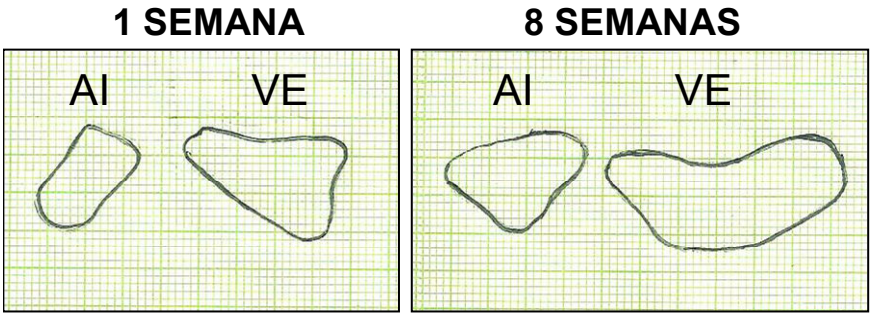

Figura 2: Medida em papel milimetrado das fatias da área infartada (AI) e da área remanescente ao infarto no ventrículo esquerdo (VE). As bordas das fatias são contornadas e medidas por contagem de pontos com área calculada em mm^2. A área total representa a soma das áreas do ventrículo esquerdo remanescente e cicatriz e área de cicatriz foi calculada pela porcentagem da área total

.

O segundo método foi a quantificação da área de infarto por histologia. Esta segunda análise foi realizada para avaliar se a semelhança das áreas de cicatriz entre os grupos sofrera influência da técnica empregada. Deste modo, realizamos a segunda medida apenas nos infartos de oito semanas.

Para análise histológica, o ventrículo esquerdo foi cortado em 3 secções transversas: ápice, anel mediano (aproximadamente 3 mm) e base. O anel

mediano foi conservado em formalina 4% e depois incluido em parafina. Para tal os seguintes passos foram seguidos:

a) etanol 70% por 30 minutos

b) etanol 80% por 30 minutos

c) etanol 100% por 30 minutos

d) xilol+etanol (1:1) por 30 minutos

e) xilol por 30 minutos

f) xilol +parafina (1:1) por 30 minutos

g) parafina à 60oC por 60 minutos

h) parafina à 60oC rapidamente

i) inclusão em parafina à 60oC em formas e secagem

Foi então feita a secagem por no mínimo 24 horas destes blocos de parafina e deste anel foram realizados cortes de 5 micrômetros sendo feitos a intervalos de 100 micrômetros. Procedeu-se então à coloração com *picrosirius red*, o qual promove uma coloração avermelhada na área cicatricial necrótica e amarelada no tecido não infartado. As imagens foram gravadas utilizando-se um scanner e analisadas através do programa Image J. O cálculo da porcentagem de infarto foi realizado pela divisão do perímetro da cicatriz na superfície endocárdica (CEN) pelo perímetro endocárdico total (PEN) mais o perímetro da cicatriz epicárdica (CEP) dividido pelo perímetro epicárdico total (PEP) (figura 3) dividido por 2 e multiplicado por 100 ([CEN/PEN + CEP/PEP]/ 2 x 100). O tamanho do infarto dos grupos (porcentagem do ventrículo esquerdo infartado) foi calculado pela média de todos os cortes avaliados e expressado como porcentagem da extensão (Pfeffer *et al*., 1985).

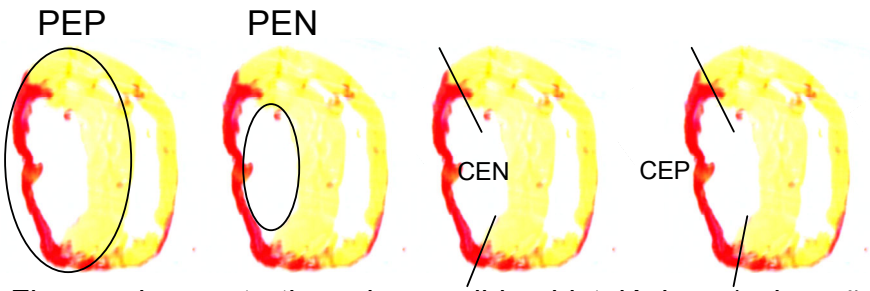

Figura 3: Figura demonstrativa da medida histológica (coloração com *picrosirius red*) da área de infarto em que PEP é o perímetro epicárdico total,

PEN é o perímetro endocárdico total, CEN é o perímetro da cicatriz na superfície endocárdica e CEP é o perímetro da cicatriz epicárdica.

3.4. Avaliação da Contratilidade do Ventrículo Direito

O estudo da contratilidade foi realizado em tiras de ventrículo direito contraindo isometricamente. Para isto, ao fim da avaliação hemodinâmica os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, o tórax foi aberto, o coração cuidadosamente removido e colocado em solução nutridora de Krebs previamente oxigenada com mistura carbogênica. O coto da aorta foi continuamente perfundido com a solução de Krebs modificada contendo NaCl 120 mM, KCl 5,4 mM, $CaCl_2$ 1,25 mM, $MgCl_2$ 1,2 mM, NaH_2PO_4 2 mM, Na_2SO_4 1,2 mM, $NaHCO_3$ 27 mM e glicose 11 mM. A solução foi gaseificada com mistura carbogênica contendo 5% de CO_2 e 95% de O_2, a uma temperatura de 30° C. Em uma plataforma de parafina, o ventrículo direito foi separado do ventrículo esquerdo . Uma tira do VD foi retirada no sentido longitudinal com cerca de 0,2 cm de largura e 0,8 cm de comprimento e suas extremidades foram presas a anéis de aço inoxidável. Em seguida, as tiras foram suspensas verticalmente em uma câmara de vidro preenchida com 20 mL da solução nutridora de Krebs. As extremidades superiores foram conectadas pelo anel e um fio de aço a um transdutor de força isométrica e as extremidades inferiores foram fixadas pelo anel a um gancho fixo da cuba.

Os músculos foram estimulados por meio de eletrodos de prata posicionados paralelamente ao seu comprimento. Os estímulos tinham duração de 10 ms. A voltagem utilizada foi de 1,5 vezes o limiar para provocar a resposta mecânica do músculo (cerca de 8 mV) a uma freqüência de 0,5 Hz.

A força desenvolvida foi medida através do transdutor de força isométrica modelo TSD 125 (Byopac Systems, Inc; CA) acoplado a um amplificador modelo DA 100C (Byopac Systems, Inc; CA) e registrados em sistema de aquisição de dados dotado de software AcqKnowledge (MP100 Byopac Systems, Inc; CA).

As preparações passaram por um período de 15 minutos de estabilização e em seguida, os músculos foram estirados gradualmente a um

comprimento diastólico ideal para atingir o máximo de tensão desenvolvida em que foi determinado o $L_{máx}$. Após o $L_{máx}$ ser alcançado, as preparações passaram por outro período de estabilização com duração de 40 minutos.

Seguido o período de estabilização, as seguintes manobras experimentais foram realizadas:

3.4.1. Resposta contrátil após pausas de estímulo (Potenciação pós-pausa)

As contrações foram registradas após pausas de 15, 30, 60 e 120 segundos no estímulo elétrico (figura 4). A potenciação relativa, após cada pausa, foi obtida dividindo-se a amplitude da primeira contração após a pausa, pela amplitude da contração que precedeu a pausa. Para que a próxima pausa fosse realizada, a preparação passava novamente por um período de estabilização até que a força desenvolvida retornasse ao valor basal.

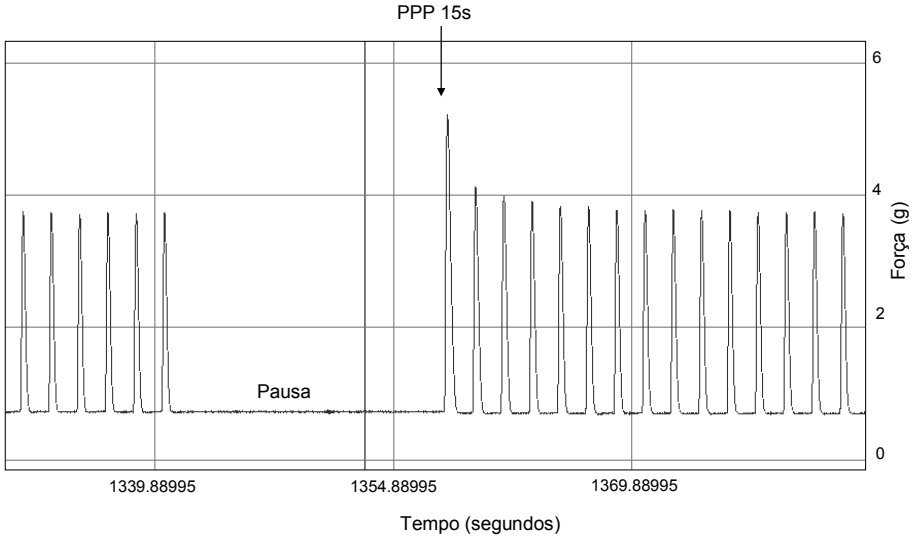

Figura 4: Potenciação pós-pausa. A primeira contração após pausa na estimulação elétrica é potencializada. O tempo foi registrado em segundos (s) e a força em gramas (g).

3.4.2. Resposta inotrópica ao cálcio

A curva concentração-resposta ao cálcio foi realizada utilizando concentrações extracelulares crescentes de cálcio (0,62, 1,25, 2,5 e 3,75 mM) para avaliar a variação de força (figura 5). No primeiro momento, a perfusão de Krebs (cálcio 1,25 mM) foi substituída por outra que continha a concentração

de cálcio de 0,62 mM, e novamente a preparação passava por um período de estabilização. As concentrações crescentes eram adicionadas após a força desenvolvida atingir um período de platô com força estável. A variação de força foi corrigida pelo peso dos músculos e expressa em g/mg (∆F/peso do músculo).

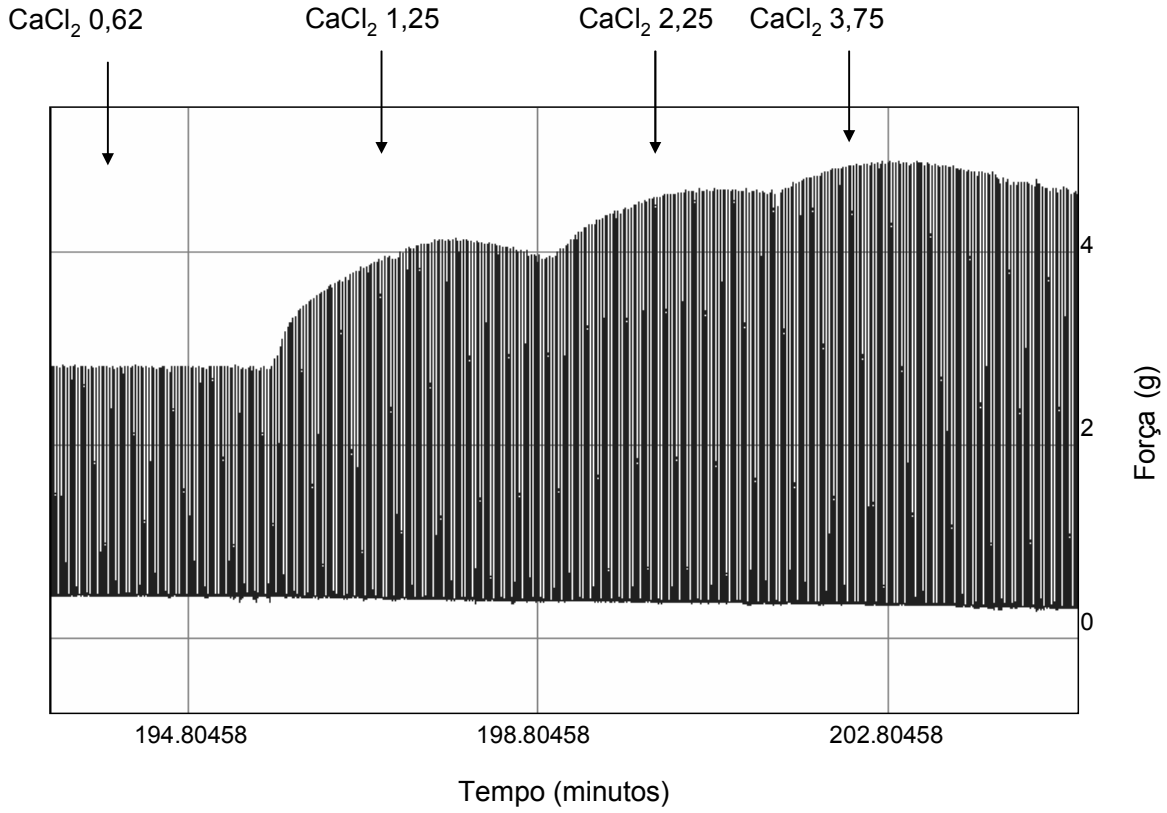

Figura 5: Curva de concentração-resposta ao cálcio realizada utilizando concentrações crescentes e cumulativas de Ca2+ (0,62, 1,25, 2,5 e 3,75 mM). O tempo foi registrado em minutos e a força em gramas (g).

3.4.3. Resposta inotrópica ao agonista β-adrenérgico

Para se avaliar a resposta contrátil a um agonista β-adrenérgico não seletivo, isoproterenol, a preparação foi perfundida com solução de Krebs contendo concentração de cálcio 0,62 mM. Após estabilização funcional da preparação, foram adicionadas ao banho, doses crescentes de isoproterenol. A curva concentração-resposta foi realizada com as concentrações de 10^{-9}, 10^{-8},

10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5} e 10^{-4} M (figura 6). A força desenvolvida foi corrigida pelos pesos dos músculos e expressas em g/mg (∆F/peso do músculo).

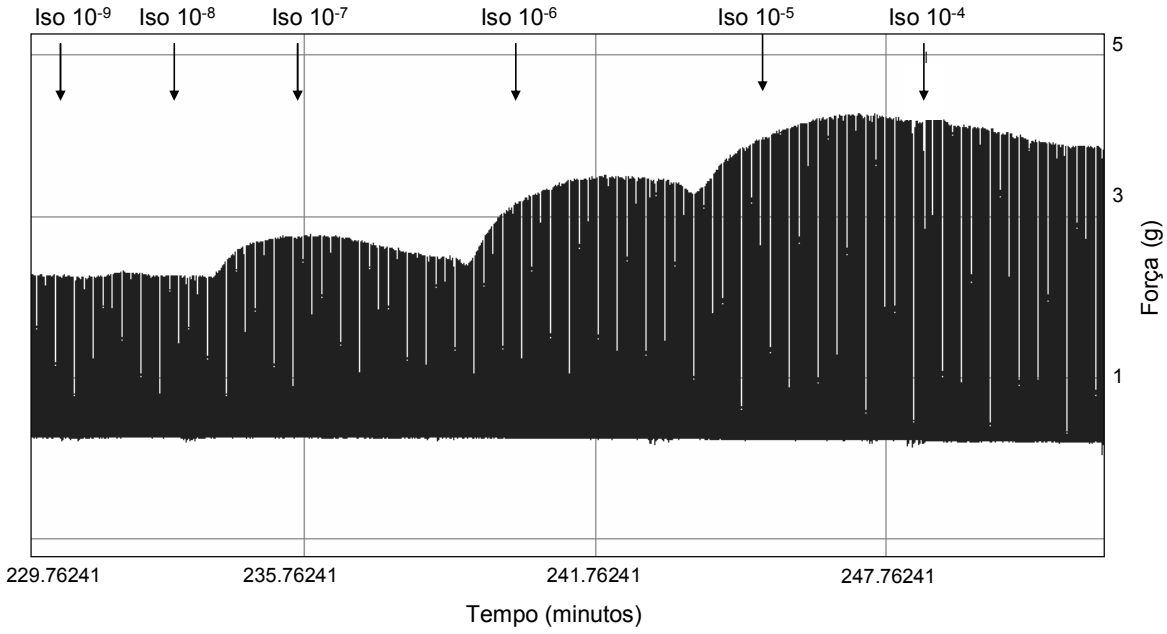

Figura 6: Curva de concentração-resposta ao isoproterenol. Concentrações crescentes e cumulativas de isoproterenol (10^{-9}, 10^{-8}, 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5} e 10^{-4} M) foram adicionadas a uma solução de Krebs contendo uma concentração de Ca^{2+} 0,62 mM. O tempo foi registrado em minutos e a força em gramas (g).

3.5. Avaliação da expressão das proteínas contráteis pelo método de Western Blot

Amostras de ventrículo direito foram coletadas dos grupos Sham, infarto e insuficiente 7 e 60 dias após a oclusão da coronária, para avaliação das seguintes proteínas envolvidas na cinética de Ca^{2+} através da técnica de Western Blot: SERCA-2a, Fosfolambam, Fosfolambam fosforilada na Serina-16 e Trocador Na^{+}/Ca^{2+}.

Estas amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas à -80^{o}C até o momento da extração protéica. A extração de proteínas foi procedida com a homogeneização dos corações, na temperatura de 4^{o}C, em tampão de homogeneização contendo: Tris-HCl 10 mM pH 7.4, EDTA 5 mM, SDS 1% p/v, NaF 10 mM, PMSF 1 mM, NaVO3 1mM, DTT 0.5 mM, coquetel inibidor de protease contendo AEBSF, Aproptin, Bestatin, E-64, Leupeptin na proporção de 1:100.

Após a homogeneização do tecido, esta mistura foi acondicionada em tubos eppendorfs e centrifugada a 10.000 *g* por 20 minutos a 4^{o}C. O sobrenadante foi separado e o "pellet" desprezado. Foi realizada uma diluição da amostra (1:200) para quantificação total da proteína pelo método de Bradford (Bradford, 1976), em seguida foram aliquotadas 100 µg de proteína e estas foram mantidas à -80^{o}C até o momento da realização do ensaio.

Quando realizado o Western Blot as amostras foram adicionadas de um tampão de carregamento (Laemmli 2X buffer) contendo Uréia 0,5 mM, SDS 0,17 mM, DTT 39 µM, Tris-HCl 0.01 M com pH 8.0 . As amostras foram então adicionadas deste tampão em uma proporção de 1:1 (Laemmli 2X buffer) e aquecidas à 95^{o}C por 4 minutos. Em seguida foram carregados os géis de SDS-poliacrilamida 7,5% (SERCA-2a e Trocador Na^{+}/Ca^{2+}) ou 15 % (Fosfolambam e Fosfolambam fosforilada) imersos em um tampão de eletroforese (Tris-HCl 25mM, glicina 190 mM, SDS 0.1 %) e submetidos a uma amperagem de 80 V por 2 horas

Após o término da eletroforese foi realizada a transferência elétrica das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose (Amersham, UK) em um tampão de transferência (Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20%e SDS 0.1 %) à temperatura ambiente usando 25 V em um Semi-dry (Bio-Rad).

Após a transferência das proteínas, as membranas foram bloqueadas por duas horas em uma solução bloqueadora de leite desnatado diluído a 5% em um tampão TBS – tween (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, tween 20 0.1 %, pH 7,5). Os anticorpos primários utilizados foram anti-mouse monoclonal para SERCA-2a (1:500; Affinity Bioreagents), anti-mouse monoclonal para Fosfolambam (2µg/ml; Affinity Bioreagents), anti-rabbit policlonal para Fosfolambam fosforilada (1:5000; Badrilla, Leeds, UK), anti-mouse monoclonal para Trocador Na^{+}/Ca^{2+} (1:200; Abcam Cambridge, MA, USA) e anti-mouse

monoclonal para GAPDH (1:5000; Abcam Cambridge MA, USA) diluídos em uma solução de BSA que por sua vez, foi diluído a 5% em um tampão TBS – tween (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, tween 20 0.1 %, pH 7,5). As membranas foram incubadas *overnight* a 4^{o}C.

Após o período de incubação com o anticorpo primário, as membranas eram lavadas por 30 minutos com uma solução TBS-T (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, tween 20 0.1 %, pH 7,5) para remoção dos anticorpos primários.

Depois de lavadas, as membranas foram incubadas com anti-mouse ou anti-rabbit (1:2500 ou 1:5000; StressGen, Victoria, Canadá)

Após a incubação com o anticorpo secundário, as membranas foram novamente lavadas por 30 minutos para remoção do anticorpo secundário com a solução TBS-T e por mais 30 minutos com a mesma solução sem tween 20.

As bandas foram detectadas utilizando um composto fluorescente (ECL plus, Amersham, UK) e expostas a um filme de raio-X (Hyper film, Amersham UK) o qual era revelado. As proteínas pesquisadas foram corrigidas pela quantidade de GAPDH detectado.

3.6 Análise estatística

Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). Na análise dos dados ponderais e dados hemodinâmicos foi usado ANOVA 1 via com teste *post hoc* de Tukey. Para comparação da área de infarto, foi usado o teste “t” de Student não pareado. Para avaliação da força de contração, dados temporais e a potenciação pós-pausa, foi usada ANOVA duas vias com *post hoc* de Bonferroni. Os valores de $p<0,05$ foram considerados como significativos. Para análise dos dados foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, USA).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Medidas hemodinâmicas e avaliação ponderal

Os animais que foram submetidos ao IM subdividiram-se em dois grupos, um que apresentou insuficiência cardíaca, denominado grupo IC e outro que não apresentou insuficiência cardíaca, denominado grupo Inf. A divisão dos grupos foi realizada através da medida da pressão diastólica final no VE e foram considerados insuficientes aqueles animais infartados com PDfVE maior ou igual a 15 mmHg (Anversa *et al*., 1985). Os resultados obtidos dos grupos foram comparados no tempo de uma e de oito semanas após IM.

A tabela 1 apresenta os valores hemodinâmicos dos grupos estudados: Sham, Inf e IC a uma e oito semanas após cirurgia da oclusão da coronária ou cirurgia fictícia.

A uma semana do infarto a média de PDfVE no grupo IC foi de 15 ± 1 mmHg, no entanto esta medida hemodinâmica não apresentou aumento nos dois outros grupos estudados, sendo sua média no Sham de 3,7 ± 0,6 mmHg e no Inf de 5,2 ± 0,8 mmHg, sem diferenças estatísticas entre estes dois últimos. As derivadas de pressão positiva e negativa não foram diferentes entre os grupos avaliados a uma semana do IM.

A média da PDfVE, oito semanas após IM, foi de 16 ± 2,5 mmHg no grupo IC, 7,5 ± 0,7 no grupo Inf e de 5,2 ± 0,5 mmHg no grupo Sham. Não houve diferença de PDfVE entre os grupos Sham e Inf, no entanto o grupo IC foi diferente dos outros ($p<0,05$). As derivadas de pressão positiva e negativa em função do tempo no VE (oito semanas pós-IM) foram menores no grupo IC em comparação ao grupo Sham e Inf ($p<0,05$) (tabela 1).

Na tabela 1 também estão descritas as médias das pressões avaliadas na aorta. Tais pressões não foram diferentes nos grupos nem uma nem oito semanas após o IM, bem como a média da freqüência cardíaca.

Tabela 1 – Dados hemodinâmicos dos grupos estudados a uma e oito semanas após IM

	1 semana após IM			8 semanas após IM		
Pressão Arterial (mmHg)	Sham (n= 15)	Inf (n= 9)	IC (n=9)	Sham (n=9)	Inf (n=9)	IC (n=9)
Sistólica	99 ± 3,6	103 ± 6	108 ± 4,7	106 ± 5,9	105 ± 3,5	111 ± 2,4
Diastólica	69 ± 5	75 ± 8	85 ±3	69 ± 5,5	70 ± 3,1	79 ± 1,4
Média	81 ± 5	80 ± 5	95 ± 4	84 ± 5,5	85 ± 3,3	93 ± 1,8
FC (bpm)	330 ± 21	365 ± 11	350 ± 17	291 ± 15	297 ± 17	312 ± 12
PDfVE (mmHg)	3,7 ± 0,6	5,2 ± 0,8	15 ± 1 * #	5,2 ± 0,5	7,5 ± 0,7	16 ± 2,5* #
dP/dt + (mmHg)	5727 ± 719	4606 ± 571	4245 ± 543	5103 ± 298	5120 ± 215	4098 ± 231*#
dP/dt – (mmHg	4697 ± 676	3577 ± 398	3651 ± 380	4683 ± 327	3971 ± 132	3184 ± 185*#

Os dados estão expressos como média ± E.P.M.. Para análise estatística foi utilizada ANOVA-1 via seguida de *post hoc* de Tukey. Os valores foram considerados significantes para $p < 0,05$. *$p < 0,05$ vs Sham; # $p < 0,05$ vs Inf.

Os dados ponderais dos grupos Sham, Inf e IC estão listados na tabela 2.

A uma semana do IM, a média do peso corporal foi menor no grupo IC em comparação ao Sham e Inf ($p < 0,05$). No entanto, esta diferença não se manteve a oito semanas e este dado ponderal foi similar entre os grupos.

O aumento da razão peso do ventrículo esquerdo e peso corporal (VE/PC) é uma medida indireta de hipertrofia do ventrículo esquerdo (Mill *et al*., 1990). A média da razão VE/PC foi maior no grupo Inf a 1 semana do IM em comparação ao grupo IC. Oito semanas pós IM, houve aumento desta razão no grupo IC, em relação ao Sham, o mesmo não foi observado com o grupo Inf em relação ao Sham (tabela 2).

O aumento da razão peso do VD e do peso corporal é um indicativo indireto de hipertrofia do VD (Anversa *et al*., 1985). Esta razão não foi diferente entre os grupos infartados na fase inicial do IM, portanto, foi cerca 220% maior no grupo IC em comparação ao grupo Sham e Inf ($p<0,05$) a oito semanas (tabela 2 e figura 8).

O aumento da razão PP/PC representa congestão do leito vascular pulmonar progressiva à IC (Francis *et al*., 2001). Na fase inicial do IM, não houve diferença desta razão entre os grupos. No entanto, na fase crônica, apenas o grupo IC apresentou um aumento da razão PP/PC comparado com os grupos Sham e Inf ($p<0,05$) (tabela 2, figura 9). A congestão pulmonar é um sinal de IC e para classificar os pulmões como congestos foi utilizado o critério de aumento da razão PP/PC + 2 desvios padrões em relação ao grupo controle (figura 9-b).

A média de peso da tira do VD não foi diferente entre os grupos na fase inicial ao IM; já a oito semanas, o grupo IC apresentou aumento desta média em comparação ao grupo Inf, mas o mesmo não foi diferente do Sham.

Tabela 2 – Dados ponderais dos grupos estudados uma e oito semanas após IM

	1 semana			8 semanas		
	Sham (n=15)	Inf (=9)	IC (n=9)	Sham (n=9)	Inf (n=9)	IC (n=9)
Pesos (g)						
Peso corporal	253 ± 5	235 ± 2	208 ± 6 *#	350 ± 10	381 ± 15	339 ± 25
VE	0,41 ± 0,01	0,42 ± 0,02	0,31 ± 0,01 *#	0,59 ± 0,02	0,736 ± 0,04*	0,718 ± 0,06
VD	0,14 ± 0,007	0,14 ± 0,007	0,14 ± 0,004	0,17 ± 0,01	0,209 ± 0,01	0,389 ± 0,03 *#
Razões (mg/g)						
VE/PC	1,76 ± 0,05	2,0 ± 0,15	1,51 ± 0,09 #	1,74 ± 0,06	1,89 ± 0,07	2,08 ± 0,14 *
VD/PC	0,62 ± 0,03	0,7 ± 0,04	0,67 ± 0,03	0,55 ± 0,04	0,59 ± 0,03	1,21 ± 0,1 * #
PP/PC	5,0 ± 0,2	6,2 ± 0,5	6,7 ± 1,0	4,95 ± 0,28	5,10 ± 0,49	7,59 ± 0,98 *#
Tira VD (mg)	15,5 ± 1,1	16,5 ± 1,4	15,2 ± 1,2	14 ± 1,06	17 ± 2,17	22 ± 2,91#

Média ± E.P.M dos pesos ventriculares esquerdo (VE) e direito (VD) e razões obtidas entre o peso do VE e o peso corporal (VE/PC), peso do VD e peso corporal (VD/PC) e o peso do pulmão e o peso corporal (PP/PC). A média ± E.P.M. dos pesos das tiras utilizadas nas preparações foi calculada em mg. Para análise estatística foi utilizada ANOVA 1-via seguida de *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$ vs Sham; # $p < 0,05$ vs Inf.

Os gráficos de barras abaixo (figuras 7, 8 e 9) representam os valores de PDfVE, razão peso do VD/PC e PP/PC.

A razão peso do pulmão e peso corporal (representada nos gráficos 9-a e 9-b) foi calculada a partir da média ± D.P. e foi maior apenas nos grupos insuficientes na fase crônica do IM.

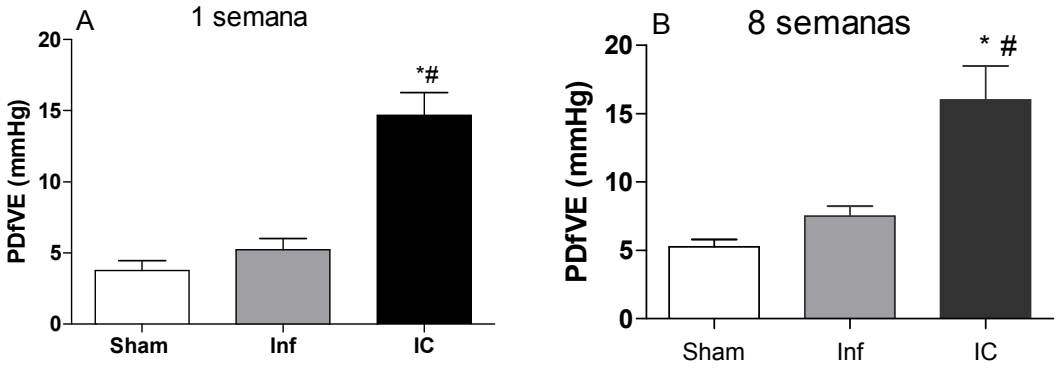

Figura 7- Média ± E.P.M. da pressão diastólica final no ventrículo esquerdos dos grupos estudados, uma e oito semanas após IM. A análise estatística utilizada foi ANOVA 1-via seguida de *post hoc* de Tukey. * p< 0,05 *vs* Sham e # p< 0,05 *vs* Inf.

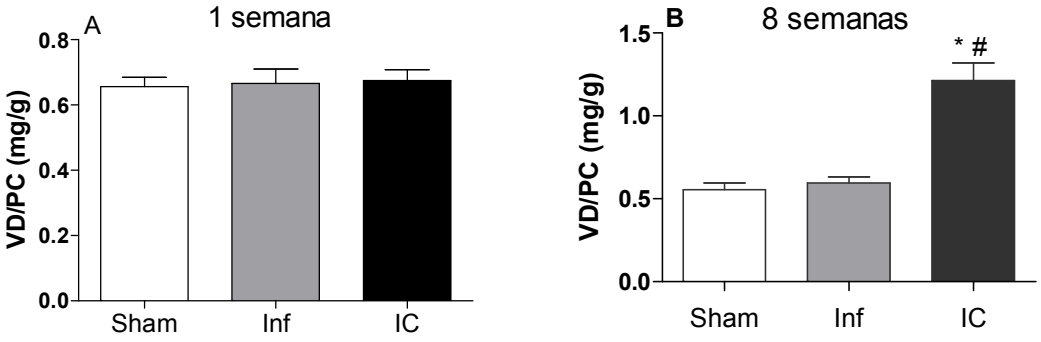

Figura 8- Média ± E.P.M. da razão peso do ventrículo direito e peso corporal dos grupos estudados na fase aguda (1 semana) e na fase crônica (8 semanas) após o IM. A análise estatística utilizada foi ANOVA 1-via seguida de *post hoc* de Tukey. * p< 0,05 *vs* Sham e # p< 0,05 *vs* Inf.

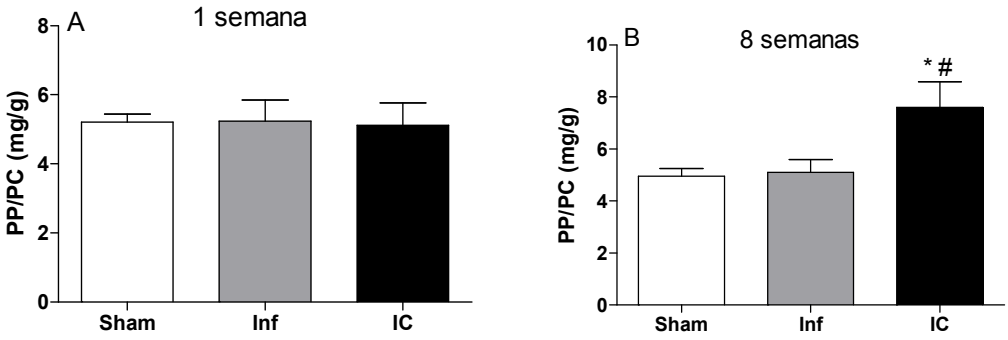

Figura 9- Média ± D.P. da razão peso do pulmão e peso corporal dos grupos estudados na fase aguda (1 semana) e na fase crônica (8 semanas) após o IM. A análise estatística utilizada foi ANOVA 1-via seguida de *post hoc* de Tukey. * p< 0,05 *vs* Sham e # p< 0,05 *vs* Inf.

4.1.1 Análise das Correlações entre a pressão diastólica final no VE e os dados ponderais

Foram construídas relações entre a PDfVE e os dados ponderais de peso corporal e das razões peso do VD e peso corporal, peso do pulmão e peso corporal. Os resultados da figura 10 (a e b) mostram as correlações entre a PDfVE e o peso corporal dos animais. Tais correlações foram significativamente negativas tanto a uma quanto a oitos semanas, indicando que o aumento da PDfVE correlaciona-se negativamente com a diminuição do peso corporal, muito embora, o peso corporal entre os grupos a oito semanas não apresentasse diferença estatisticamente significante.

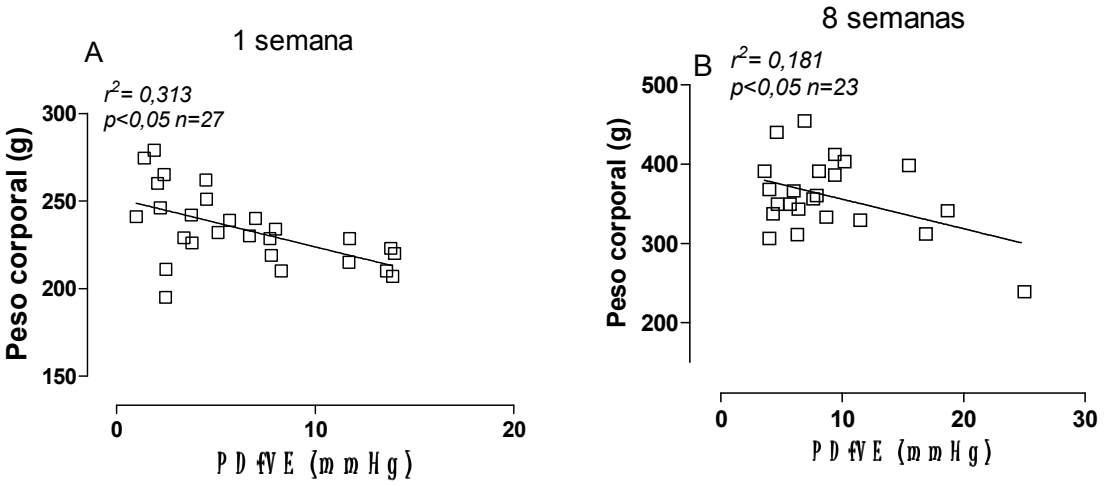

Figura 10 – Correlação entre a pressão diastólica final no ventrículo esquerdo (PDfVE) e o peso de todos os animais.

As correlações de PDfVE e razão peso do VD/PC estão representadas na figura 11 (a e b) e mostram que apenas a oito semanas o aumento da PDfVE se correlacionou com a hipertrofia do VD.

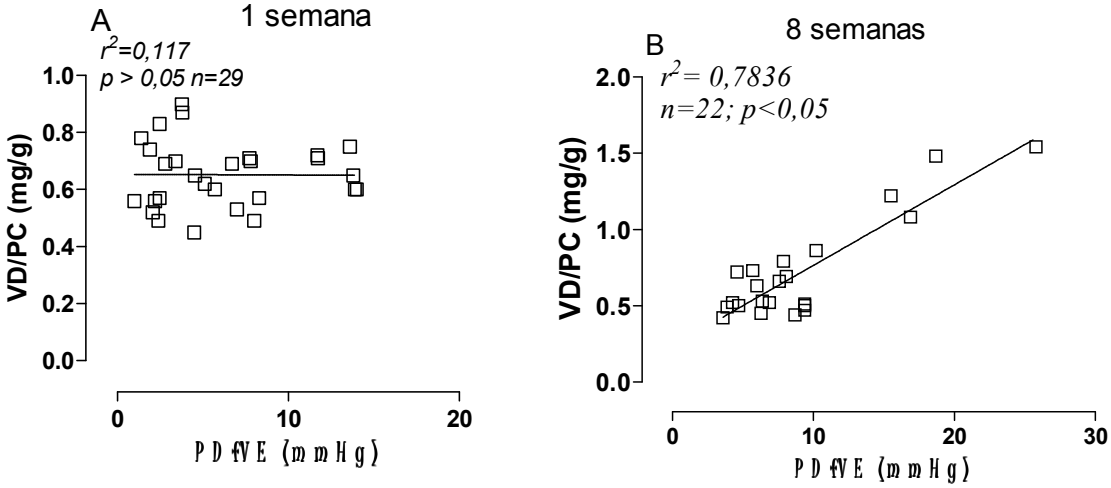

Figura 11- Correlação entre a pressão diastólica final no ventrículo esquerdo (PDfVE) e a razão peso do ventrículo direito e peso corporal (VD/PC) de todos os animais.

O aumento da razão peso do pulmão e peso corporal se correlacionou significativamente com o aumento da pressão diastólica final do VE (PDfVE) apenas após 8 semanas de IM. Na fase aguda do IM esta correlação não foi observada e este fato se deve a ausência de congestão pulmonar.

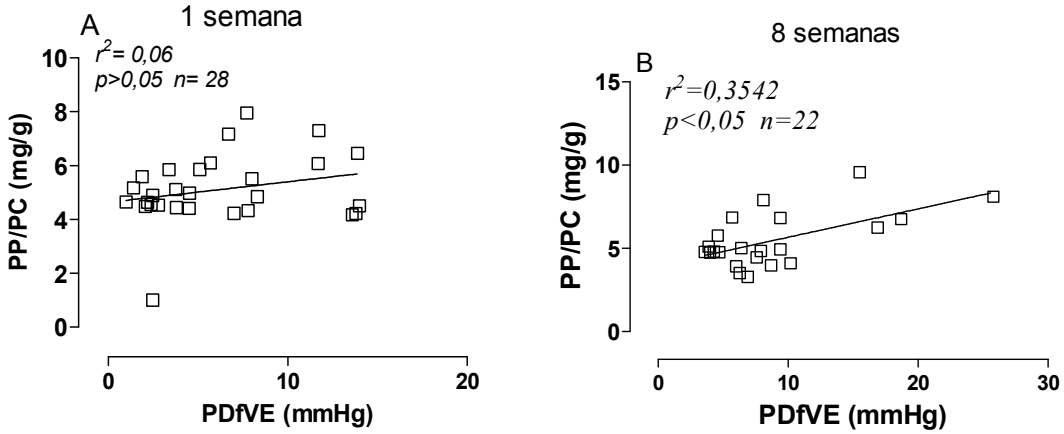

Figura 12 - Correlação entre a pressão diastólica final no ventrículo esquerdo (PDfVE) e a razão peso do pulmão e peso corporal (VD/PC) de todos os animais.

4.2. Medida da área de infarto

Este estudo mostra que os animais infartados com mesma área de cicatriz podem ou não desenvolver a IC.

A avaliação da área de IM realizada por planimetria mostrou que a média das áreas na fase aguda foram no grupo Inf de 32,4 ± 3% e no IC 33,7% ± 2% e na fase crônica foi de 26,5 ± 1,1% no grupo Inf e 25 ± 0,9% no grupo IC, portanto, não houve diferenças entre os grupos a uma, nem tão pouco a 8 semanas após a cirurgia (figura 13 a e b).

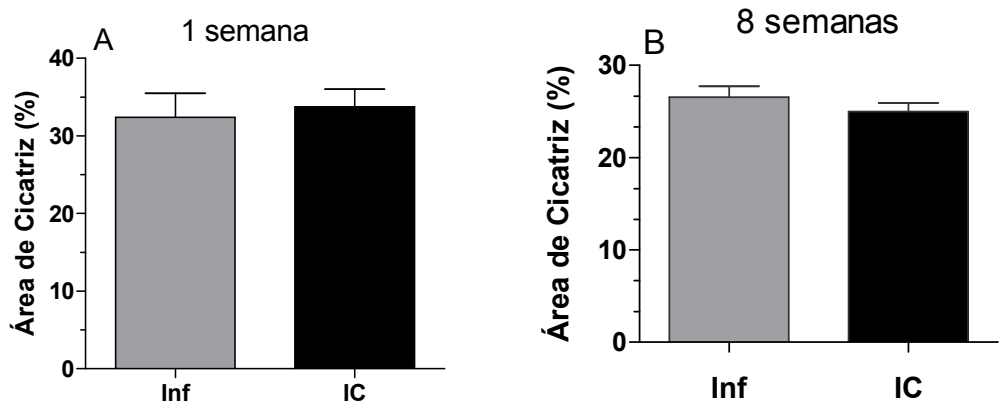

Figura 13 - Área de cicatriz de infarto medida por planimetria e calculada como média ± E.P.M. Para análise estatística foi utilizada teste *t* de Student não pareado.

O método histológico para medir o tamanho da cicatriz de IM foi realizado apenas nas oito semanas (figura 14). A utilização deste outro método serviu para avaliar a equivalência das técnicas utilizadas, a fim de comprovar que independente da técnica, os grupos infartados estudados apresentavam similares tamanhos de cicatriz. Os resultados são demonstrados na figura 14 e mostram que pelo procedimento histológico, as áreas não foram significativamente diferentes, no entanto com o emprego desta técnica a média das áreas de cicatriz em porcentagem foram maiores, obtendo-se os valores de média de 55,8 ± 4,1% e o grupo IC 56 ± 2,2% (p=0,8).

Embora haja diferenças nas médias das áreas de infarto dependendo da técnica utilizada, não houve diferenças nas áreas de cicatriz nos grupos Inf e IC. Estes resultados denotam a homogeneidade do tamanho da cicatriz de infarto entre os grupos, mostrando não ter sido este o fator determinante para a instalação da IC.

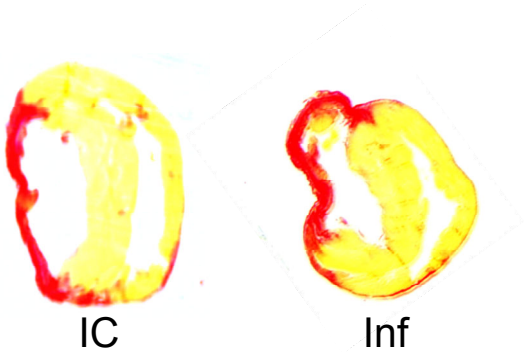

Figura 14- Lâminas de corações de animais, 8 semanas após infarto do miocárdio, coradas com *picrosirius red* (corte de 5 µm). À direita, área de cicatriz do animal infartado sem insuficiência (Inf) e à esquerda do animal infartado com insuficiência (IC).

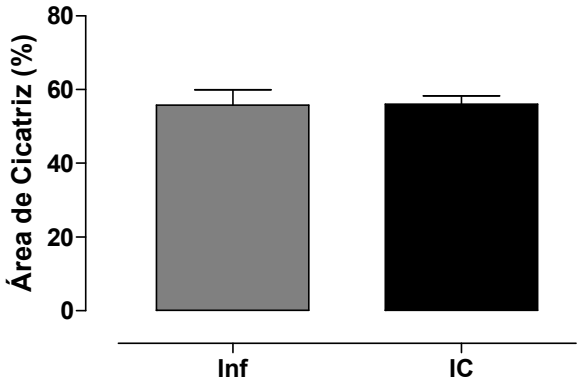

Figura 15 - Área de cicatriz oito semanas após cirurgia para indução do IM medida por histologia (coloração com *picrosirius red)* resultados estão expressos como média ± E.P.M. e para análise estatística foi empregado o teste *t* de Student não pareado.

4.3 Estudos *in vitro* da mecânica dos ventrículos

Os ventrículos direito dos grupos Sham, Inf e IC foram submetidos à avaliação da contratilidade *in vitro.* Para a realização deste estudo foram retiradas tiras longitudinais do VD cujas médias de pesos estão demonstrados na tabela 2.

4.3.1 Potenciação Pós Pausa

Após estabilização das preparações, os músculos foram submetidos às manobras experimentais. O primeiro protocolo utilizado para a avaliação da força contrátil foi a potenciação pós-pausa (PPP). A primeira contração após uma pausa na estimulação elétrica é potencializada em relação às contrações precedentes (Vassallo *et al*.,1995). A figura 16 representa a força relativa nos diferentes tempos de pausa das tiras do VD a uma e oito semanas após IM.

Após uma semana de infarto o grupo IC apresentou menor PPP relativa após 15 segundos de pausa em comparação ao grupo Inf. Nos demais tempos de pausa, não houve diferenças estatisticamente significante entre os grupos.

A oito semanas de IM, a PPP relativa não foi diferente entre os grupos estudados (figura 16).

Os dados de força desenvolvida foram calculadas a partir de porcentagem em que o primeiro tempo de pausa (15 s) foi considerado 100% de força e o incremento da força em resposta a última pausa foi calculado. Estes resultados estão demonstrados na figura 17 e mostram que não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos avaliados. Outra análise possível através destes resultados foi a ausência da PPP em tiras de VD nos três grupos avaliados tanto a uma quanto a oito semanas do IM. A média da força desenvolvida foi de 114,4 ± 2,9 no Sham, 107,2 ± 3,2 no Inf e 119 ± 9,2 no IC a uma semana e a oito semanas foi de 123 ± 5,8 no Sham, 110 ± 4,1 no Inf e 106,2 ± 3,6 no IC.

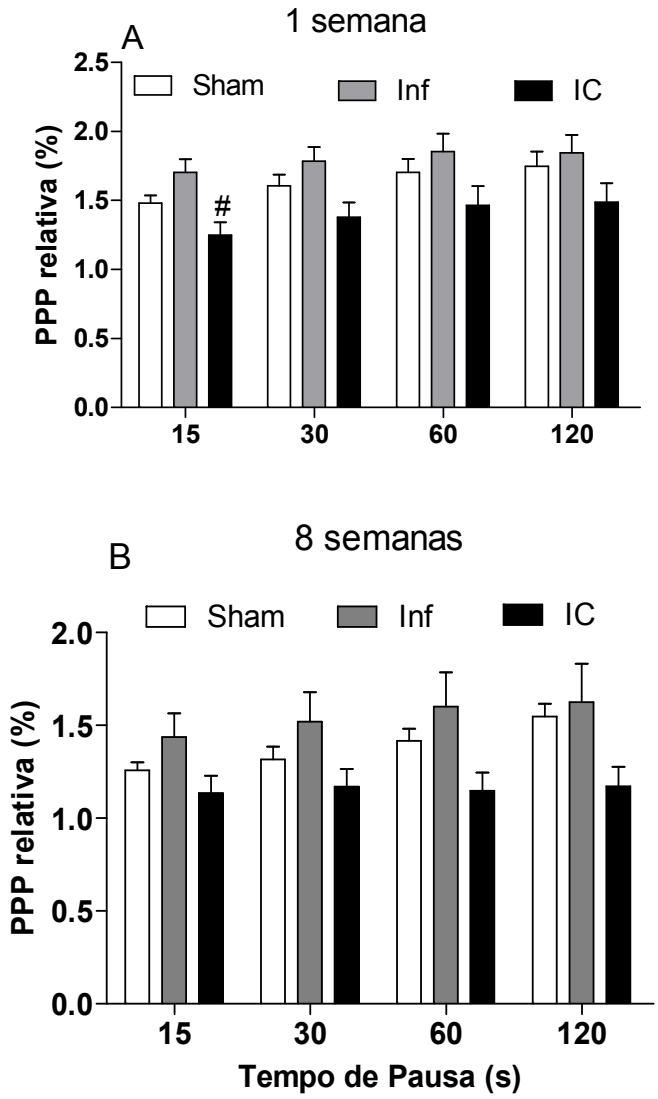

Figura 16 - Potenciação pós-pausa (PPP) em tiras de ventrículo direito dos grupos com freqüência de estimulação de 0,5 Hz e Ca^{2+} 1,25 mM. Dados representados como média ± EPM. Para análise estatística ANOVA duas vias e teste *post hoc* de Bonferroni. * p<0,05 *vs* Sham; # p<0,05 *vs* Inf.

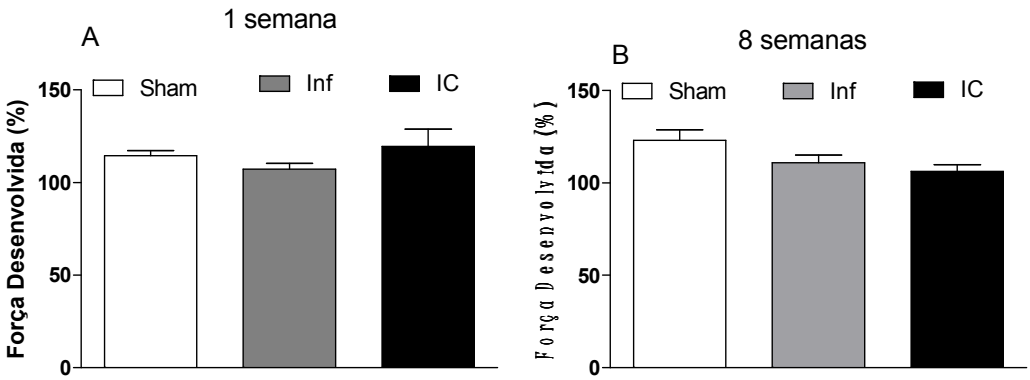

Figura 17 - Força desenvolvida calculada pela porcentagem de força na última pausa (120s) e na primeira pausa (15s). Dados representados como média ± EPM. Para análise estatística ANOVA uma via e teste *post hoc* de Tukey.

4.3.2 Curva concentração-resposta ao Cálcio

As concentrações extracelulares de $CaCl_2$ foram adicionadas ao banho das preparações de tiras de VD. A figura 18 a e b demonstra um aumento progressivo de força nas tiras de VD dos grupos estudados.

Na fase aguda (uma semana) do IM a resposta inotrópica ao cálcio foi menor no grupo Inf em comparação ao Sham nas concentrações de 2,5 e 3,75mM de $CaCl_2$. As médias de força na concentração de 2,5 mM de $CaCl_2$ foram de 186,4 ± 8,3 no Sham, 135,2 ± 11,7 no Inf e 158,8 ± 13,1 no IC. O grupo IC não apresentou diferenças estatisticamente significante dos grupos Inf e Sham em nenhum ponto da curva de Ca^{2+}.

A resposta inotrópica ao cálcio se manteve preservada no grupo Inf e prejudicada no grupo IC na fase crônica (oito semanas) ao IM e as médias de força na concentração de 2,5 mM de $CaCl_2$ foram de 157,2 ± 18,4 no Sham, 138,8 ± 17,3 no Inf e 62,5 ± 10,3 no IC.

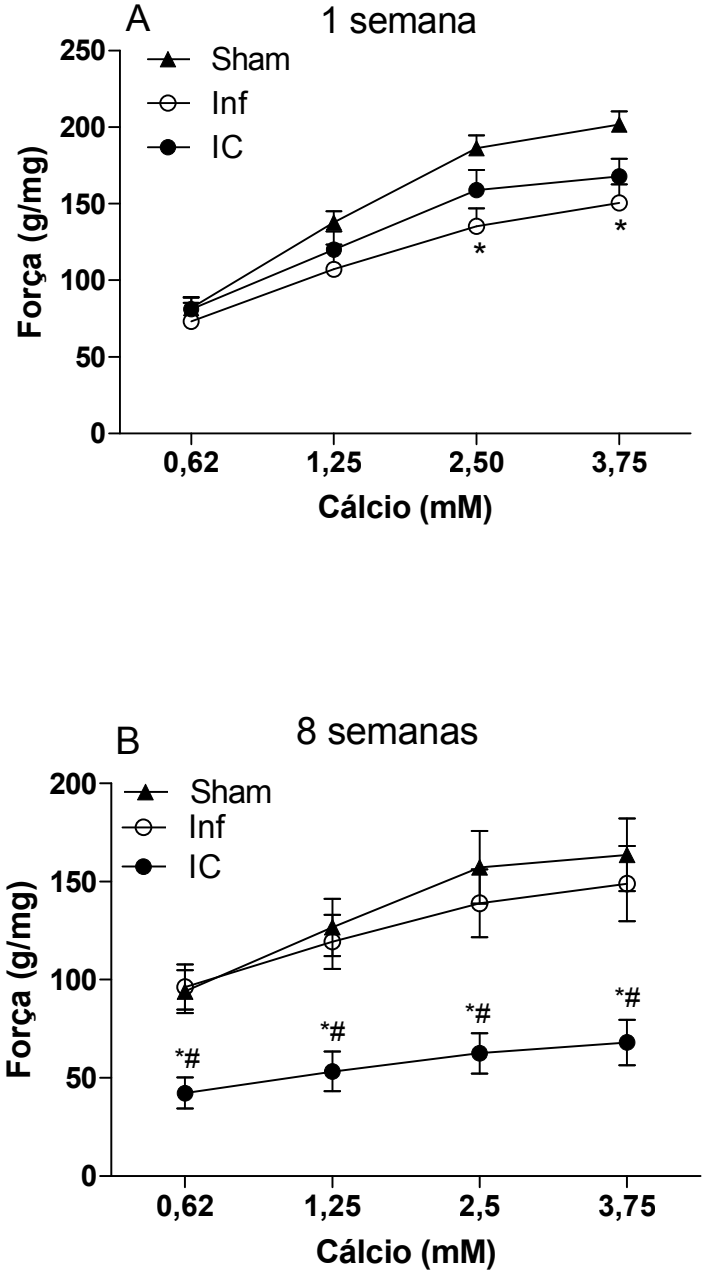

Figura 18: Resposta inotrópica (g/mg) a concentrações crescentes de $CaCl_2$ (0,62; 1,25; 2,5 e 3,75 mM) em tiras de ventrículo direito Os dados são expressos como média ± EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA duas vias e *post hoc* de Bonferroni. * p<0,05 *vs* Sham; #p< 0,05 *vs* Inf.

4.3.3. Curva concentração-resposta ao Isoproterenol

Para avaliar a resposta β-adrenérgica, foram utilizadas concentrações crescentes e cumulativas de Isoproterenol (10^{-9}, 10^{-8}, 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5} e 10^{-4} M) nos três grupos. A figura 19 a e b mostra os valores de força nas tiras de ventrículo direito.

Na fase aguda ao IM, o grupo Inf apresentou prejuízo da força em relação aos demais e o grupo IC mostrou uma resposta inotrópica positiva (em resposta ao agonista β-adrenérgico) semelhante ao controle. A média de força em resposta à 10^{-5} M de Isoproterenol foi de 145,1 ± 9,9 no Sham, 108,4 ± 10,8 no Inf e 166 ± 12 no IC.

Oito semanas após IM a resposta inotrópica estava prejudicada no grupo IC e preservada no grupo Inf. A média de força em resposta à 10^{-5} M de Isoproterenol foi de 149,4 ± 14 no Sham, 137,2 ± 18,7 no Inf e 58 ± 8,1 no IC.

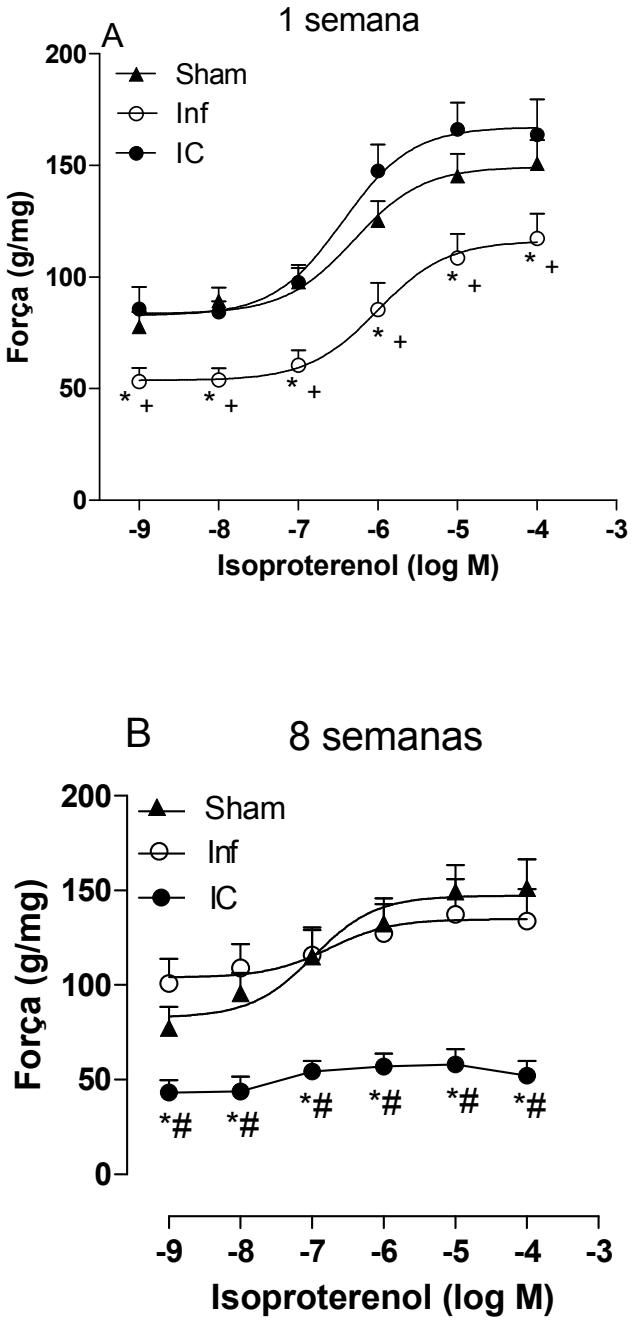

Figura 19 - Força em g/mg em tiras de ventrículo direito em resposta a concentrações crescentes de isoproterenol nos grupos a uma e oito semanas após IM. Dados são expressos como média ± EPM. Para análise estatística foi utilizada ANOVA duas vias com *post hoc* de Bonferroni. * p<0,05 *vs* Sham; # p<0,05 *vs* Inf; + p< 0,05 vs IC.

4.4. Avaliação das correlações da força com os indicadores de IC

As correlações entre a força na tiras dos ventrículos direito em resposta a 5.10^{-5}M de Isoproterenol e a PDfVE, a hipertrofia do VD (VD/PC) e a congestão pulmonar (PP/PC) foram avaliadas umas vez que estes são considerados sinalizadores de IC.

A figura 20-b demonstra a correlação negativa entre a força nas tiras de VD dos grupos estudados e a PDfVE na fase crônica do IM. Por outro lado, houve correlação positiva entre estas variáveis a uma semana do IM (figura 20-a).

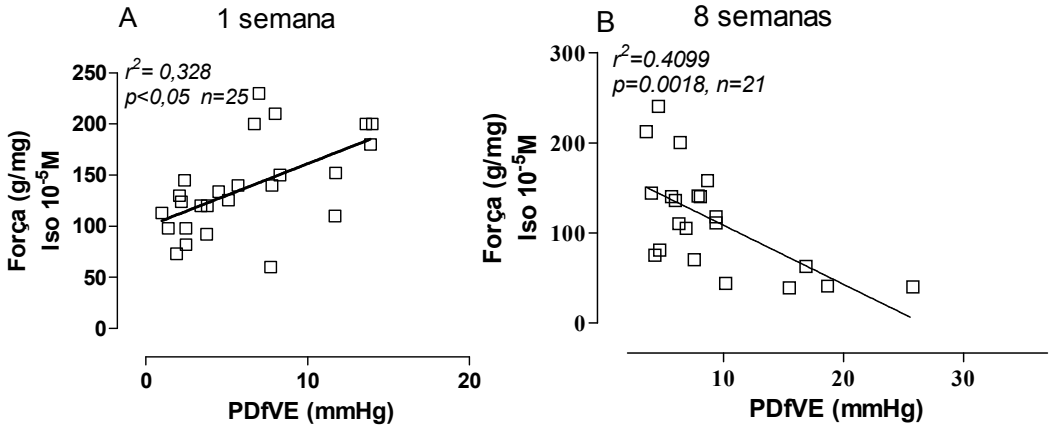

Figura 20 – Correlações entre a força desenvolvida em tiras isoladas de VD em resposta à concentração de 10^{-5} M de Isoproterenol e a pressão diastólica final no ventrículo esquerdo (PDfVE).

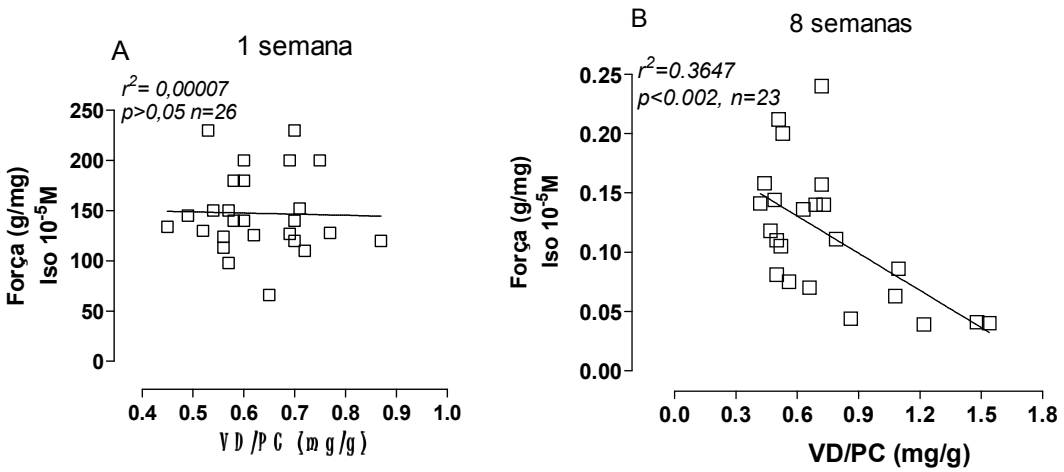

Figura 21 – Correlações entre a força em resposta à concentração de 10^{-5} M de Isoproterenol e a peso do ventrículo direito e peso corporal (VD/PC).

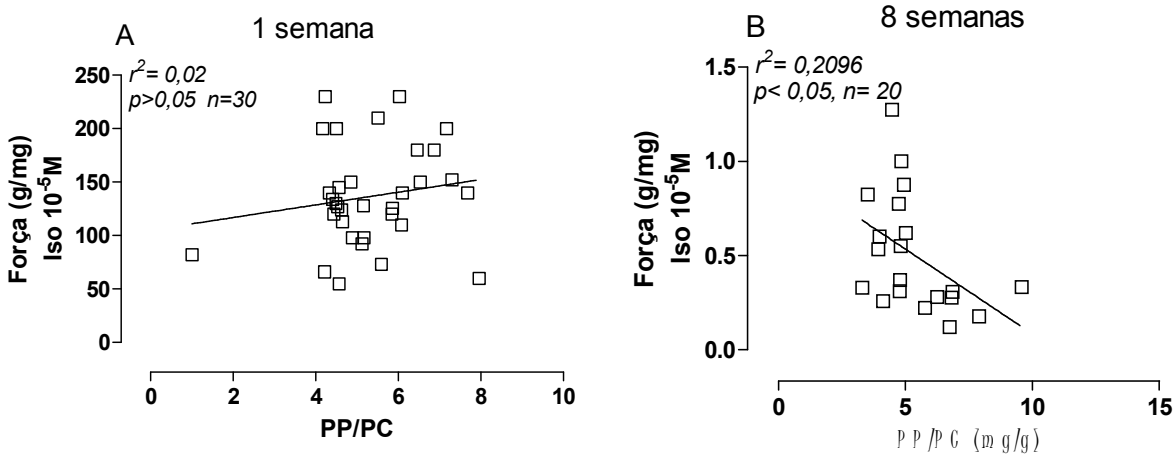

Figura 22- Correlações entre a força em resposta à concentração de 10^{-5}M de Isoproterenol e a razão peso do pulmão e peso corporal (PP/PC).

4.5 Avaliação das Proteínas Envolvidas no Transiente de Ca^{2+}

Os níveis protéicos da SERCA-2a, fosfolambam, fosfolambam fosforilada na serina 16 e trocador Na^{+}/Ca^{2+} foram avaliados nos grupos Sham,

Inf e IC. A análise do nível de expressão das proteínas foi realizada através da correção pelo GAPDH.

O conteúdo de SERCA-2a detectado nos ventrículos direitos dos grupos Sham, Inf e IC não foi diferente na fase aguda do IM (média do Sham=1,03± 0,11; Inf= 0,87 ± 0,08 e IC= 0,69 ± 0,13)(figura 23-a). A oito semanas do IM, o conteúdo da SERCA-2a no ventrículo direito foi maior no grupo Inf em comparação ao Sham e IC, com expressão protéica de 1,8±0,06 neste grupo, enquanto que o Sham apresentou 0,8±0,05 e o IC 0,8±0,1 ($p<0,05$), como mostrado na figura 23-b.

A figura 24 mostra os níveis de fosfolambam total nos ventrículos estudados. Na fase aguda, esta proteína foi numericamente semelhante entre os grupos infartados e Sham (média Sham=0,9 ± 0,09; Inf=0,9 ± 0,1; IC= 1 ± 0,08; $p > 0,05$). Já a oito semanas do IM, os níveis de fosfolambam total no ventrículo direito foram maiores no grupo Inf em comparação aos demais, sendo que o grupo Inf apresentou 1,4 ± 0,1, o Sham 1,0 ± 0,04 e o IC 1,0 ± 0,09 ($p<0,05$).

A razão da expressão SERCA-2a/fosfolambam é uma indicadora do fluxo normal de Ca^{2+} envolvido na contratilidade do miócito. Como pode ser avaliado na figura 25-a esta razão foi menor no grupo IC em comparação ao Sham e Inf na fase aguda ao IM (média Sham=1,2 ± 0,1; Inf=1± 0,1; IC=0,6 ± 0,1). Esta razão foi também calculada na fase crônica ao IM e mostrou-se numericamente maior no grupo Inf em relação aos demais grupos (média Sham= 0,8 ± 0,1; Inf= 1,3 ± 0,1; IC= 0,9 ± 0,09).

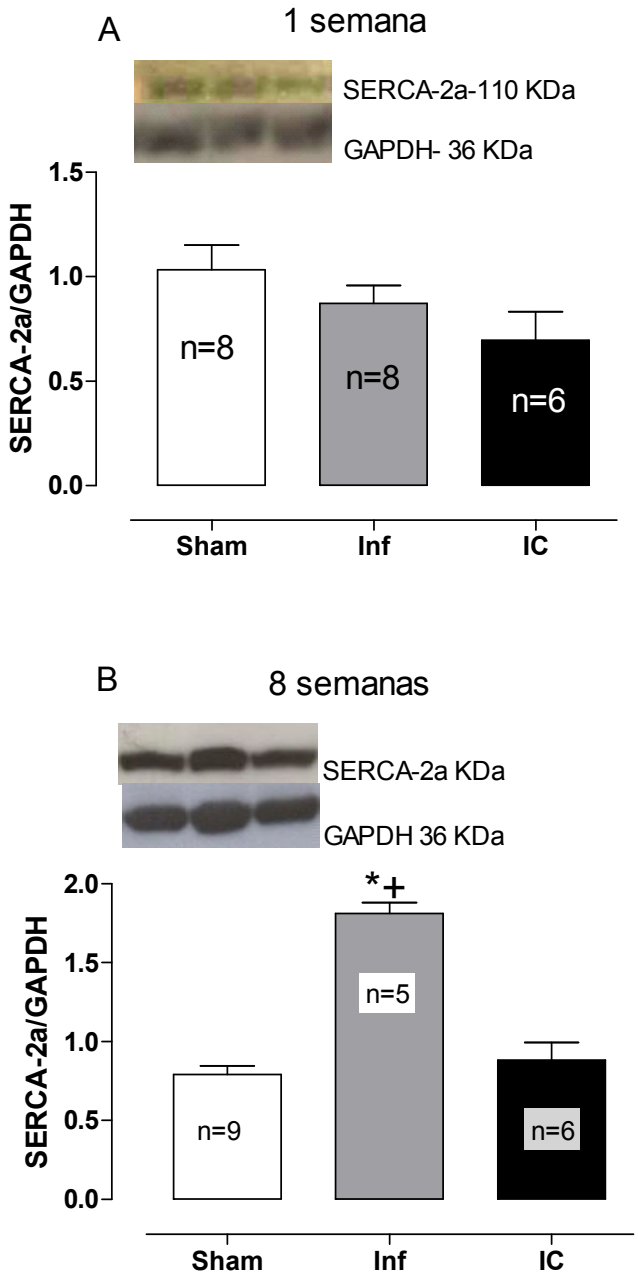

Figura 23: Expressão protéica da SERCA-2a em ventrículos direito dos grupos a uma semana (A) e oito semanas (B) após IM. Dados expressos como média ± EPM. A análise estatística foi realizada com ANOVA 1 via e *post hoc* de Tukey. *p<0,05 Inf *vs* Sham; + p<0,05 Inf *vs* IC.

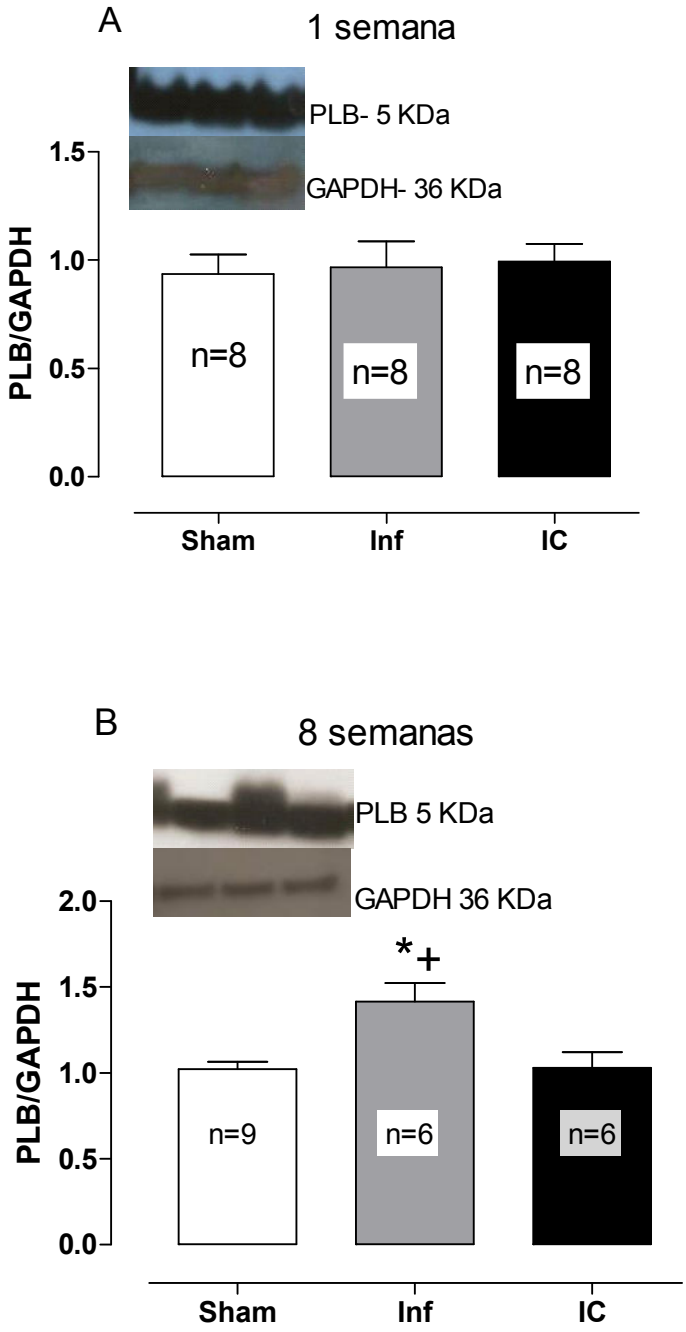

Figura 24: Expressão protéica da fosfolambam (PLB) em ventrículos direito uma semana (A) e oito semanas após cirurgia de oclusão da coronária. Dados expressos como média ± EPM. A análise estatística foi realizada com ANOVA 1 via e *post hoc* de Tukey. *p<0,05 Inf *vs* Sham; + p<0,05 Inf *vs* IC.

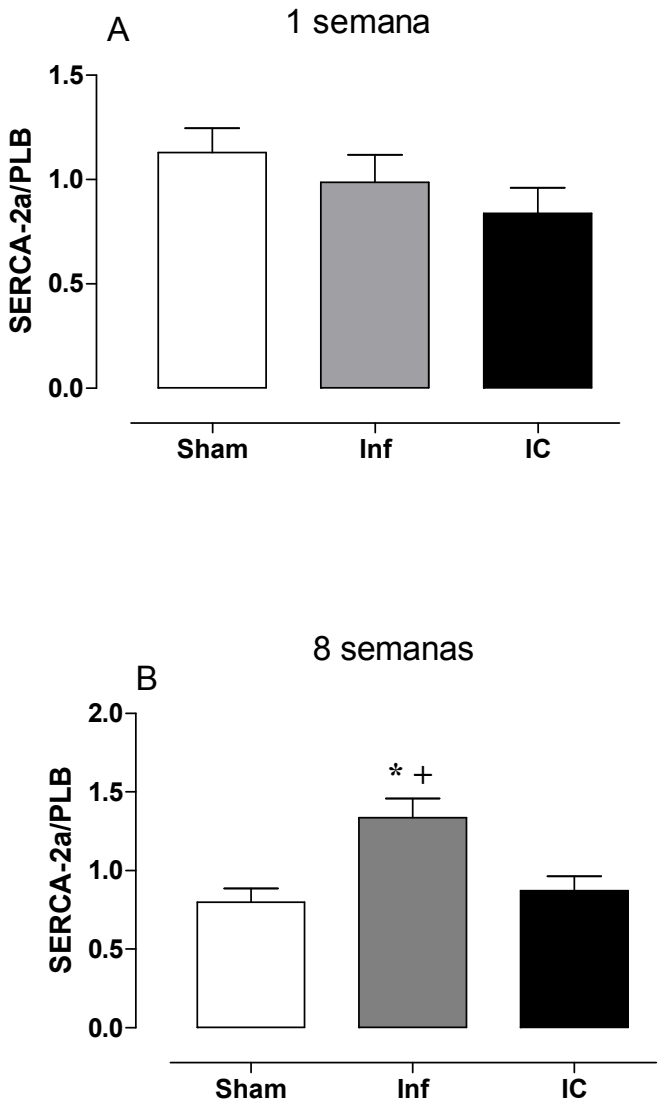

Figura 25 - Razão da expressão protéica da Serca-2a e fosfolambam total (Serca-2a/PLB) em ventrículos direito dos grupos uma semana (A) e oito semanas (B) após cirurgia de oclusão da coronária. Dados expressos como média ± EPM. A análise estatística foi realizada com ANOVA 1 via e *post hoc* de Tukey. *p<0,05 Inf *vs* Sham; + p<0,05 Inf *vs* IC.

Na fase inicial do IM, não houve diferença na expressão da fosfolambam fosforilada na serina-16 entre os grupos. No entanto, a expressão deste proteína foi menor no grupo IC em comparação ao Sham, mas não foi diferente do grupo Inf (Sham: 1,0±0,13, Inf: 0,91±0,14, IC: 0,55±0,11; p<0,05) a oito semanas do IM, como pode-se observar na figura 25 a e b.

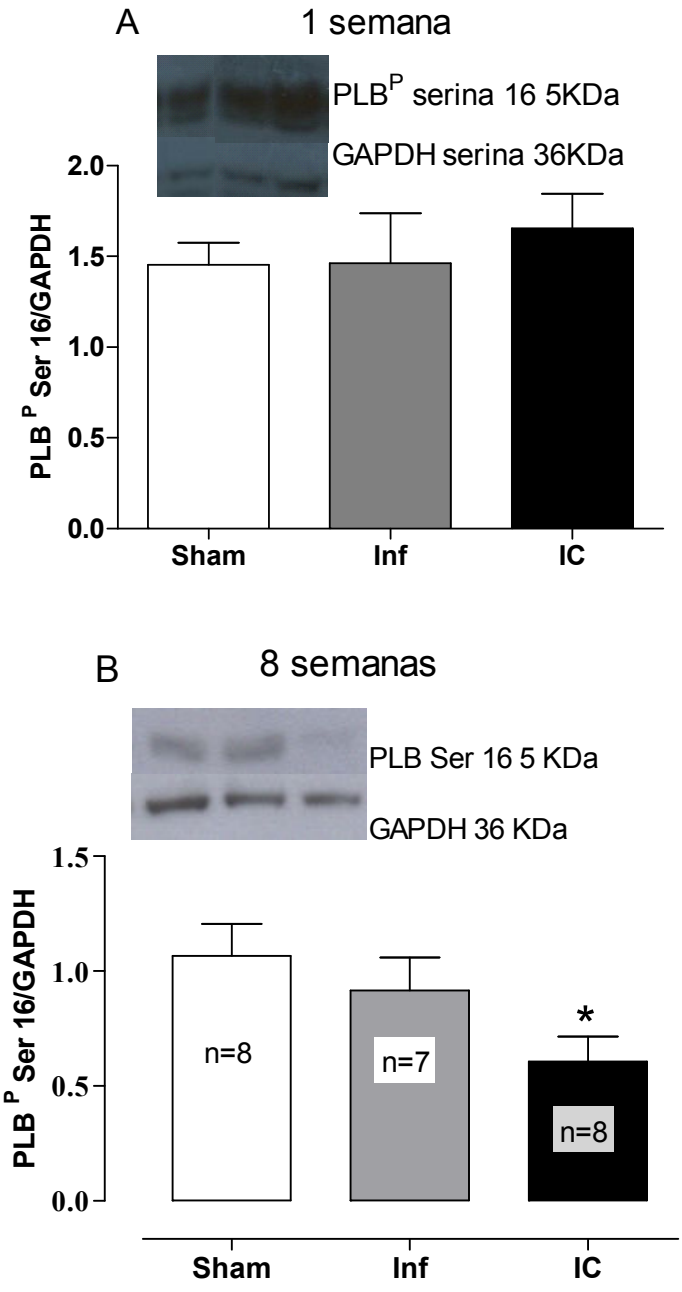

Figura 26 - Expressão protéica da fosfolambam (PLB^P) fosforilada na serina 16 em ventrículos direito dos grupos a uma e oito semanas do IM. Dados expressos como média ± EPM. A análise estatística foi realizada com ANOVA 1 via e *post hoc* de Tukey. *p<0,05.

A razão SERCA-2a/fosfolambam fostorilada não foi diferente entre os grupos infartados e Sham a uma semana. Por outro lado, a oito semanas do IM, esta razão foi maior no grupo infartado sem insuficiência (figura 26 a e b).

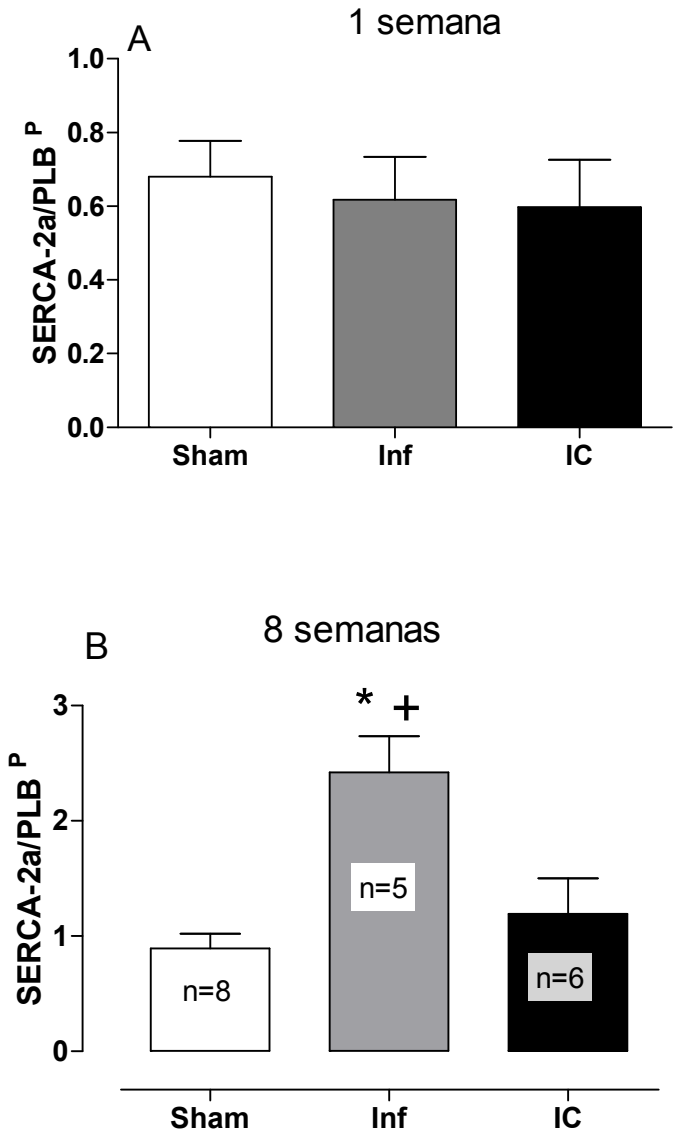

Figura 27 - Razão da expressão protéica da Serca-2a e fosfolambam fosforilada na serina 16 (Serca-2a/PLB^{P}) em ventrículos direito dos grupos uma e oito semanas após IM. Dados expressos como média ± EPM. A análise estatística foi realizada com ANOVA 1 via e *post hoc* de Tukey. *p<0,05 *vs* Sham; **+**p<0,05 *vs* IC.

Os grupos avaliados não cursaram com alterações na expressão do trocador Na^{+}/Ca^{2+} tanto no ventrículo direito a uma quanto a oito semanas de IM (figura 28).

A análise da razão SERCA-2a e trocador Na^{+}/Ca^{2+} estima a carga de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático e a velocidade no decaimento de Ca^{2+} diastólico. A figura 29 mostra menor razão SERCA-2a/NCX nos grupos infartados da fase aguda e por outro lado, o aumento desta razão em ventrículos direito do grupo Inf em comparação ao grupo Sham e IC na fase crônica ao IM.

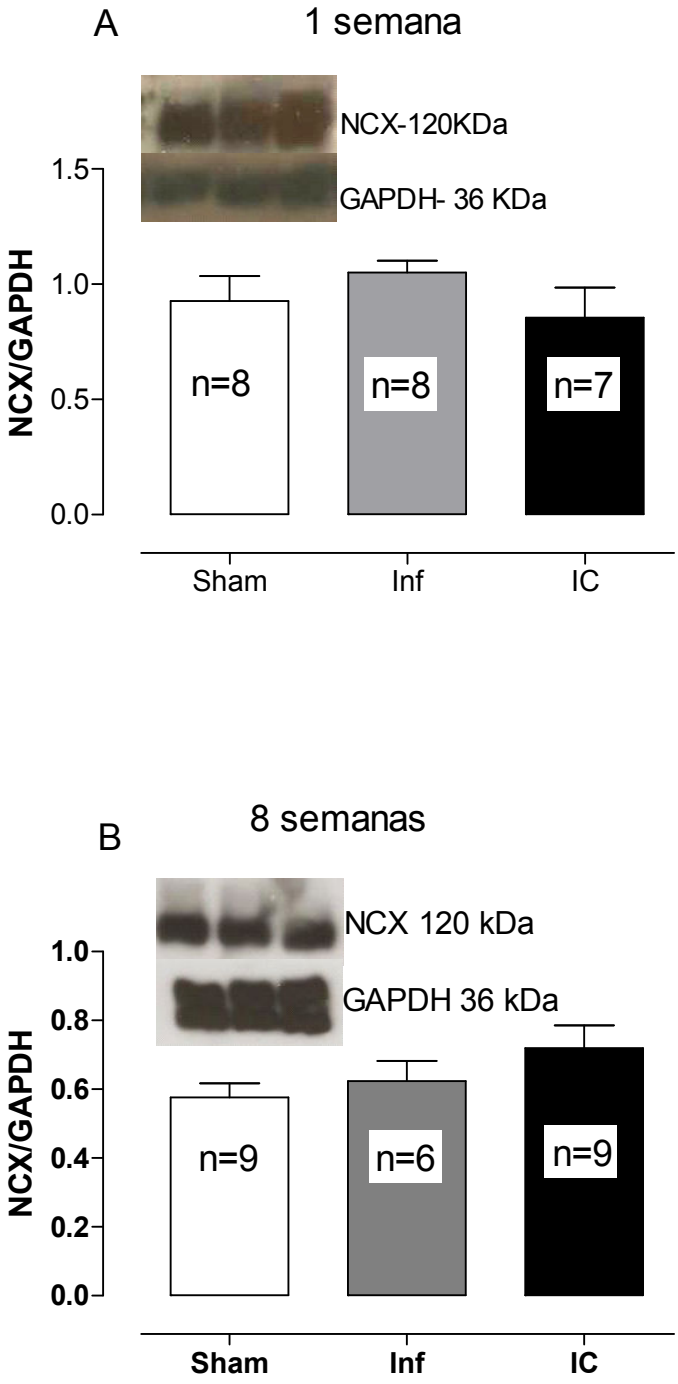

Figura 28- Expressão protéica do trocador Na^{+}/Ca^{2+} (NCX) em ventrículos direito dos grupos uma e oito semanas após IM. Dados expressos como média ± EPM. A análise estatística foi realizada com ANOVA 1 via e *post hoc* de Tukey.

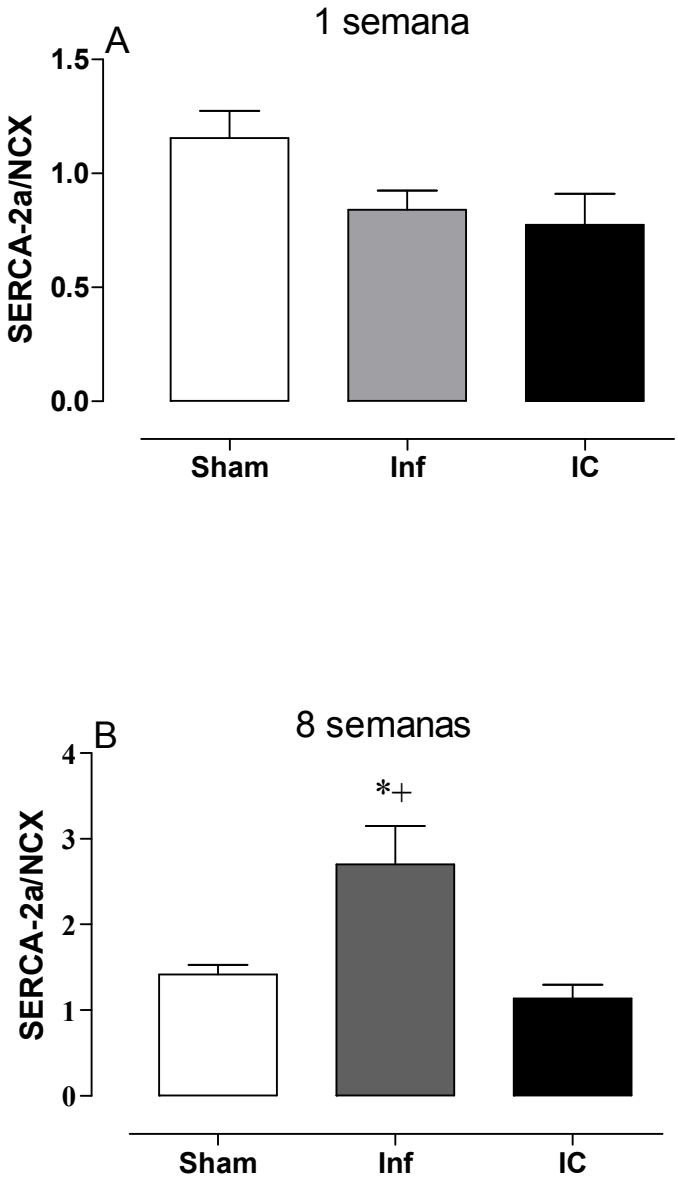

Figura 29- Razão da expressão protéica da Serca-2a e Trocador Na^{+}/Ca^{2+}(Serca-2a/NCX) em ventrículos direito dos grupos uma semana (A) e oito semanas (B) após a oclusão da coronária. Dados expressos como média ± EPM. A análise estatística foi realizada com ANOVA 1 via e *post hoc* de Tukey. * p<0,05 Inf *vs* Sham; + p<0,05 Inf *vs* IC.

4.6. Avaliação das correlações dos sinalizadores de IC e a área de cicatriz

A área de infarto medida através da planimetria após a visualização da área de cicatriz por transluminação, foi correlacionada com os sinalizadores de IC (PDfVE, VD/PC e PP/PC). Esta análise teve como objetivo avaliar se o tamanho do IM predispôs o desenvolvimento da IC. Conforme analisado na figura 30, não houve correlação significante entre os sinalizadores da IC e o tamanho da área de infarto. Entretanto, no presente estudo o tamanho da cicatriz de infarto não foi um fator determinante para a instalação da IC.

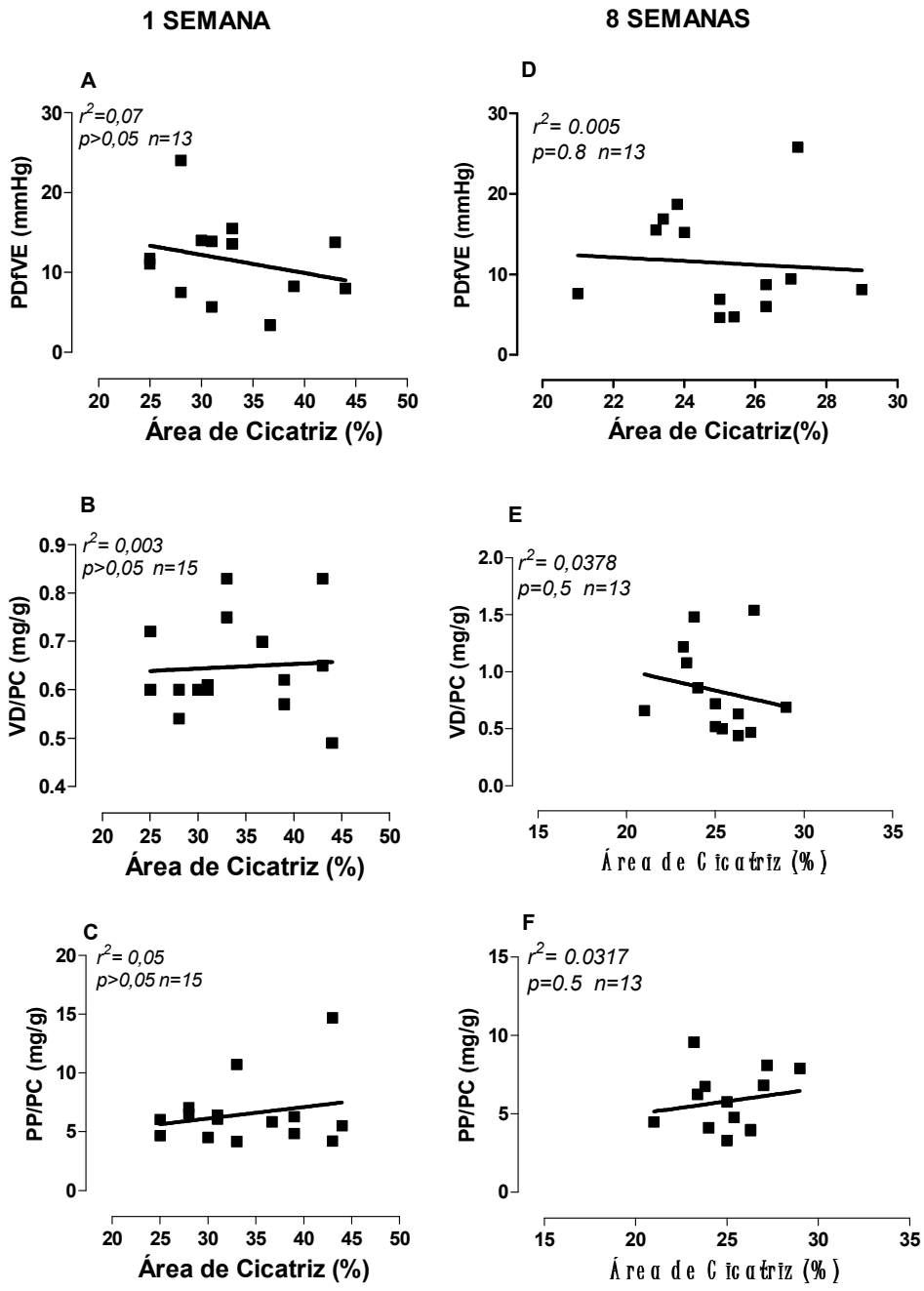

Figura 30 - Correlações entre os sinalizadores de IC e área de cicatriz de infarto medida por planimetria (%). Correlação entre PDfVE **(A)**, peso do ventrículo direito e peso corporal **(B)**, peso do pulmão e peso corporal **(C)** e e área de cicatriz medida por planimetria (%) na fase aguda do IM (1 semana); Correlação entre PDfVE **(D)**, peso do ventrículo direito e peso corporal **(E)**, peso do pulmão e peso corporal **(F)** e área de cicatriz infarto medida por planimetria (%) na fase crônica do IM (8 semanas). Não houve correlação entre os dados analisados.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Há muito tem se destacado na literatura a importância de se avaliar os danos do ventrículo esquerdo causado pela IC (Pfeffer *et al*., 1979; Pfeffer *et al*., 1984; Anversa *et al*., 1985). No entanto, menos atenção tem sido dada ao ventrículo direito cujo bombeamento se restringe a apenas um órgão, sua camada muscular ser menor do que lado esquerdo e por estar menos envolvido em doenças em comparação ao ventrículo esquerdo. O ventrículo direito vem sendo considerado apenas como vítima do processo patológico que afeta todo sistema cardiovascular sendo seu papel secundário nas doenças cardíacas (Camapana *et al*., 2004; Voelkel *et al*., 2008). Consequentemente, pouco tem se avaliado *in vitro* as modificações funcionais desta câmara ventricular na IC. Sabe-se que o aumento da pressão de enchimento do ventrículo direito está associado a sinais de deterioração ventricular e de redução da sua contratilidade direita (Campana *et al*., 2004). Com isso, o presente estudo teve como proposta avaliar a contratilidade do ventrículo direito em ratos nas fases inicial (1 semana) e tardia (8 semanas) após infarto agudo do miocárdio, em animais que apresentem ou não sinais de IC com mesma área de cicatriz.

O principal resultado obtido neste trabalho é que o prejuízo da força contrátil em ventrículos direito está presente na IC apenas na fase tardia após infarto do miocárdio. Na fase aguda, mesmo animais que demonstram sinais claros de IC, ainda mantém preservada a função ventricular direita *in vitro.* Estes resultados demonstram que o tamanho da cicatriz do infarto não foi o fator determinante de tais alterações e a área cicatriz de infarto não se correlacionou com os sinalizadores de IC (PDfVE, aumento da razão peso do pulmão e peso corporal e aumento da razão peso do ventrículo direito e peso corporal) nem com a contratilidade do ventrículo direito.

Pfeffer *et al*., em 1979 descreveram em um estudo que variações no tamanho da área de cicatriz de infarto causavam heterogeneidade na descrição das alterações hemodinâmicas no ventrículo esquerdo após a injúria. Enquanto os animais com pequenas áreas de infarto (menor que 30%) não apresentaram aumento da PDfVE, aqueles com grandes áreas (maior que 45%)

apresentaram aumento desta pressão intraventricular. Nas cicatrizes de tamanho moderado havia uma maior dispersão dos valores de PDfVE. É certo que a oclusão da artéria coronária pode provocar infartos de diferentes tamanhos na parede livre do ventrículo esquerdo. No presente estudo, os animais infartados apresentaram área de cicatriz entre 30 a 45 % do ventrículo esquerdo e mesmo assim foi possível detectar essa mesma dispersão de valores de PDfVE tanto uma quanto oito semanas após o infarto do miocárdio.

Dentro destes dois grupos infartados com similares áreas de cicatriz, 60% dos animais apresentaram preservados os valores da PDfVE e 40 % apresentaram aumento destes valores. Segundo Anversa *et al*., (1985), a PDfVE acima de 15 mmHg é um fator determinante para se comprovar a instalação da IC após infarto do miocárdio. O aumento da PDfVE representa um maior estiramento da câmara ventricular no período da diástole para que o débito cardíaco seja mantido normal. Consequentemente, essa alteração acarreta falência da bomba cardíaca num estágio mais avançado da IC (Mueller *et al*., 2002). A insuficiência ventricular esquerda após infarto do miocárdio está associada com a elevação da pressão ventricular direita e hipertrofia do ventrículo direito (Anversa *et al*., 1985). Quando a pressão de enchimento ventricular esquerda se eleva, a pressão sistólica ventricular direita aumenta para manter o gradiente de pressão para o leito pulmonar. Em modelos de animais insuficientes nota-se a hipertrofia do ventrículo direito acompanhada do aumento da PDfVE (Norman & Coers, 1960; Pfeffer 1979).

Neste estudo, o grupo classificado como insuficiente foi aquele que apresentou aumento da PDfVE na fase inicial e tardia do infarto do miocárdio. Associado ao aumento da PDfVE o grupo IC de 8 semanas apresentou hipertrofia ventricular direita, o que pôde ser constatado pelo aumento da razão peso do ventrículo direito e peso corporal. No entanto, os infartados sem IC mantiveram seus valores pressóricos e não apresentaram hipertrofia da câmara direita. Este dado sugere uma repercussão do lado direito causado pela falência do lado esquerdo do coração. Ademais, verifica-se a preservação da câmara direita após o infarto do miocárdio quando a PDfVE está também preservada. Por outro lado, na fase aguda ao infarto do miocárdio, não foi detectado a hipertrofia ventricular direita associada ao aumento da PDfVE.

A hipertrofia ventricular direita é um dos indicadores da instalação e evolução da IC (Davidoff *et al*., 2004; Pereira *et al*., 2005) e a ela está associada a disfunção do ventrículo direito em conseqüência da sobrecarga pressórica na câmara esquerda, o que indica, de acordo com este estudo, serem as alterações presentes no ventrículo direito bons indicadores do comprometimento da IC na fase tardia do infarto do miocárdio. Por outro lado, os animais que não desenvolveram hipertrofia direita após os 60 dias de infarto, mantiveram a função ventricular desta câmara.

A eficiência do coração como bomba é influenciada pela interdependência das funções normais do ventrículo direito e esquerdo. Os débitos dos ventrículos direito e esquerdo são inicialmente determinados pela interação entre a pré e pós-carga ventriculares e o estado contrátil do miocárdio (Sathish *et al*., 2006). Alguns estudos têm mostrado que a medida da fração de ejeção ventricular direita é um prognóstico independente da severidade da IC em humanos (Di Salvo *et al*., 1995; Groote *et al*., 1998; Zornoff *et al*., 2002; Voelkel *et al*., 2006). No entanto, a avaliação da função do ventrículo direito, frequentemente negligenciada na clínica, pode demonstrar o risco da mortalidade por IC nesta população (Zornoff *et al*., 2002). A disfunção ventricular direita ocasionada em decorrência da insuficiência ventricular esquerda crônica leva à inabilidade na manutenção do fluxo de sangue requerido para manter a pré-carga do ventrículo esquerdo adequada. Fica evidente que a função ventricular direita pode se tornar a via final na progressão da IC sendo esta função uma indicadora bem sensível de um pior diagnóstico após o infarto do miocárdio (Voelkel *et al*., 2008). Os resultados apresentados neste estudo demonstram que a disfunção do ventrículo direito em animais insuficientes apenas se manifestou tardiamente. Sendo assim, na fase mais precoce após o infarto do miocárdio, os animais com aumento da PDfVE, classificados assim como insuficientes, mantiveram a função contrátil do ventrículo direito preservada.

O presente estudo correlacionou a diminuição da força durante uma intervenção inotrópica com a hipertrofia do ventrículo direito. Os resultados demonstraram que quanto maior a hipertrofia ventricular direita, menor a força desenvolvida pelos ventrículos direito dos grupos estudados oito semanas após infarto do miocárdio. Neste estudo não foi possível detectar hipertrofia no

grupo 7 dias. Realmente, vários estudos têm mostrado o surgimento da hipertrofia ventricular direita em uma fase mais tardia, como três semanas após infarto do miocárdio (Pffefer *et al.* 1985; Anversa *et al.* 1985; Azfal & Dhalla 1992; Nahrendorf *et al.,* 2003). No entanto, a uma semana, o peso do ventrículo direito se mantém como nos animais controle (Wang *et al*., 2003) indicando a ausência do desenvolvimento da hipertrofia cardíaca direita na fase inicial do infarto do miocárdio (Pfeffer *et al*., 1991).

A habilidade do ventrículo esquerdo em bombear o sangue sob pressões adequadas está relacionada com a quantidade de tecido conectivo envolvido no remodelamento após o infarto do miocárdio (Pfeffer *et al*., 1979). A necrose seguida do infarto do miocárdio causa perda tecidual no ventrículo esquerdo e um processo reparativo é iniciado rapidamente para reconstruir o miocárdio infartado e manter a integridade estrutural do ventrículo. No caso de grandes infartos transmurais, a área pericicatricial é envolvida por tecido fibroso contribuindo então para o remodelamento do tecido remoto ao infarto do miocárdio (Sun & Weber, 2000). A perda tecidual na área de cicatriz leva a uma resposta hipertrófica no miocárdio sobrevivente resultando em aproximadamente 80% da reposição do tecido necrótico (Anversa *et al*., 1985). Umas das manifestações do remodelamento cardíaco após infarto do miocárdio são alterações no tamanho e massa do coração (Zornoff *et al*., 2008).

No presente estudo o aumento razão entre o peso do ventrículo esquerdo e o peso corporal na fase tardia após o infarto do miocárdio em animais insuficientes indicaria o processo de remodelamento sofrido neste grupo. Os animais livres de insuficiência, porém infartados não apresentaram aumento da razão entre o peso do ventrículo esquerdo e o peso corporal.

Na fase inicial do infarto do miocárdio observamos a diminuição da razão entre o peso do ventrículo esquerdo e o peso corporal nos animais insuficientes, porém o mesmo não foi notado no grupo livre de insuficiência. Considerando este achado, pode-se sugerir o início do processo de remodelamento ventricular no coração insuficiente, mas não naqueles livres de insuficiência. Esta consideração pode ser justificada pelo fato de que na fase inicial do infarto do miocárdio há um afilamento e o crescimento da parede infartada, perda de tecido muscular e consequentemente expansão do infarto

do miocárdio (Zornoff *et al*., 2008). Este processo ocorre dentro de horas após a injúria antes mesmo de ocorrer a deposição de colágeno, a proliferação de fibroblastos e o aumento do volume ventricular, sendo estes considerados fatores adaptativos que participam efetivamente do remodelamento ventricular (Pfeffer & Braunwald 1990).

Um dos parâmetros utilizados neste estudo para a avaliação da resposta contrátil dos ventrículos foi a primeira contração após a pausa no estimulo elétrico, que indiretamente avalia o movimento de Ca^{2+} decorrente da captação, armazenamento e liberação de Ca^{2+} do RS. As contrações após pausas no estímulo elétrico são potencializadas em conseqüência do acúmulo de Ca^{2+} dentro do RS durante este período, ocasionando maior liberação deste íon que se acumulou quando o estímulo novamente é deflagrado para gerar a contração (Mill *et al*., 1992; Vassallo *et al*., 1988).

A função do RS é de grande importância para o movimento de Ca^{2+} no miócito e consequentemente para a função mecânica cardíaca. Além da contração ser dependente de Ca^{2+}, grande parte do Ca^{2+} removido do citosol é recaptado pela SERCA-2a promovendo o relaxamento durante a diástole cardíaca. Um achado comum na literatura é que em corações insuficientes, tanto de humanos quanto de animais experimentais, existe uma contribuição menor do RS para o acoplamento excitação-contração em decorrência de alterações nas proteínas envolvidas na função do RS ou por alterações na sua carga de Ca^{2+} (Pieske *et al*., 2002; Carvalho *et al*., 2006; Pinto *et al*., 2007).

Neste estudo, a potenciação pós pausa foi menor na fase inicial após infarto do miocárdio no grupo insuficiente apenas na pausa de curta duração (15 segundos). Na fase tardia, não houve diferença entre os grupos estudados. A média de força desenvolvida calculada entre a última e a primeira pausa também não foi diferente entre os grupos. Apesar destes achados não serem esclarecedores, é importante notar que o ventrículo direito não é capaz de responder efetivamente à pausa no estímulo elétrico. Sathish *et al*., (2007) demonstraram diferenças entre o ventrículo direito e o ventrículo esquerdo na freqüência de recaptação Ca^{2+} pelo RS em corações de ratos saudáveis. Os resultados destes pesquisadores mostraram que a taxa de recaptação de Ca^{2+} pelo RS é quatro vezes menor no ventrículo direito em comparação ao

ventrículo esquerdo, apesar das duas câmaras apresentarem similares expressões de SERCA-2a.

Ao avaliar a força desenvolvida na presença de concentrações crescentes de Ca^{2+} foi observado que houve prejuízo contrátil do ventrículo direito apenas no grupo infartado com IC, mas foi normal naqueles sem a doença oito semanas após infarto do miocárdio. Já, uma semana o infarto, houve o prejuízo da resposta inotrópica positiva apenas nos animais infartados sem IC em comparação ao controle nas últimas concentrações de cálcio (2,5 mM e 3,75 mM). Diferente do que foi observado na fase tardia, uma semana após infarto a resposta inotrópica positiva do grupo IC esteve preservada.

Afzal & Dhalla (1992) mediram a captação de Ca^{2+} pelo RS em ventrículos direito de animais infartados com IC e seus resultados mostraram um aumento na captação deste íon nestes animais em comparação ao controle a 4 semanas do infarto do miocárdio com uma diminuição progressiva nesta taxa de captação 8 e 16 semanas após infarto do miocárdio. Portanto, estes pesquisadores relataram uma hiperfuncionalidade do ventrículo direito associada a maior captação de Ca^{2+}, o que corrobora os resultados do presente estudo.

Na fase inicial do infarto do miocárdio (uma semana) foi encontrada diminuição da resposta contrátil na câmara ventricular direita a intervenções inotrópicas positivas no grupo infartado sem IC e preservação destas respostas no infartado com IC. Mas, a expressão da SERCA-2a não foi diferente entre os grupos estudados.

As mudanças no transiente de Ca^{2+} exercem um papel importante na deterioração progressiva do miócito vista na IC. A sobrecarga diastólica de Ca^{2+} explicada pela dificuldade de recaptação para os estoques intracelulares é uma das formas pela qual a quantidade e o transiente de Ca^{2+} tornam-se prejudicados nesta doença. Em modelos de insuficiência estudados é comum observar que o declínio do Ca^{2+} intracelular é lento contribuindo para uma disfunção diastólica (Bers, 2006). Vários estudos atribuem este fato à redução da atividade da SERCA-2a sendo esta uma característica da IC (Bers *et al*., 2003; Bers, 2006; Inesi *et al*., 2008).

A partir do protocolo experimental em que concentrações crescentes de Ca^{2+} foram adicionadas à perfusão dos músculos estudados, pode-se avaliar a

resposta inotrópica destas preparações. Como esperado, o aumento da concentração do cálcio extracelular promoveu efeito inotrópico positivo em todos os grupos. Entretanto, este aumento foi menor no grupo com IC oito semanas após o infarto do miocárdio. Tais resultados sugerem que o ventrículo direito do grupo infarto sem insuficiência mantêm o balanço de Ca^{2+}, e assim, a contratilidade, à custa de aumento na expressão da SERCA-2a. Na fase inicial, 1 semana após infarto do miocárdio, o incremento da força foi menor no grupo Inf, mas não no IC. No entanto, a expressão protéica da SERCA-2a não foi diferente entre os grupos.

O transporte de Ca^{2+} mediado pela SERCA-2a é responsável por manter o relaxamento muscular e os estoques de Ca^{2+} do RS, por isso, sua função tem sido extensivamente estudada na IC através da utilização de modelos animais e de tecidos humanos no estágio final da doença (Periasamy *et al.*, 2007). Entretanto, alguns estudos demonstram que a expressão desta proteína no ventrículo esquerdo está inalterada (Frank *et al*., 2003; Couchounnal & Anderson 2008), apesar da redução na recaptação de Ca^{2+} pelo RS, enquanto outros têm mostrado diminuição na sua expressão (Schwinger *et al*., 1999; Netticadan *et al*., 2000; Sande *et al*., 2002; Bassani & Bassani 2005; Armoundas *et al*., 2006; Lenhart *et al*., 2009). Apesar dos estudos serem pouco esclarecedores, sabe-se que a superexpressão da SERCA-2a está associada com a melhora da função contrátil em modelos de animais e em humanos com IC, o que permite inferir o grande envolvimento desta proteína na disfunção cardíaca oriunda da instalação da insuficiência (Hajjar *et al*., 1997; Baartscheer 2001; Bassani & Bassani 2005; Maier *et al*., 2005). Maier *et al*., (2005) encontraram o aumento do conteúdo de Ca^{2+} do RS em ratos transgênicos que superexpressaram a SERCA-2a e os mesmos apresentaram um melhor desempenho contrátil. Contudo, a superexpressão da SERCA-2a foi atribuída ao maior conteúdo de Ca^{2+} do RS, que por sua vez, leva ao aumento da liberação deste íon durante a contração. Ademais, o maior conteúdo de Ca^{2+} do RS representa um mecanismo importante envolvido no aumento da reserva inotrópica dos miócitos (Maier *et al*., 2005).

Hasenfuss *et al*., (1999) estudaram dois grupos de pacientes com IC na fase tardia. Um grupo apresentou função diastólica normal e neste foi visto aumento da expressão do trocador Na^{+}/Ca^{2+} e redução na expressão da

SERCA-2a. O outro grupo de pacientes apresentou disfunção diastólica e menor expressão da SERCA-2a, sem alteração da expressão do trocador Na^+/Ca^{2+}. Portanto, a discriminação do miocárdio humano insuficiente de acordo com as diferenças na função diastólica resulta em subgrupos com diferenças consideráveis na expressão das proteínas envolvida no transiente de Ca^{2+}. No entanto, ambos os grupos estão associados com uma diminuição do Ca^{2+} disponível durante a sístole e com o prejuízo da função sistólica.

Os resultados apresentados neste estudo mostram que a expressão do trocador Na^+/Ca^{2+} está inalterada no ventrículo direito dos grupos estudados tanto na fase inicial quanto na fase tardia do infarto do miocárdio. Estes resultados não foram efetivamente concordantes com o estudo de Hasenfuss *et al*., (1999), muito embora, há outros estudos que não detectaram modificações na expressão desta proteína na IC (Piacentino *et al*., 2003; Armoundas *et al*., 2006; Carvalho *et al*.,2006; Diedrichs *et al*., 2007).

No protocolo realizado para a avaliação da resposta inotrópica β-adrenérgica observou-se resultados bem semelhantes aos encontrados com a curva de Ca^{2+}. O inotropismo positivo do grupo insuficiente oito semanas após infarto foi menor do que os demais, enquanto que no grupo infartado, sem insuficiência, a força foi preservada como no grupo controle. Na fase mais precoce após o infarto do miocárdio, houve preservação da resposta β-adrenérgica no grupo insuficiente, enquanto que no grupo infartado, sem insuficiência, houve diminuição da força em comparação aos demais.

O aumento na geração de força com o estímulo β-adrenérgico é conseqüência do aumento do influxo de Ca^{2+} pelo sarcolema e também pelo RS. Em condições normais, as catecolaminas, ao se acoplarem aos receptores β-adrenérgicos, ativam as proteínas Gs que por sua vez estimulam a adenilato ciclase, aumentando os níveis de AMPc. Em seguida a PKA é ativada e fosforila as proteínas que permitem o aumento do Ca^{2+} citosólico como os canais de Ca^{2+} tipo-L, os receptores de rianodina e as proteínas regulatórias da contração, como a TnI e a fosfolambam que participam do processo de relaxamento do miocárdio (Lohse *et al.,* 2003).

Tem sido demonstrado que na fase aguda após infarto do miocárdio, o aumento das respostas cronotrópica e inotrópica pode ser explicado pela maior estimulação dos receptores adrenérgicos em função do aumento das

catecolaminas circulantes. Este fato tende a manter a função da bomba cardíaca frente à perda abrupta do tecido contrátil (Pfeffer & Braunwald 1990). Contudo, estes mecanismos compensatórios agudos podem se tornar inadequados, já que o aumento da atividade simpática leva a dessensibilização de β-adrenoceptores e, consequentemente, sua *downregulation* (White *et al*., 2000).

Com os resultados encontrados neste trabalho, pode-se observar que o ventrículo direito do rato com IC mantém a resposta inotrópica frente à ativação β-adrenérgica na fase aguda, mas, não na fase crônica após infarto do miocárdio. No entanto, uma resposta inversa é obtida no grupo infartado livre de IC. Neste grupo, a resposta β-adrenérgica está diminuída na fase inicial do infarto e mantida na fase tardia. Uma explicação para a diferença na capacidade de resposta inotrópica diante de uma ativação β-adrenérgica entre os grupos infarto com e sem IC poderia envolver os mecanismos de *upregulation* e *downregulation* regulação destes receptores. Milano *et al*., (1994) propuseram que a superexpressão do receptor β-adrenérgico atue como um mecanismo para melhorar a função cardíaca. No entanto, esta resposta, tanto em humanos como em camundongos, poderia induzir a cardiomiopatia ou até mesmo piorar o prognóstico desta doença. Por outro lado, em camundongos transgênicos que superexpressam estes receptores, nos quais a via β-adrenérgica foi inibida, houve melhora da função cardíaca e retardo no remodelamento (Rockman *et al*., 1998). De fato, nossos resultados demonstram que na fase inicial após o infarto do miocárdio, a contratilidade foi mantida no grupo IC, o que poderia ser explicado por um aumento da resposta adrenérgica. Tal sobrecarga na fase inicial poderia justificar a descompensação da função cardíaca na fase tardia do infarto do miocárdio, o que leva a ineficiência da ativação adrenérgica nesta fase (Rockman *et a*l., 1998).

Alguns trabalham relatam que o óxido nítrico (NO), produzido pela ativação da enzima óxido nítrico sintase induzível ($_{i}$NOS), aumenta na fase aguda após o infarto, o que poderia contribuir para uma queda da contratilidade do miocárdio remanescente (Wildhirt *et al*., 1995). Estudos prévios realizados em nosso laboratório mostraram que a inibição da $_{i}$NOS três dias após infarto, em ratos com IC, levou ao aumento da resposta inotrópica ao isoproterenol em músculos papilares de ventrículo esquerdo (Pinto *et al*., 2007). Baseado nesta

evidência, estes autores sugeriram que o aumento na expressão da ¡NOS e na produção de NO, poderia reduzir o efeito inotrópico do isoproterenol e como conseqüência encobrir uma *upregulation* da via β-adrenérgica. Possivelmente, o aumento na biodisponibilidade cardíaca de NO após o infarto do miocárdio poderia proteger o coração na fase inicial da IC agindo com um β-bloqueador endógeno. O presente estudo mostra uma resposta β-adrenérgica preservada no ventrículo direito do grupo IC 7 dias após infarto. Neste caso, seria importante investigar se a ¡NOS não estaria impedindo o aumento da resposta β-adrenérgica no ventrículo direito.

Após a ativação simpática o alvo primário do AMPc, a proteína quinase A (PKA), fosforila, dentre outras, a proteína fosfolambam que quando fosforilada aumenta a atividade da SERCA-2a resultando em recaptação de Ca^{2+} para o RS (Lohse *et al*., 2003).

A fosfolambam é uma proteína importante na regulação da SERCA-2a e do transporte de Ca^{2+} através da membrana do RS, sendo então capaz de modular o relaxamento do miocárdio (Huang, *et al*., 1999; Hagemann, *et al*., 2000). A fosforilação da fosfolambam restabelece a função da SERCA-2a facilitando a captação de Ca^{2+} do RS e o relaxamento muscular (Waggoner *et al*., 2008). Em seu estado desfosforilado a fosfolambam inibe a SERCA-2a e uma vez fosforilada pela PKA e pela cálcio-calmodulina quinase II na serina-16 e treonina 17 respectivamente, essa remoção é inibida o que aumenta a afinidade da SERCA-2a pelo Ca^{2+} (Frank *et al*., 2003). A fosfolambam fosforilada na serina-16 foi uma das vias analisadas neste trabalho. A fosforilação desta proteína neste sítio tem sido considerada como pré-requisito para a sua fosforilação na treonina 17, além disso, a serina 16 é o principal sítio de fosforilação da fosfolambam em resposta ao aumento nos níveis de AMP cíclico durante a administração de um agonista β-adrenérgico e a que está mais relacionada com o aumento da contratilidade cardíaca (Huang *et al*., 1999; Frank *et al*., 2003), por isso avaliamos somente a sua expressão.

Foi observado que, oito semanas após o infarto, a expressão protéica da fosfolambam fosforilada na serina-16 do grupo infartado livre de insuficiência foi inalterada em comparação ao Sham. Uma redução da fosforilação da fosfolambam, mediada pela PKA em corações insuficientes, pode ser explicada por mudanças nos níveis de sinalização β-adrenérgica (Zakhary et al., 1999) e

esta redução é um importante fator determinante para a menor captação de Ca^{2+} pelo RS na IC após infarto do miocárdio (Sande *et al*., 2001). Tem sido descrito que o aumento da expressão da SERCA-2a e valores normais de fosfolambam fosforilada melhoram a função ventricular e diminui a susceptibilidade a arritmias (Prunier *et al*., 2008; Lenhart *et al*., 2009). A preservação da fosfolambam fosforilada pode justificar, ao menos na fase tardia do infarto do miocárdio, a preservação da resposta contrátil no grupo infartado sem insuficiência, observada neste estudo. Contudo, na fase inicial do infarto (1 semana), não houve diferença, entre os grupos, na expressão desta proteína.

A razão SERCA2a/fosfolambam é um determinante importante da homeostase de Ca^{2+} no miócito. A diminuição desta razão contribui para o aumento dos níveis distólicos de Ca^{2+} levando a disfunção cardíaca (Koss & Kranias, 1996; Lenhart *et al*., 2009). Esta afirmação se deve à menor captação de Ca^{2+} para o RS e sua maior extrusão para o espaço extracelular, o que mais tarde resultará na depleção dos estoques deste íon no RS (Brittsan *et al*., 2000; Lenhart *et al*., 2009).

Brittsan *et al*., (2000) mostraram que a inibição da afinidade da SERCA-2a pelo Ca^{2+} através da fosfolambam é obtida a partir de níveis de expressão que são 2,6 vezes maior da fosfolambam em relação à SERCA-2a em ratos. Em nosso estudo, a razão SERCA-2a/PLB foi avaliada nos grupos. Na fase crônica, apesar dos ventrículos direito do grupo infartado sem insuficiência apresentarem aumento na expressão da fosfolambam total, a SERCA-2a também foi superexpressada mantendo a razão SERCA-2a/PLB maior do que os outros grupos estudados. O aumento na expressão da SERCA-2a em relação à fosfolambam pode ter contribuído para o aumento do transporte de Ca^{2+} e melhora da função ventricular direita em ratos infartados sem insuficiência na fase tardia do infarto do miocárdio. Por outro lado, na fase inicial, a função preservada do ventrículo direito no grupo insuficiente não foi explicada pelo aumento desta razão uma vez que a razão SERCA-2a/PLB foi semelhante entre os grupos.

Além das alterações no inotropismo, a IC também pode vir acompanhada de mudanças no lusitropismo. O relaxamento do miócito é mediado pela remoção de Ca^{2+} do RS através de uma ação combinada entre

SERCA-2a e trocador Na^+/Ca^{2+}. O trocador Na^+/Ca^{2+} colabora para o relaxamento da célula cardíaca através da extrusão do Ca^{2+}. Em corações humanos insuficientes tem sido observado um aumento na expressão do trocador Na^+/Ca^{2+} o que levaria a um maior declínio do Ca^{2+} através da extrusão deste íon contribuindo para a depleção do seu estoque no RS, sendo este fato agravado pela diminuição da expressão protéica da SERCA-2a (Bers *et al*., 2003; Inesi *et al*., 2008; Mork *et al*., 2009; Lehnart *et al*., 2009). No entanto, estudos em ratos são ainda controversos uma vez que já foi demonstrado tanto o aumento na expressão do trocador Na^+/Ca^{2+} (Bers, 2000; Diedrichs et al., 2007; Swift et al., 2008) quanto sua expressão inalterada (Hansefuss *et al*., 1999; Gómez et al., 2002; Carvalho et al., 2006; Daniels et al., 2007). Apesar das incertezas quanto as mudanças na expressão do trocador Na^+/Ca^{2+} na IC, a razão SERCA-2a/ trocador Na^+/Ca^{2+} (SERCA/NCX) tem sido utilizada como uma análise mais uniforme nesta doença (Hasenfuss *et al*., 1999; Leszek *et al*., 2007). Tanto o aumento na expressão do trocador Na^+/Ca^{2+} quanto a diminuição da expressão da SERCA-2a resultam na redução do conteúdo de Ca^{2+} do RS, o que diminui a disponibilidade deste íon durante a ativação sistólica (Hasenfuss *et al*., 1999). Portanto, a razão SERCA/NCX altera-se nas duas condições. Nos resultados apresentados neste trabalho, a expressão do trocador Na^+/Ca^{2+} não foi modificada nem na fase inicial nem na fase tardia após o infarto. Muito embora, oito semanas após o infarto, a razão SERCA/NCX apresentou-se aumentada no grupo infartado sem insuficiência. Tais resultados corroboram com a observação da preservação da função contrátil da câmara ventricular direita deste grupo, sendo este mais um indicativo da preservação das proteínas envolvidas no transiente de Ca^{2+} nestes corações.

No presente estudo, observou-se que na fase inicial após infarto, a expressão das proteínas envolvidas no transiente de Ca^{2+} estava inalterada em ambos os grupos infartados. Este achado pode sugerir que nesta fase ainda não haja modificações na expressão destas proteínas, mesmo mediante a maior ativação simpática. Estes resultados sugerem que a análise da expressão destas proteínas envolvidas no transporte de Ca^{2+} não seria bom indicador da instalação ou não da IC na fase inicial após infarto do miocárdio.

Os dados deste estudo mostram também que a contratilidade em resposta à concentração de 10^{-5} M de Isoproterenol apresentou uma correlação negativa com os sinalizadores da IC na fase tardia do infarto do miocárdio, como o aumento da PDfVE, hipertrofia ventricular direita e aumento da razão peso do pulmão e peso corporal. No entanto, na fase inicial após infarto, não houve correlação entre a hipertrofia ventricular direita e a razão peso do pulmão e peso corporal e a força exercida pelas tiras de ventrículo direito. Uma observação surpreendente foi a correlação positiva entre a PDfVE e a força em resposta à concentração de 10^{-5} M de Isoproterenol. Realmente, o grupo IC apresentou maior resposta inotrópica β-adrenérgica, o que explica este achado. Uma possível explicação para este fato seria a maior modulação da via dos receptores β-adrenérgicos. Muito embora este estudo não tenha avaliado a expressão e a densidade de receptores β-adrenérgicos, os estudo de Milano *et al*., (1994) demonstraram aumento da função ventricular em camundongos transgênicos que superexpressaram o receptor β-adrenérgico.

Tendo em vista todas as respostas obtidas, neste estudo, pode-se concluir que na fase inicial do infarto o aumento da PDfVE seria um sinalizador precoce da IC, vez que a função ventricular direita ainda estava preservada. Outro dado importante foi a correlação negativa entre o peso corporal e a PDfVE presente já na fase inicial do infarto do miocárdio. Em estudos prévios realizados em nosso laboratório com ratos insuficientes foi demonstrado que a perda de peso corporal está associada à presença de IC uma semana após infarto do miocárdio. Faria (2009) demonstrou que o peso corporal tem 100% de sensibilidade e 83,8% de especificidade para detecção da IC.

Em ventrículos direito de animais infartados sem insuficiência, o aumento da SERCA-2a e expressão inalterada da fosfolambam fosforilada na serina 16 garantiram a contratilidade normal nestes miócitos, pelo menos na fase tardia do infarto do miocárdio.

Portanto, de acordo com este estudo, na fase inicial do infarto do miocárdio, as expressões das proteínas envolvidas no transiente de Ca^{2+} ainda não estão alteradas tanto no grupo IC quanto no grupo livre de IC. O grupo IC preservou a resposta contrátil nesta fase, porém, o grupo livre de IC apresentou prejuízo desta resposta.

Um questionamento plausível, tendo em vista os resultados obtidos aqui, seria o motivo da diminuição da resposta contrátil no grupo infartado livre de IC aos sete dias após infarto do miocárdio. Outros estudos demonstraram uma diminuição da resposta β-adrenérgica nesta fase (Mill et al. 1990; Stefanon et al., 1994; Novaes et al., 1996). É possível que esta redução da contratilidade seja uma adaptação benéfica frente a hiperatividade simpática que ocorre na fase inicial após infarto do miocárdio. Os dados do presente estudo não são suficientes para a explicação deste evento, porém Sathish *et al*., (2006) mostraram que em corações saudáveis a captação de Ca^{2+} pelo RS é mais lenta no ventrículo direito do que no ventrículo esquerdo. Esta diferença baseou-se não na menor quantidade de SERCA-2a, mas em maior número de unidades inertes desta bomba de Ca^{2+} na câmara ventricular direita, o que representa mais unidades inibidas pela fosfolambam. Esta inibição funcional silenciaria a SERCA-2a no ventrículo direito, sendo esta uma forma de manter uma grande reserva diastólica o que protegeria e manteria a função deste ventrículo frente a um repentino aumento de pós-carga.

Em suma, ainda há necessidade de aprofundar os estudos para esclarecer as causas desta dicotomia funcional entre os grupos infartadas com e sem sinais de IC. O caminho mais provável seria investigar alguns dos mecanismos importantes na regulação da contratilidade miocárdica, os quais não foram pesquisados neste trabalho, como as vias de sinalização β-adrenérgica, a participação dos receptores de rianodina, a enzima ¡NOS.

Podemos considerar como uma limitação deste estudo o fato de que a avaliação temporal aqui descrita não ter sido realizada no mesmo rato. Para tanto, a análise da função cardíaca deveria ser avaliada com o uso de métodos não invasivos, o que permitiria o acompanhamento do mesmo animal ao longo de um período de estudo. A técnica de ecocardiográfia para pequenos animais, muito embora possua limitações, poderia ser usada para este fim. No entanto, ainda não é possível avaliar a evolução das alterações das proteínas relacionadas com o movimento de cálcio no mesmo animal, por um método não invasivo.

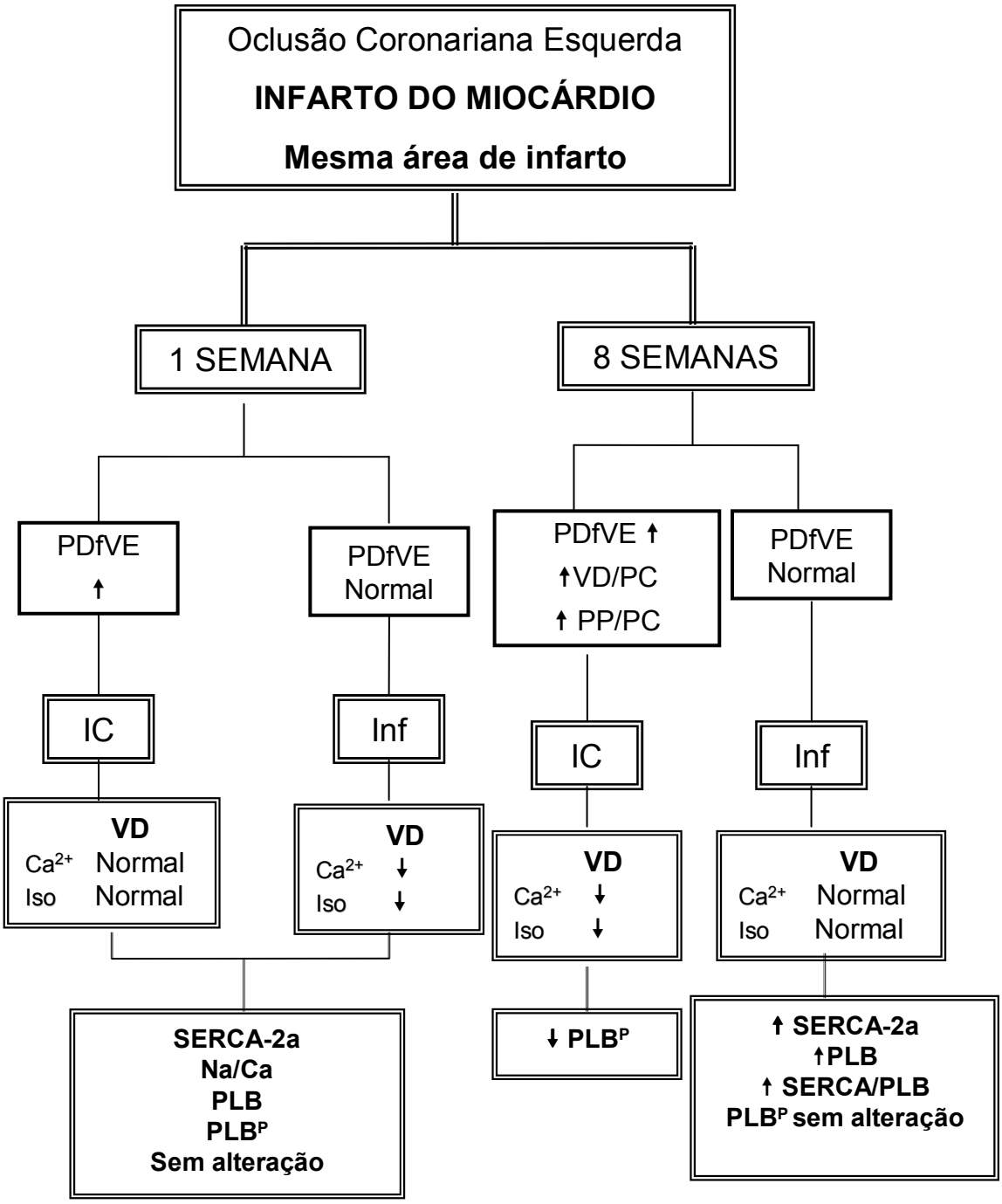

Figura 31: Diagrama dos resultados. Pressão Diastólica final no ventrículo esquerdo (PDfVE), razão peso do ventrículo direito e peso corporal (VD/PC), peso do pulmão e peso corporal (PP/PC), infarto sem insuficiência (Inf), infarto com insuficiência (IC).

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

O principal resultado obtido neste trabalho é que o prejuízo da força contrátil no ventrículo direito está presente na insuficiência cardíaca apenas na fase tardia após infarto do miocárdio. Na fase aguda, animais com a PDfVE aumentada, classificados com insuficientes, preservaram a função ventricular direita in vitro. Inversamente, nos animais infartados sem sinais de insuficiência, a contratilidade do ventrículo direito estava prejudicada na fase inicial e preservada na fase tardia após infarto. A superexpressão da SERCA-2a e o aumento da razão SERCA/NCX, parecem ser fatores importantes para que os corações infartados sem insuficiência cardíaca mantenham a contratilidade do ventrículo direito na fase tardia do IM.

O tamanho da cicatriz do infarto não foi o fator determinante do desenvolvimento da insuficiência cardíaca visto que a área de cicatriz de infarto não se correlacionou com os sinalizadores de insuficiência cardíaca (PDfVE, aumento da razão peso do pulmão e peso corporal e aumento da razão peso do ventrículo direito e peso corporal) nem com a contratilidade do ventrículo direito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afzal N., Dhalla N.S. (1992). Differential changes in left and right ventricular SR calcium transport in congestive heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **262**: H868-H874.

Ahlers B.A., Song J., Wang J., Zhang X.Q., Carl L.L., Tadros G.M., Rothblum L.I., Cheung J.Y. (2005). Effects of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase overexpression in postinfarction rat myocytes. *J Appl Physiol* .

Anversa P., Beghi C., McDonald S.L., Levicky V., Kikkawa Y., Olivetti G. (1984). Morphometry of right ventricular hypertrophy induced by myocardial infarction in the rat. *American Journal of Pathology* **116**: 504-513.

Anversa P., Loud A.V., Levicky V., Guideri G. (1985). Left ventricular failure induced by myocardial infarction. I.Myocite hypertrophy. *American Journal of Physiology and Heart Circulatory Physiology* **248:** H876-H882.

Armoundas A.A., Rose J., Aggarwal R, Stuyvers B.D., O'Rourke B., Kass D.A., Marban E. Shorofsky S.R., Tomaselli G.F., C. William Balke C.W (2007) Cellular and molecular determinants of altered Ca^{2+} handling in the failing rabbit heart: primary defects in SR Ca^{2+} uptake and release mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**: H1607–H1618.

Baartscheer A. (2001). Adenovirus gene transfer of SERCA in heart failure. A promising therapeutic approach ? *Cardiovascular Research* **49**: 249–252

Bassani J.W.M., Bassani R.A. (2005). SERCA upregulation: Breaking the positive feedback in heart failure? *Cardiovascular Research* **67**: 581-582.

Bers D. M. (2000). Calcium Fluxes Involved in Control of Cardiac Myocyte Contraction. *Circ Res* **87**: 275-281.

Bers D.M. and Despa S. (2006). Cardiac myocytes Ca^{2+} and Na^{+} regulation in normal and failing hearts. *J Pharmacol Sci* **100**: 315 – 322.

Bers D.M., Eisner D.A. Valvidia H.H (2003). Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} and heart failure: roles of diastolic leak and Ca^{2+} transport. *Circ. Res.* **93**: 487-490.

Bers D.M. (2006). Altered Cardiac Myocyte Ca^{2+} Regulation In Heart Failure *Physiology* **21**: 380-387.

Blaustein M. P. and Lederer J. W. (1999). Sodium/Calcium Exchange: Its Physiological Implications. *Physiological Reviews* **79**: 764-830.

Boknık P., Unkel C., Kirchhefer U, Kleideiter U., Klein-Wiele O., Knapp J. , Linck B., Lüss H. , Müller F.U., Schmitz W., Vahlensieck U., Zimmermann N., Jones L.R., Neumann J. (1999). Regional expression of phospholamban in the human heart. *Cardiovascular Research* **42**: 67–76.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**: 248-54.

Brittsan A.G., Carr A.N., Schmidt A.G., Kranias E.G. (2000). Maximal inhibition of SERCA2 Ca^{2+} affinity by phospholamban in transgenic hearts overexpressing a non-phosphorylatable form of phospholamban. *J Biol Chem* **275** (16): 12129-12135

Cambão M.S., Moreira A.F.L. (2009). Pathophysiology of Chronic Heart Failure. *Rev Port Cardiol* **28** (4):439:471.

Campana C., Pasotti M., Monti L., Revera M., Serio A, Nespoli L, Magrini G., Scelsi L, Ghio S., Tavazzi L. (2004) The evaluation of right ventricular performance in different clinical models of heart failure. *European Heart Journal Supplements* **6**: F61–F67

Carvalho B.M., Bassani R.A. Franchini K.G., Bassani J.W. (2006). Enhanced calcium mobilization in rat ventricular myocytes during the onset of pressure overload-induced hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291** (4): H1803-13.

Couchonnal L. F. and Anderson M. E. (2008). The Role of Calmodulin Kinase II in Myocardial Physiology and Disease. *Physiology* **23**:151-159.

Daniels M.C.G., Naya T., Rundell V.L.M., de Tombe P.P (2007). Development of contractile dysfunction in rat heart failure: hierarchy of cellular events. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* **293**:284-292.

Davidoff A.W., Boyden P.A., Schwartz K., Michel J.B., Zhang Y.M., Obayashi M., Crabbe D., Ter Keus H.E.D.J. (2004). Congestive heart failure after myocardial infarction in the rat: cardiac force and spontaneous sarcomere activity. *New York Academy of Sciences* **1015**: 84-95.

Di Salvo T.G., Mathier M., Semigran M.J., Dec G.W. (1995). Preserved right ventricular ejection fraction predicts exercise capacity and survival in advanced heart failure. *Am Coll Cardiol* **25** (5): 1143-53.

Diedrichs H, Frank K, Schneider CA, Burst V, Hagemeister J, Zobel C, Müller-Ehmsen J. (2007). Increased functional importance of the Na,Ca-exchanger in contracting failing human myocardium but unchanged activity in isolated vesicles. *Int Heart J.* **48** (6):755-66.

Dipla K., Mattiello J.A., Marculies K.B., Jeevanandam V., Houser S.R. (1999). The sarcoplasmic reticulum and the Na^+/Ca^{2+} exchanger both contribute to the Ca^{2+} transient of failing human ventricular myocytes. *Circ Res* **84** (4): 435-444.

DiPolo R., Beaugé L. (2006). Sodium/calcium exchanger: influence of metabolic regulation on ion carrier interactions. *Physiol Rev* **86**(1):155-203

Ertl G. and Frantz S. (2005). Healing after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* **66** (1): 22-32.

Faria T.O. (2009). Alterações Ponderais, Hemodinâmicas e da Função Vascular do Leito Arterial Caudal em Ratas Sete Dias Após o Infarto do Miocárdio. Dissertação de Mestrado.

Figueroa M.S., Peters J.I. (2006). Congestive Heart Failure: Diagnosis, Pathophysiology, Therapy, and Implications for Respiratory Care. *Respiratory Care* **51**(4):403– 412.

Fishbein M.C., Maclean D., Maroko P.R. (1978). Experimental myocardial infarction in the rat qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *Am J Pathol* **90**: 57-70.

Fletcher P.J., Pfeffer J.M., Pfeffer M.A. and Braunwald E. (1981). Left ventricular diastolic pressure-volume relations in rats with healed myocardial infarction. Effects on systolic function. *Circ Res* **49**: 618-626.

Francis J., Weiss R.M., Wei G., Johnson A.K., Felder R.B. (2001). Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* **281**: R1734-1745.

Frank K.F., Bölck B., Erdmann E., Schwinger R.H.G. (2003). Sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase modulates cardiac contraction and relaxation. *Cardiovascular Research* **57**: 20–27.

Gaughan JP, Furukawa S, Jeevanandam V, Hefner CA, Kubo H, Margulies KB, McGowan BS, Mattiello JA, Dipla K, Piacentino V 3rd, Li S, Houser SR (1999). Sodium/calcium exchange contributes to contraction and relaxation in failed human ventricular myocyte. *Am J Physiol* **277** (2 Pt2): H714-H724.

Giuseppe I., Prasad A.M., Pilakatta R. (2008). The Ca^{2+} ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum: physiological role and relevance to diseases. *Biochem Biophys Res Commun* **369** (1): 182-187.

Gomez A.M., Guatimosim S., Dilly K.W., Vassort G., Lederer W.J. (2001). Heart failure after myocardial infarction: altered excitation-contraction coupling. *Circulation* **104** (6): 688-93.

Groote P., Millaire A., Foucher-Hossein C., Nugue O., Marchandise X., Ducloux G., Labanche J.M. (1998). Right Ventricular Ejection Fraction Is an Independent Predictor of Survival in Patients With Moderate Heart Failure. *FACC JACC* **32**: 948-54.

Gwathmey J.K., Copelas L., MacKinnon R., Schoen F.J., Feldman M.D., Grossman W., Morgan J.P. (1987). Abnormal intracellular calcium handling in myocardium from patients with end-stage heart failure. *Circ Res.* **61**(1):70-6.

Haddad F., Hunt S.A., Rosenthal D.N., Murphy D.J. (2008). Right Ventricular Function in Cardiovascular Disease, Part I Anatomy, Physiology, Aging, and Functional Assessment of the Right Ventricle. *Circulation* **117**:1436-1448.

Hagemann D., Kuschel M., Kuramochi T., Zhu W., Cheng H., Xiao R.P. (2000). Frequency-encoding Thr17 phospholamban phosphorylation is independent of Ser16 phosphorylation in cardiac myocytes. *J Biol Chem* **275** (29): 22532-6.

Hajjar R.J., Kang J.X., Gwathmey J.K., Rosenzweig A. (1997). Physiological effects of adenoviral gene transfer of sarcoplasmic reticulum calcium ATPase in isolated rat myocytes. *Circulation.* **95**:423-429.

Hasenfuss G., Meyer M., Schillinger W., Preus M., Pieske B., Just H. (1997). Calcium handling proteins in the failing human heart. *Basic Res Cardiol*. **92**: 87-93.

Hasenfuss G., Pieske B. (2002) Calcium cycling in congestive heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* ***34***: 951-969.

Hasenfuss G., Schillinger W., Lehnart S.E., Preuss M., Pieske B., Maier L.S., Prestle J., Minami K., Just H. (1999). Relationship between Na^{+}-Ca^{2+}-exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium. *Circulation.* **99** (5):641-8.

Hasenfuss G. (1998). Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. *Cardiovasc Res* **37**:279– 89.

Houser S.R., Piacentino III V., and Weisser J. (2000) Abnormalities of calcium cycling in the hypertrophied and failing heart. *J. Mol. Cell. Cardiol*. **32**: 1595-1607.

Huang B., Wang S., Qin D., Boutjdir M., El-Sherif N. (1999). Diminished basal phosphorylation level of phospholamban in the postinfarction remodeled rat ventricle role of β-adrenergic pathway, G_i protein, phosphodiesterase, and phosphatases. *Circ. Res.* **85**: 848-855.

Inesi G., Prasad A.M., Pilankatta R. (2008). The Ca^{2+} ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum: Physiological role and relevance to diseases. *Biochem Biophys Res Commun*. **369** (1):182-7.

Ito K., Yan X., Tajima M., Su Z., Barry W.B., Lorell B.H. (2000). Contractile Reserve and Intracellular Calcium Regulation in Mouse Myocytes From Normal and Hypertrophied Failing Hearts. *Circ. Res.* **87**: 588-595.

Jasmin J.F., Calderone A., Leung T.K., Villeneuve L., Dupuis J. (2004). Lung structural remodeling and pulmonary hypertension after myocardial infarction: complete reserval by irbesartan. *Cardiovascular Research* **58**: 621-631.

Juilliere Y., Barbier G., Feldmann L., Grentzinger A., Danchin N., Cherrier F. (1997). Additional predictive value of both left and right ventricular ejection fractions on long-term survival in idiopathic dilated cardiomyopathy. *European Heart Journal* **18**: 276-280.

Katz A.M. (1992). Excitation-contraction coupling. Calcium and other ion fluxes across the plasma membrane. *Physiology of the Heart* 219-242.

Kiss E., Ball N.A., Kranias E.G., Walsh R.A. (1995). Differential changes in cardiac phospholamban and sarcoplasmic reticular Ca^{2+}-ATPase protein levels. Effects on Ca^{2+} transport and mechanics in compensated pressure-overload hypertrophy and congestive heart failure. *Circ Res* **77** (4): 759-764.

Koss K.L., Kranias E.G. (1996). Phospholamban: a prominent regulator of myocardial contractility. *Circulation Research* **79**: 1059-1063.

Koss K.L.., Grupp I.L., Kranias E.G. (1997). The relative phospholamban and SERCA2 ratio: a critical determinant of myocardial contractility. *Basic Res Cardiol.* **92**(1):17-24.

Laceya L., Tabberer M. (2005). Economic burden of post-acute myocardial infarction heart failure in the United Kingdom. *The European Journal of Heart Failure* **7**: 677– 683.

Lehnart S.E., Maier L.S., Hasenfuss G. (2009). Abnormalities of calcium metabolism and myocardial contractility depression in the failing heart. *Heart Fail Rev*. **14**(4): 213–224.

Leszek P., Szperl M., Klisiewicz A., Janas J., Biederman A., Rywik T., Piotrowski W., Kopacz M., Korewicki J. (2007). Alteration of myocardial sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase and Na^{+}-$Ca2^{+}$ exchanger expression in human left ventricular volume overload. *Eur J Heart Fail* **9**(6-7):579-86.

Linck B., Bokni'k P., Baba H.A., Eschenhagen T., Haverkamp U., Jäckel E., Jones L.R., Kirchhefer U., Knapp J., Läer S., Müller F.U., Schmitz W., Scholz J., Syska A., Vahlensieck U., Neumann J. (1998). Long-term *beta* adrenoceptor-mediated Alteration in Contractility and Expression of Phospholamban and sarcoplasmic reticulum Ca^{++}-ATPase in Mammalian Ventricle . *JPET* **286** (1): 531-538.

Lyon A.R., MacLeoda K.T., Zhangb Y., Garcia E., Kandaa G.K., Labb M.J., Korchevb Y.E., Hardinga S.E., Gorelika J (2009). Loss of T-tubules and other changes to surface topography in ventricular myocytes from failing human and rat heart. *PNAS* **16:** 6854–6859.

Maier L.S., Wahl-Schott C., Horn W., Weichert S., Pagel C., Wagner S., Dybkova N., Müller O. J., Näbauer M., Franz W.M. , Pieske B. (2005). Increased SR Ca2+ cycling contributes to improved contractile performance in SERCA2a-overexpressing transgenic rats. *Cardiovascular Research* **67**: 636-646.

Maier L.S., Brandes R., Pieske B., Bers D.M. (1998). Effects of left ventricular hypertrophy on force and Ca^{2+} handling in isolated rat myocardium. *Am J Physiol* **274** (4): H1361-H1370.

Mathey D., Bleifeld W., Hanrath P., Effert S. (1974) Attempt to quantitate relation between cardiac function and infarct size in acute myocardial infarction. *Br Heart J* **36**: 271-279.

Meyer M., Bluhm W. F., He H, Post S. R., Giordano F. J., Lew W. Y. W., Dillmann W. H. (1999). Phospholamban-to-SERCA2 ratio controls the force-frequency relationship *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **276**:779-785.

Milano C.A., Allen L.F., Rockman H.A., Dolber P.C., McMinn T.R., Chien K.R., Johnson T.D., Bond R.A., Lefkowitz R.J. (1994). Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the beta 2-adrenergic receptor. *Science* **264** (5158): 507-8.

Mill JG, Stefanon I, Leite CM, Vassallo DV (1990). Changes in performance surviving myocardium after left ventricular infarction in rats. *Cardiovascular Research* **24**: 748-453.

Mill J.G., Vassallo D.V., Leite C.M. (1992). Mechanisms underlying the genesis of post-rest contractions in cardiac muscle. *Braz J Med Biol Res*. **25** (4):399-408.

Minicucci M.F., Azevedo P.S., Duarte D.R., Matsubara B.B, Matsubara L.S., Campana A.O., Paiva S.A.R., Zornoff L.A.M. (2007). Comparison of Different Methods to Measure Experimental Chronic Infarction Size in the Rat Model. Arq *Bras Cardiol* **89**(2) : 83-87.

Mork H.K., Sjaastad I., Sejersteda, O.M., Loucha W.E. (2009). Slowing of Cardiomyocyte Ca^{2+} Release and Contraction During Heart Failure Progression in Post-Infarction Mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **296**(4):H1069-79.

Mueller X.M., Tevaearai H., Boone Y., Augstburger M., Segesser L.K. (2002). An alternative to left ventricular volume reduction. *Journal Heart Lung Transplant* **21**: 791-796.

Nagata K., Liao R., Eberli F.R., Satoh N., Chevalier B., Apstein C.S., Suter T.M. (1998). Early chanbes in excitation-contraction coupling: transition from compensated hypertrophy to failure in Dahl salt-sensitive rat myocytes. *Cardiovasc Res* **37**(2): 467-477.

Nahrendorf M., Hu K., Fraccarollo D., Hiller K. H., Haase A. , Bauer W. R., Ertl G. (2003). Time course of right ventricular remodeling in rats with experimental myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**: H241–H248.

Netticadan T., Temsah R.M., Kawabata K., Dhalla N.S. (2000). Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein kinase is altered in heart failure. *Circ Res.* **86**(5):596-605.

Norman T.D., Coers C.R. (1960). Cardiac hypertrophy after coronary artery ligation in rats. *Arch Pathol* **69**: 181-4

Novaes M.A., Stefanon I., Mill J.G., Vassallo D.V. (1996). Contractility changes of the right and ventricular muscle after chronic myocardial infarction. *Braz J Med Biol Res* **29** (12): 1683-90.

Nuss H.B., Houser S.R. (1994). Effect of duration of depolarization on contraction of normal and hypertrophied feline ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* **28**(10): 1482-1489.

Orchard C., Brette F. (2008). T-tubules and sarcoplasmic reticulum function in cardiac ventricular myocytes. *Cardiovascular Research* **77:** 237–244.

Pereira R.B., Sartório C.L., Vassallo D.V., Stefanon I. (2005). Differences in tail vascular bed reactivity in rats with and without heart failure following myocardial infarction. *J Pharmacol and Experimental Therapeutics* **312**: 1321-1325.

Pfeffer J.M. (1991). Progressive ventricular dilation in experimental myocardial infarction and its attenuation by angiotensin-converting enzyme inhibition. *Am J Cardiol* **68** (14): 17D-25D.

Pfeffer J.M., Pfeffer M.A., Braunwald E. (1985). Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat. *Circ. Res.***57**: 84-95

Pfeffer J.M., Pfeffer M.A., Fletcher P.J., Braunwald E. (1984). Ventricular performance in rats with myocardial infarction and failure. *Am J Med* **76** (5B):99-103.

Pfeffer M.A. and Braunwald E. (1990). Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* **81**;1161-1172.

Pfeffer M.A., Pfeffer J.M. , Fishbein M.C., Fletcher P.J. Spadaro J., Kloner R.A., Braunwald E. (1979). Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ. Res.* **44**: 503-512.

Pfeffer M.A., Pfeffer J.M., Fishbein M.C., Fletcher P.J., Spadaro J., Kloner R.A., Braunwald E. (1979). Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circulation Research* **44**: 503-512.

Piacentino V. 3rd, Weber C.R., Chen X., Weisser-Thomas J., Margulies K.B., Bers D.M., Houser S.R. (2003). Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes. *Circ Res*. **92**(6):651-8.

Pieske B., Maier L.S., Bers D.M., Hasenfus G. (1999). Ca^{2+} handling and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content in isolated failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* **85** (1): 38-46.

Pieske B., Maier L.S., Schmidt-Schweda S. (2002). Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} load in human heart failure**.** *Basic Res Cardiol***. 97**(1):I63-I71

Pinto V.D., Cutini G.F., Sartório C.L., Paigel A.S. Vassallo D.V., Stefanon I. (2007). Enhanced beta-adrenergic response in rat papillary muscle by inhibition of inducible nitric oxide synthase after myocardial infarction. Acta Physiol **190** (2): 111-7.

Prunier F., Kawase Y., Gianni D., Scapin C., Danik S.B., Ellinor P.T., Hajjar R.J., Del Monte F. (2008). Prevention of ventricular arrhythmias with sarcoplasmic reticulum Ca2+ ATPase pump overexpression in a porcine model of ischemia reperfusion. *Circulation* **118** (6): 614-24.

Rockman H.A., Chien K.R., Choi D.J., Iaccarino G., Hunter J.J., Ross J. Jr, Lefkowitz R.J., Koch W.J. (1998). Expression of a beta-adrenergic receptor kinase 1 inhibitor prevents the development of myocardial failure in gene-targeted mice. *Proc Natl Acad Sci* **95**(12):7000-5.

Sande J.B., Sjaastad I., Hoen I.B., Bokenes J., Tonnessen T., Holt E., Lunde P.K., Christensen G. (2002). Reduced level of serine phosphorylated phospholamban in the failing rat myocardium: a major contributor to reduced SERCA2 activity. *Cardiovascular Research* **53**: 382-391.

Sathish V., Xu A., Karmazyn M., Sims S.M., Narayanan N. (2006). Mechanistic basis of differences in Ca^{2+}-handling properties of sarcoplasmic reticulum in right and left ventricles of normal rat myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**: H88–H96.

Schwinger R.H.G., Munch G., Bolck B., et al (1999). Reduced Ca^{2+}-sensitivy of SERCA 2a in failing human myocardium due to reduced serine16 phospholamban phosphorylation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **31**: 479- 491.

Seixas-Cambão M., Leite-Moreira A.F. (2009). Fisiopatologia da Insuficiência Cardíaca Crônica. *Rev Port Cardiol* **28** (4): 439-471.

Selye H., Bajusz E., Grasso S., Mendell P. (1960). Simple techniques for the surgical occlusion of coronary vessels in the rat. *Angiology* **11**: 398-407.

Sipido K.R., Stankovicova T., Flameng W., Vanhaecke J., Verdonck F. (1998). Frequency dependence of Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum in

human ventricular myocytes from end-stage heart failure. *Cardiovasc Res* **37**(2): 478-488.

Stefanon I., Auxiliadora-Martins M., Vassallo D.V., Mill J.G. (1994). Analysis of right and left ventricular performance of the rat heart with chronic myocardial infarction. *Braz J Med Biol Res* **27**(11): 2667-79.

Stefanon I., Cade J.R., Fernandes A.A, Ribeiro Júnior R.F, Targueta G.P., Mill J.G., Vassallo D.V. (2009). Ventricular performance and Na+-K+ ATPase activity are reduced early and late after myocardial infarction in rats. *Braz J Med Biol Res* **42** (10): 902-911.

Stern M.D. (1992) Theory of excitation-contraction coupling in cardiac muscle. *Biophys. J* **62**: 497-517.

Sun Y., Weber K.T. (2000). Infarct scar: a dynamic tissue. *Cardiovascular Research* **46:** 250–256

Swift F., Birkeland J.A., Tovsrud N., Enger U.H., Aronsen J.M., Louch W.E., Sjaastad I., Sejersted O.M. (2008). Altered Na+/Ca2+-exchanger activity due to downregulation of Na+/K+-ATPase alpha2-isoform in heart failure. *Cardiovasc Res* **79** (2): 352.

Vassallo D.V. & Mill J.G. (1988). Mechanical behavior of rest contractions in cardiac muscle. *Acta Physiologica et Pharmacologica Latinoamericana* **38** (1): 87-97.

Vassallo D.V., Lima E.Q., Campagnaro P., Faria N.A., Mill J.G. (1995). Mechanisms underlying the genesis of post-extrasystolic potentiation in rat cardiac muscle. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **28** (3): 377-83.

Voelkel N.F., Quaife R.A., Leinwand L.A., Barst R.J., McGoon M.D., Meldrum D.R., Dupuis J., Long C.S., Rubin L.J., Smart F.W., Suzuki Y.J., Gladwin M., Denholm E.M., Gail D.B (2006). Right Ventricular Function and Failure: Report of a National Heart, Lung, and Blood Institute Working Group on Cellular and Molecular Mechanisms of Right Heart Failure. *Circulation* **114**: 1883-1891.

Waggoner J.R., Ginsburg K.S., Mitton B., Haghighi K., Robbins J., Bers D.M., Kranias E.G. (2009). Phospholamban overexpression in rabbit ventricular myocytes does not alter sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} transport. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **296:** H698–H703.

Wang J., Liu X., Sentex E., Takeda N, Dhalla N. S. (2003). Increased expression of protein kinase C isoforms in heart failure due to myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**: H2277–H2287.

White D.C., Hata J.A., Shah A.S., Glower D.D., Lefkowitz R.J., Koch W.J. (2000). Preservation of myocardial beta-adrenergic receptor signaling delays the development of heart failure after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci* **97**(10):5428-33.

Wildhirt S.M., Dudek R.R., Suzuki H., Bing R.J. (1995). Involvement of inducible nitric oxide synthase in the inflammatory process of myocardial infarction. Int J Cardiol **50** (3): 253-61.

Yu C.M., Sanderson J.E., Chan S, Yeung L., Hung Y.T., Woo K.S. (1996). Right Ventricular Diastolic Dysfunction in Heart Failure *Circulation.* **93**:1509-1514.

Zakhary D.R., Moravec C.S., Stewart R.W., Bond M. (1999). Protein Kinase A (PKA)-dependent troponin-I phosphorylation and PKA regulatory subunits are decreased in human dilated cardiomyopathy. *Circulation* **99**: 505-510.

Zarain-Herzberg A., Afzal N., Elimban V., and Dhalla N.S. (1996). Decreased expression of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump ATPase in congestive heart failure due to myocardial infarction. *Mol. Cell. Biochem*. **164**: 285-290.

Zornoff L.A., Matsubara L.S., Matsubara B.B., Paiva S.A.R., Spadaro J. (2000). Effects of Losartan on Ventricular Remodeling in Experimental Infarction in Rats. *Arq Bras Cardiol* **75** (6): 465-470.

Zornoff L.A., Skali H., Pfeffer M.A., St John Sutton M., Rouleau J.L., Lamas G.A, Plappert T., Rouleau JR, Moyé LA, Lewis SJ, Braunwald E, Solomon SD; SAVE Investigators. (2002). Right ventricular dysfunction and risk of heart failure and mortality after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* **39**(9):1450-5.

Zornoff L.A., Paiva S.A.R., Duarte D.R., Spadaro J (2009). Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction: Concepts and Clinical Implications. *Arq Bras Cardiol*. **92** (2):150-64.

Zornoff L.A.M., Paiva S.A.R., Minicucci M.F., Spadaro J (2008). Experimental Myocardium Infarction in Rats: Analysis of the Model. *Arq Bras Cardiol* **93**(3): 403-408.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo